

AMANDA FRANCINE ASEGA

**Mobilização de frutanos durante a brotação
em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby:
purificação e expressão gênica de frutano-
exohidrolases**

Tese apresentada ao Instituto de
Botânica da Secretaria do Meio
Ambiente do Estado de São Paulo
como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de DOUTOR
em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na área de
Plantas Vasculares em Análises
Ambientais

SÃO PAULO
2007

AMANDA FRANCINE ASEGA

**Mobilização de frutanos durante a brotação
em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby:
purificação e expressão gênica de frutano-
exohidrolases**

**Tese apresentada ao Instituto de
Botânica da Secretaria do Meio
Ambiente do Estado de São Paulo
como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de DOUTOR
em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na área de
Plantas Vasculares em Análises
Ambientais**

**ORIENTADORA: MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO
CO-ORIENTADOR: JOÃO ROBERTO O. DO NASCIMENTO**

Aos meus pais Pedro e Marlene e à minha querida Kathy
pelo amor e carinho dedicados e pela
orientação que deram à minha vida,

DEDICO

**“Um dia nos encontraremos em um ponto da
Terra que o destino se encarregará de marcar...”**

Thereza Mattos

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus e à Mãe Natureza pela dádiva da vida.

À minha família, Pedro, Marlene e Katherine, que sempre me incentivaram a continuar a caminhada, pelo amor incondicional, pela paciência e cumplicidade.

A Dra. Maria Angela Machado de Carvalho pela oportunidade, pela orientação, pela confiança e pelo carinho dedicado.

Ao Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento pela co-orientação e pelo apoio concedido ao meu aperfeiçoamento profissional.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, especialmente à Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelas facilidades oferecidas e à Pós Graduação do Instituto de Botânica, em especial às coordenadoras Dra. Sonia M.C. Dietrich e Dra. Solange C. Mazzoni-Viveiros.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro e pela bolsa concedida no início do desenvolvimento da tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e apoio financeiro aos projetos temáticos 98/05124-8 e 05/04139-7.

À Dra. Lílían Beatriz Penteado Zaidan, chefe da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Ao Dr. Franco Maria Lajolo e à Dra. Beatriz R. Cordenunsi, do Laboratório de Química e Bioquímica do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por permitir o acesso ao laboratório e demais facilidades durante o estágio realizado nesta instituição.

Ao Dr Wim Van den Ende e ao Dr André Van Laere, do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas da Universidade Católica de Leuven (Bélgica) pela colaboração na análise funcional do cDNA da 1-FEH, além do carinho e atenção concedidos.

Ao Dr Sérgio Schenkman, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, pela colaboração no sequenciamento de aminoácidos da invertase purificada.

À Dra Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro pelo incentivo e apoio, pela amizade e exemplo.

À Dra. Márcia Regina Braga e à Dra. Marília Gaspar pelas sugestões, pelo companheirismo e pela amizade.

Ao Dr. Eduardo Purgatto, pelo apoio concedido durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu, em especial, ao Dr. Marcos Mecca Pinto, aos Srs. Paulo, Samuel, Edson pela colaboração na manutenção das plantas do viveiro e a Sra Mara pela carinhosa refeição servida após as coletas.

Aos funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica, Ana Alice, Aparecida, Mary e Sirley e à Marcinha, secretária da Pós Graduação.

Aos funcionários do Laboratório de Química e Bioquímica do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em especial Márcia, Lúcia e Tânia.

Ao Christian, pela compreensão, amizade e amor dedicado.

Aos amigos Adriana de Godoy, Amanda de Souza, Amanda P. Souza, Ana Cristina, André Rösch Rodrigues, Claudia Alves, Fábio Dalle Molle, Fernanda K., Fernanda Macedo, Fernanda Peroni, Janaina Mainardi, Kelly Simões, Ludmila Raggi, Maria Luiza, Maria Tereza, Marco Aurélio Tiné, Marcelino, Marcelinho, Milana Dan, Marina Martins, Moacir, Paola Mitie, Paulo Henrique, Patrícia Gaya, Maria Rosecler, Roberta Moretto, Tatiana Botelho e Vanessa de Oliveira pelos momentos de alegria, pela cumplicidade e pela agradável convivência e apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos cosmopolitas, Mieke, Katrien, Veerle, Lindsey, Sughis, Tolga, José, Nandu, Raja, Enrique, Jerzy e Anne Marie, um presente do doutorado para toda a vida.

A todos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
PREFÁCIO	xiii
CAPÍTULO I. Introdução	
1. Distribuição e estrutura dos frutanos	2
2. Frutanos na flora do cerrado	6
2.1. O bioma cerrado	6
2.2. Espécies acumuladoras de frutanos	7
2.3. Fenologia e sazonalidade da flora acumuladora de frutanos	8
3. Enzimas do metabolismo de frutanos	10
3.1. Enzimas do metabolismo de frutanos em Asteraceae do cerrado	13
4. Papel fisiológico na tolerância à seca	17
5. Produtividade e uso potencial dos frutanos da flora do cerrado	19
6. Considerações finais	21
7. Referências bibliográficas	21
 CAPÍTULO II. Purificação parcial de 1-FEHs de plantas de <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby em brotação	
Resumo	31
Abstract	32
Introdução	33
Material e métodos	37
Material vegetal	37
Extração e purificação das 1-FEHs	37
Ensaio enzimático	38
Quantificação de proteína	38
Análise das atividades enzimáticas	39
Análise das proteínas purificadas	39
Resultados	40
Discussão	53
Referências bibliográficas	58

CAPÍTULO III. Clonagem e análise funcional do cDNA da 1-FEH de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby

Resumo	65
Abstract	66
Introdução	67
Material e métodos	71
Material vegetal	71
Extração de RNA total	72
Extração de DNA	73
Análise qualitativa e quantitativa de ácidos nucléicos	74
Digestão do DNA genômico de <i>V. herbacea</i>	74
Northern blotting	75
Comparação das seqüências de aminoácidos de FEHs de outras espécies	76
Estratégia de clonagem do cDNA da 1-FEH de plantas induzidas à brotação	79
Estratégia de clonagem do cDNA da 1-FEH de plantas em fase de brotação natural	80
Clonagem e transformação	80
Análise por PCR das colônias transformantes	81
Extração de DNA plasmidial	81
Seqüenciamento e análise das seqüências	81
Expressão heteróloga da 1-FEH Induzida/5 °C de <i>V. herbacea</i> em <i>Pichia pastoris</i>	82
Resultados	88
Protocolo para estudo da expressão dos genes que codificam a 1-FEH	88
Estratégia de clonagem de cDNAs de 1-FEHs de plantas em brotação	90
Expressão heteróloga da 1-FEH Induzida/5 °C de <i>V. herbacea</i> em <i>Pichia pastoris</i>	100
Discussão	109
Referências bibliográficas	113
Anexo – Mapa do vetor pPICZ α A	118

**CAPÍTULO IV Mobilização de frutanos durante o processo de brotação
em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby**

Resumo	120
Abstract	121
Introdução	122
Material e métodos	126
Material Vegetal	126
Extração enzimática	127
Ensaio enzimático	127
Análise das atividades enzimáticas	128
Extração e análise de açúcares solúveis	128
Extração e análise qualitativa do RNA	130
Preparo de sonda radioativa do cDNA de 1-FEH de <i>V. herbacea</i>	130
<i>Northern blotting</i>	130
Resultados	132
Mobilização de frutanos de plantas em fase de brotação natural	132
Mobilização de frutanos de plantas induzidas à brotação	144
Discussão	155
Referências bibliográficas	163
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 171
RESUMO	175
ABSTRACT	177

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BMGY	Meio de cultura para gerar biomassa (<i>buffered minimal glycerol</i>)
BMMY	Meio de cultura para induzir a expressão (<i>buffered minimal methanol</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina de soro bovino
1-C	1-cestose
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxiribonuclease
dATP	2' -desoxiadenosina 5'-trifosfato
dNTPs	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EC	<i>Enzyme Commission</i>
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EMBL/ EBI	<i>European Molecular Biology Laboratory/ European Bioinformatics Institute</i>
F	Frutose
1-FEH	1-frutano exohidrolase (EC 3.2.1.153)
6-FEH	6-frutano exohidrolase (EC 3.2.1.154)
1-FFT	1-frutano: frutano frutossiltransferase (EC 2.4.1.100)
6G-FFT	Frutano: frutano 6G frutossiltransferase (EC 2.4.1.243)
G	glucose
GH	Família das enzimas Glicosil Hidrolases
GP	Grau de polimerização
HPAEC/PAD	Cromatografia de troca aniônica de alta resolução e detecção por pulso amperométrico
iPCR	<i>Inverse Polymerase Chain Reaction</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	Quilobase (mil pares de bases)
kDa	Quilo Daltons
KEH	cestose exohidrolase
LB	Meio de cultura Luria-Bertani

mRNA	RNA mensageiro
ms	Milisegundos
MW	Peso molecular (<i>Molecular Weight</i>)
nm	nanômetro
ORF	<i>Open reading frame</i> (Fase contínua de leitura)
[³² P] α-dCTP	Grupo fosfato marcado com fósforo ³² radioativo na posição alfa do desoxicitidina 5'-trifosfato
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
<i>Pfx</i>	DNA polimerase recombinante da bactéria <i>Thermococcus</i> sp
pI	Ponto isoelétrico
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
p/v	Peso por volume
PVP	Polivinilpirrolidona
PVPP	Polivinil polipirrolidona
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
1-SST	1-sacarose: sacarose frutossiltransferase (EC 2.4.1.99)
6-SFT	Sacarose: frutano 6 frutossiltransferase (EC 2.4.1.10)
S	Subunidade do rRNA
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	Solução contendo cloreto de sódio e citrato de sódio
<i>Taq</i>	DNA polimerase termoestável da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris acetato-EDTA
TE	Tris EDTA
ton	toneladas
TPE	Tris fosfato-EDTA
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
UTR	Região não traduzida
UV	Radiação ultra-violeta
V	Voltagem
v/v	volume/ volume
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

2xYT	Meio de cultura contendo extrato de levedura e triptona (<i>yeast extract tryptone</i>)
YPD	Meio de cultura contendo extrato de levedura, peptona e dextrose (<i>yeast extract peptone dextrose</i>)
YPDS	Meio de cultura contendo extrato de levedura, peptone, dextrose e sorbitol (<i>yeast extract peptone dextrose sorbitol</i>)

PREFÁCIO

No presente trabalho são abordados, e distribuídos em quatro capítulos, aspectos da mobilização de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, uma espécie herbácea de Asteraceae nativa do cerrado.

No capítulo I são abordados os principais aspectos relacionados ao estudo do metabolismo de frutanos e da sua ocorrência em espécies Asteraceae do cerrado brasileiro.

O capítulo II trata da purificação de 1-FEHs de plantas de *V. herbacea* em fase de brotação. A partir de rizóforos dessas plantas foram isoladas diversas frações com atividade de 1-FEH, sendo verificada a ocorrência de várias isoformas desta enzima que possivelmente atuam em conjunto na mobilização de frutanos durante a brotação.

O capítulo III traz os resultados sobre a clonagem e a análise funcional de um cDNA de 1-FEH de *V. herbacea*. Os resultados obtidos neste capítulo constituem ferramentas que possibilitarão ampliar a compreensão em nível molecular da atuação desta enzima em processos fisiológicos e bioquímicos.

No capítulo IV a mobilização de frutanos foi analisada através da atividade e da expressão gênica da 1-FEH bem como do conteúdo e composição dos frutanos em rizóforos de plantas em fase de brotação natural e em plantas induzidas à brotação pela remoção dos ramos aéreos. O efeito do frio sobre a mobilização de frutanos também foi analisado em plantas induzidas à brotação.

Além de ampliar o conhecimento sobre o metabolismo de frutanos em uma espécie herbácea, perene e nativa do cerrado, esse trabalho fornece informações que contribuirão para o entendimento do papel ecofisiológico dos frutanos na adaptação dessas plantas ao cerrado.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Adaptado de **Carvalho, M.A.M., Asega, A.F. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** Fructans in Asteraceae from the Brazilian cerrado. *In* N. Shiomi (ed.). Advances in fructooligosaccharides research (no prelo).

A ocorrência do metabolismo de frutanos em vegetais superiores vem sendo extensivamente estudada nas últimas décadas e uma quantidade considerável de informação foi compilada em diversas revisões que abordam a distribuição, a estrutura, a fisiologia, o metabolismo e, mais recentemente, a biologia molecular destes compostos, graças à clonagem de cDNAs de várias enzimas envolvidas no seu metabolismo (Pollock *et al.* 1996, Cairns *et al.* 2000, Van den Ende *et al.* 2002, Chalmers *et al.* 2005). O interesse em estudar as espécies acumuladoras de frutanos surgiu devido ao seu uso na agricultura e a aplicação dos frutanos na indústria farmacêutica e alimentícia. O interesse em metabolismo de frutanos surge, em parte, da sua relação com o metabolismo da sacarose e do seu mecanismo peculiar de síntese, no qual nenhum açúcar nucleotídeo intermediário é formado, da distribuição da flora acumuladora de frutanos e do seu papel na adaptação das plantas a fatores de estresse ambiental. Entretanto a maior parte da pesquisa tem sido realizada com um número pequeno de espécies, principalmente com aquelas economicamente importantes. O presente capítulo discutirá a fisiologia do metabolismo de frutanos em espécies herbáceas de uma área restrita do cerrado brasileiro e seu papel ecofisiológico na adaptação destas plantas ao ambiente de cerrado. Será avaliada, também, a importância destas plantas como novas fontes de inulina para as indústrias alimentícia e farmacêutica.

1. DISTRIBUIÇÃO E ESTRUTURA DOS FRUTANOS

Frutanos são oligo e polissacarídeos baseados na unidade de frutose que ocorrem como carboidratos de reserva em cerca de 15 % das Angiospermas, incluindo as famílias mais evoluídas, Asteraceae e Poaceae (Hendry & Wallace 1993).

Os frutanos são também encontrados em briófitas, algas, fungos e bactérias, razão pela qual Hendry (1993) sugeriu a natureza polifilética para a sua ocorrência. Esta hipótese é fortalecida através de análise filogenética das enzimas do metabolismo de frutanos de plantas, frutossiltransferases, frutano exohidrolases e invertases (Ritsema & Smeekens 2003), que mostrou que enzimas de uma espécie ou família, que confere tipos diferentes de reações, são, algumas vezes, mais intimamente relacionadas do que aquelas enzimas que catalisam a mesma reação, mas originada de diferentes espécies ou famílias. Observações importantes foram feitas a partir de estudos recentes mostrando que as frutossiltransferases de plantas evoluíram das invertases vacuolares, enquanto que

as frutano exohidrolases são mais intimamente relacionadas com as invertases de parede celular (Van den Ende *et al.* 2002, Ritsema & Smeekens 2003).

A maioria das espécies ricas em frutanos encontra-se fora da região tropical, sendo mais abundantes em áreas onde o crescimento é sazonal. A expansão da flora que contém frutanos coincidiu com o desenvolvimento da sazonalidade durante o Eoceno-Mioceno. Não existe uma evidência que associe a expansão da flora que contém frutanos a episódios prolongados de temperaturas frias. A flora do Mioceno é caracterizada pelo aparecimento e a expansão das vegetações de savana e de cerrado em áreas quentes (Hendry & Wallace 1993).

Os frutanos são formados por adições sucessivas de unidades de frutose com diferentes ligações a três trissacarídeos: 1-cestose (1-F-frutosil sacarose), 6-cestose (6-F-frutosil sacarose) e neocestose (6-G-frutosil sacarose). Estes trissacarídeos são sintetizados pela ligação da unidade de frutose em um dos três grupos hidroxila da sacarose (Pollock *et al.* 1996). Baseando-se nos três trissacarídeos e no tipo de ligação entre as unidades de frutose, cinco tipos diferentes de estruturas de frutanos podem ser distinguidos em plantas superiores, conforme ilustra a figura 1:

- a) inulina, uma molécula tipicamente linear encontrada em Asteraceae, que contém ligações do tipo β (2,1) e é baseada no trissacarídeo 1-cestose;
- b) levano, que também é uma molécula linear, encontrado em Poaceae, contém ligações do tipo β (2,6) e é baseado na 6-cestose;
- c) frutanos ramificados e de ligações mistas com unidade terminal de glucose, encontrados em Poaceae;
- d) frutanos baseados na neocestose com ligações β (2,1), encontrado em aspargo, cebola (Liliaceae), e em alguns membros de Poaceae; e
- e) frutanos baseados na neocestose com ligações β (2,6) encontrados em alguns membros de Poaceae.

Inulo-n-ose é uma série de frutanos que não contém a unidade de glucose terminal e que foi encontrada em algumas fases fenológicas de espécies de Asteraceae (Carvalho *et al.* 1997). A complexidade estrutural dos frutanos varia de acordo com a ligação glicosídica entre as unidades de frutose, a ramificação de cadeias lineares, a posição da molécula de sacarose na cadeia de açúcar e o comprimento da cadeia.

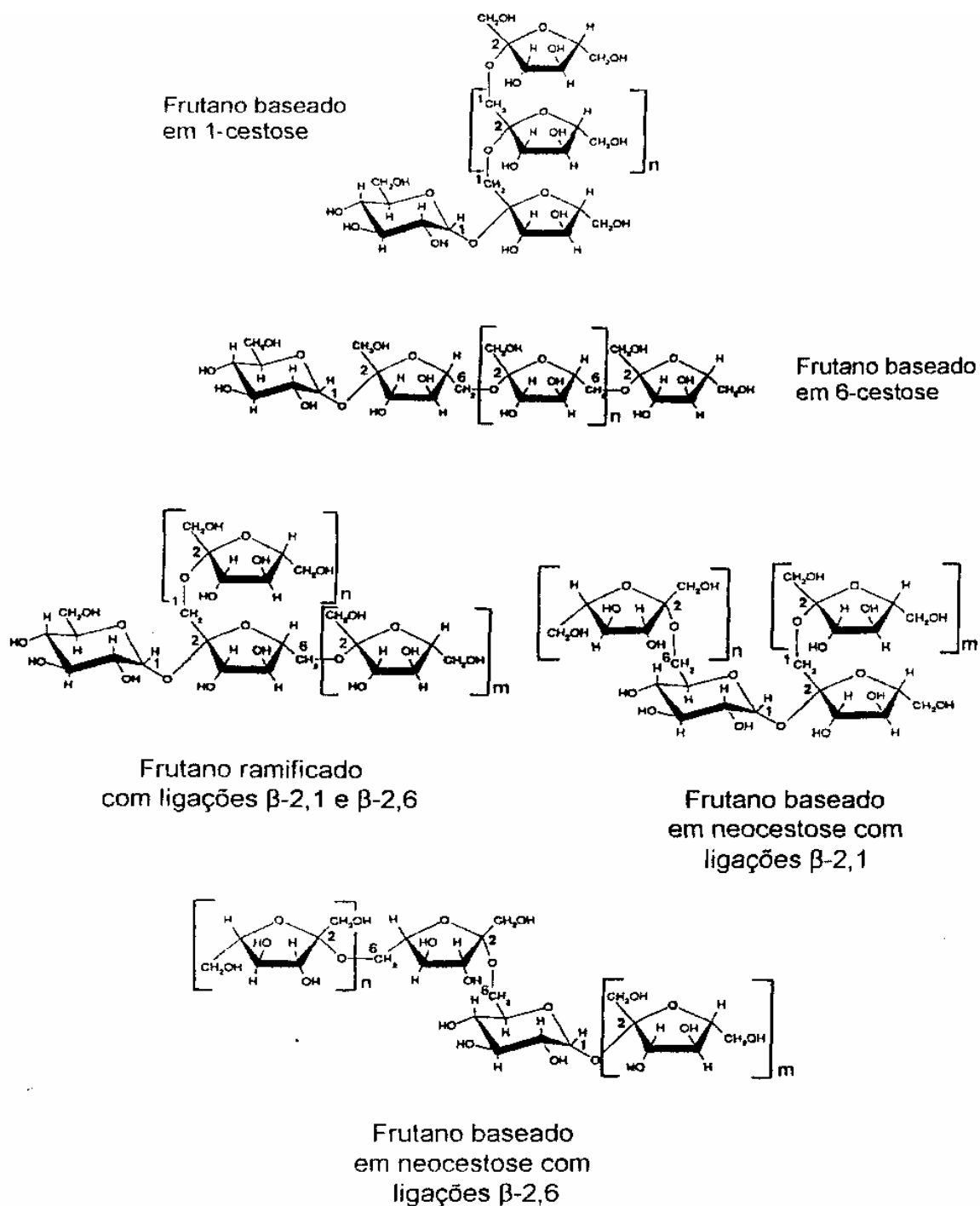


Figura 1. Estrutura geral das cinco classes de frutanos, segundo Carpita *et al.* 1991 e Livingston *et al.* 1993.

Outro aspecto do metabolismo de frutanos refere-se à distribuição do tamanho de moléculas presente nos tecidos. Segundo Pollock & Chatterton (1988), o tamanho médio das moléculas de frutanos pode variar de acordo com a espécie, idade da planta e órgão estudado, assim como fatores ambientais e o ciclo fenológico da planta podem afetar o tamanho das moléculas à medida que estes fatores interferem no acúmulo e na utilização destes compostos.

Variações no conteúdo total de frutanos e na distribuição do tamanho das moléculas foram descritas em diferentes fases fenológicas e estádios de desenvolvimento em plantas nativas do cerrado (Carvalho & Dietrich 1993, Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993, Vieira & Figueiredo-Ribeiro 1993, Portes & Carvalho 2006).

A razão para a variedade de estruturas de frutanos em plantas é desconhecida; uma razão poderia ser sugerida baseando-se nas diferentes necessidades fisiológicas ou poderia ser uma consequência das diferentes origens evolutivas da biossíntese de frutanos em diferentes famílias (Ritsema & Smeekens 2003).

Embora a presença do metabolismo de frutanos tenha sido extensivamente descrita, os estudos sobre frutanos e o metabolismo de frutanos tem sido realizados com poucas espécies como: alcachofra de Jerusalem (*Helianthus tuberosus* L.), chicória (*Cichorium intybus* L.), dente de leão [*Taraxacum officinale* (Web.) Wigg], alcachofra (*Cynara scolymus* L.), entre as Asterales, alho (*Allium sativum* L.), cebola (*Allium cepa* L.), aspargo (*Asparagus officinalis* L.), entre as Liliales e trigo (*Triticum aestivum* L.), cevada (*Hordeum vulgare* L.) e gramíneas forrageiras de clima temperado (*Lolium perenne* L., *L. temulentum* L.) entre as Poales, algumas das quais com importante significado econômico.

Portanto, estudos relacionados com a ocorrência e a distribuição da flora acumuladora de frutanos e com as mudanças no conteúdo e na composição destes carboidratos, durante processos fisiológicos diferentes e sob condições ambientais estressantes, são essenciais para elucidar o papel ecofisiológico do metabolismo de frutanos. Estudos nesta área podem também mostrar novas fontes de carboidratos para uso nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

2. FRUTANOS NA FLORA DO CERRADO

2.1. O Bioma Cerrado

O cerrado ocupa cerca de 21% do território brasileiro e caracteriza-se pela sazonalidade bem definida e regime de água que inclui verão úmido e inverno seco, em geral com duração de cinco meses, e por sua vegetação florística e fisionomicamente diversa. Essa diversidade abrange desde matas abertas até arvoredos. Entre estes dois extremos está a forma intermediária de fisionomia de savana. O cerrado é o segundo maior bioma no território brasileiro estando atrás apenas da floresta amazônica (Eiten 1972, Coutinho 2002).

O solo do cerrado caracteriza-se por ser profundo, poroso, permeável e consiste de uma mistura de areia e argila, em proporções diferentes, com baixa retenção de água, baixa capacidade de troca catiônica e pobre em nutrientes. O solo é ácido, o pH varia entre 4 e 5, devido em parte ao alto nível de Al^{3+} . Estas condições contribuem para formação de uma vegetação xeromórfica e rica (Eiten 1972).

Embora um grande número de espécies tenha sido descrito, a flora do cerrado ainda não é completamente conhecida. As plantas herbáceas representam mais do que o dobro das espécies de árvores (Coutinho 2002).

Mantovani & Martins (1988) realizaram um levantamento fenológico de plantas vasculares no cerrado e concluíram que o comportamento fenológico apresentado pela vegetação representa uma série de estratégias adaptativas para superar a temperatura, a seca e o estresse nutricional. Parte destas estratégias inclui a presença massiva de órgãos subterrâneos espessados em plantas herbáceas que atravessam períodos de acúmulo de fotoassimilados durante o seu ciclo de desenvolvimento. Alguns destes órgãos apresentam características escleromórficas e são considerados respostas evolutivas à distrofia do solo, à toxicidade por alumínio, à seca e à queima regular.

Os órgãos subterrâneos são estruturas perenes que garantem não apenas a sobrevivência das plantas durante os períodos de condições ambientais adversas, mas também, em muitos casos, a reprodução vegetativa destas plantas (Coutinho 2002).

2.2. Espécies acumuladoras de frutanos

A presença de frutanos em Asteraceae tem sido bem documentada para a flora que exibe crescimento sazonal em regiões temperadas (Pollard & Amuti 1981) e para a área subtropical do cerrado brasileiro, onde as plantas herbáceas estão sujeitas a períodos de intensa seca no inverno (Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1986, Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993).

Asteraceae é a família mais representativa em número de gêneros e espécies, constituindo aproximadamente 17% da flora de angiospermas em uma área restrita do cerrado de Moji-Guaçu (22°35'S e 47°44'W), SP, Brasil. Destas, *Vernonia* e *Eupatorium* são os gêneros mais abundantes, compreendendo 5% e 4,5%, respectivamente.

Enquanto o trabalho de Figueiredo-Ribeiro *et al.* (1986) reportou para esta mesma área a vasta ocorrência de carboidratos solúveis em órgãos subterrâneos de espécies herbáceas, outro trabalho realizado por Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro (1993) mostrou a predominância de frutanos do tipo inulina como compostos de reserva em órgãos subterrâneos de aproximadamente 60% das espécies de Asteraceae. Esses autores analisaram trinta e cinco espécies herbáceas de Asteraceae representando seis tribos, e a presença de frutanos foi detectada em 19 espécies de Eupatorieae, Heliantheae e Vernonieae. Esferocristais de inulina foram histologicamente detectados em aproximadamente 80% de todas as espécies analisadas. Os órgãos subterrâneos estudados apresentaram variações em conteúdo de água, concentração de frutanos e localização histológica dos esferocristais de inulina.

A análise por cromatografia em camada delgada revelou a presença de séries homólogas de inulina em todas essas espécies, embora a proporção de vários membros da série variou entre elas. Em todas, com exceção de uma Vernonieae analisada, os esferocristais encontram-se distribuídos nas células do parênquima de reserva. Em Heliantheae e Eupatorieae, os esferocristais estão dispersos no parênquima de reserva ou associados aos tecidos vasculares (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993). Contudo, esta descoberta sugere que o conteúdo de frutanos nos órgãos de reserva não está correlacionado com a presença e a distribuição espacial dos esferocristais de inulina, embora pareça ser um bom marcador taxonômico entre Asteraceae.

De todas as espécies analisadas, *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Vernonieae) e *Viguiera discolor* Baker (Heliantheae) destacam-se pelas altas concentrações de frutanos, que atingem até 80% da massa seca dos órgãos de reserva (Carvalho & Dietrich 1993, Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993).

Diferentemente de todas as espécies de asteráceas do cerrado acumuladoras de frutanos, a presença de frutanos do tipo levano com alto GP em *Gomphrena macrocephala* St. Hil., uma Amaranthaceae, foi descrita pela primeira vez (Vieira & Figueiredo-Ribeiro 1993) e a estrutura molecular foi confirmada posteriormente (Shiomi *et al.* 1996). Os frutanos presentes nas raízes tuberosas de *G. macrocephala* constituem aproximadamente 50% do peso seco e foram detectados no parênquima do xilema secundário e nos elementos vasculares xilemáticos (Vieira & Figueiredo-Ribeiro 1993).

Em relação às espécies de Poaceae, uma das famílias mais representativas no estrato herbáceo do cerrado, os frutanos não foram encontrados em nenhuma das 35 espécies analisadas de Panicoideae e Arundinoideae (Moraes *et al.* 2001).

A capacidade de acumular açúcares que são prontamente disponibilizados, como os frutanos, ao invés de amido, pode ser uma vantagem considerável de plantas do cerrado, não somente como composto de reserva, mas também na superação das condições ambientais desfavoráveis, especialmente a seca e o fogo.

2.3. Fenologia e sazonalidade da flora acumuladora de frutanos

O ciclo anual de desenvolvimento de espécies herbáceas do cerrado é caracterizado por fases fenológicas bem definidas (Mantovani & Martins 1988). A brotação das gemas nos órgãos subterrâneos ocorre na primavera, seguido por um período de crescimento aéreo rápido e desenvolvimento floral que continua durante o verão, até o início do outono. O crescimento do caule é então interrompido e as folhas começam a mostrar os primeiros sinais da senescência, levando à abscisão das partes aéreas e à dormência da planta. Ao final do inverno, novas gemas brotam com a quebra da dormência. Para algumas destas espécies como *Vernonia herbacea* (Carvalho & Dietrich 1993) (figura 2), *Viguiera discolor* (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993) e *Gomphrena macrocephala* (Vieira & Figueiredo Ribeiro 1993) este crescimento sazonal foi bem descrito e associado com variações no conteúdo e composição de frutanos nos órgãos de reserva.



Figura 2. Aspecto geral de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby

Em *V. herbacea*, um declínio no conteúdo de frutano total, que coincidiu com um aumento na frutose livre, foi detectado entre as fases de brotação e floração, indicando a ocorrência de mobilização de frutanos dos órgãos subterrâneos armazenadores associada ao crescimento dos novos ramos aéreos e desenvolvimento floral. Por outro lado, um aumento no frutano total e a detecção do maior comprimento de cadeia de todo o ciclo fenológico – 10,7 kDa – ocorreram ao final da estação de crescimento no final do verão, indicando um período de biossíntese de frutanos (Carvalho & Dietrich 1993).

Resultados similares relacionados com a variação no conteúdo de frutanos ao longo do ciclo fenológico foram descritos para *V. discolor* (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993). Plantas desta espécie apresentaram alto conteúdo de frutanos durante a dormência, contrastando com o baixo conteúdo nas fases de brotação e floração. Durante estas fases, altas quantidades de açúcares de baixa massa molecular e de frutose livre coincidiram com um período de crescimento aéreo, indicando a ocorrência de mobilização de frutanos.

O acúmulo de frutanos em *V. discolor* é também influenciado pelo fotoperíodo. Isejima *et al.* (1991) mostrou que fotoperíodos curtos (8-10 h) tiveram um efeito positivo no espessamento de raízes tuberosas e no acúmulo de frutanos. Entre todas as Asteraceae estudadas, *V. discolor* é a espécie que acumula o frutano com o maior GP, com massa molecular média que varia entre 21 e 28 kDa durante o ciclo fenológico (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993). Valores similares de massa molecular média foram também encontrados para outras espécies da tribo Heliantheae do cerrado (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993).

Em *G. macrocephala*, mudanças no perfil de frutanos incluíram um declínio na fração de polissacarídeos e um aumento de monossacarídeos ao final da dormência, e aumento de oligossacarídeos durante as fases de brotação e vegetativa, como resultado da mobilização de frutanos. Um aumento gradual no comprimento da cadeia do polissacarídeo ocorreu no início da dormência, culminando com a massa molecular média de 37 kDa na dormência (Vieira & Figueiredo Ribeiro 1993).

3. ENZIMAS DO METABOLISMO DE FRUTANOS

Os frutanos são sintetizados em plantas a partir da sacarose por ação de duas ou mais frutossiltransferases. O perfil de frutanos encontrado em grupos diferentes de

plantas reflete a diversidade estrutural destes carboidratos e resulta da ação de múltiplas enzimas.

Segundo o modelo clássico proposto por Edelman & Jefford (1968), duas enzimas atuam na síntese de frutanos da série da inulina, o mais simples frutano presente em plantas. A primeira enzima, 1 sacarose: sacarose frutossil transferase (1-SST, EC 2.4.1.99), catalisa a transferência de uma unidade frutossil de uma molécula de sacarose para outra, produzindo o trissacarídeo 1-cestose, por uma reação irreversível. A segunda enzima, 1 frutano: frutano frutossil transferase (1-FFT, EC 2.4.1.100), catalisa a transferência reversível da unidade frutossil de uma molécula de frutano com GP = 3 para outra molécula de frutano, ou para a sacarose, resultando em moléculas de frutanos com comprimentos de cadeias variáveis. Diferenças na afinidade da 1-FFT pelo substrato doador e receptor resultam em um padrão diferente de polímeros de inulina (Hellwege *et al.* 1998, Hellwege *et al.* 2000, Vergauwen *et al.* 2003).

Este modelo foi confirmado por outros pesquisadores que verificaram para *H. tuberosus* (Koops & Jonker 1996, Lüscher *et al.* 1996) e *C. intybus* (Van den Ende & Van Laere 1996) que a incubação das enzimas purificadas 1-SST e 1-FFT com sacarose resultaram na formação de inulina com um comprimento de até 20 unidades de frutose. A validade deste modelo *in vivo* foi também apoiada pela expressão heteróloga simultânea de 1-SST e 1-FFT em batatas transformadas (Hellwege *et al.* 2000) ou em beterraba (Sévenier *et al.*, 1998). Entretanto, baseado na concentração de frutanos produzido por estas espécies, este modelo é ainda motivo de críticas (Cairns 2003).

Há especulações de que o balanço entre a síntese e a degradação de inulina seja mediado pela SST, que é detectável em tubérculos durante a síntese, mas não durante a mobilização. Devido à ação reversível da 1-FFT, o alongamento da cadeia depende da entrada de carbono via SST, favorecendo a despolimerização quando sua atividade é ausente (Cairns *et al.* 2000).

Outras frutossiltransferases estão envolvidas na biossíntese de outras séries:

- Sacarose: frutano 6 frutossiltransferase (6-SFT, EC 2.4.1.10) é a enzima mais bem caracterizada, responsável pelas ligações $\beta(2,6)$ nos frutanos do tipo levano e levanos ramificados. Esta enzima catalisa a transferência da unidade de frutose da sacarose para uma ampla variedade de receptores incluindo a sacarose, 1-cestose e 6-cestose, produzindo respectivamente 6-cestose, bifurcose ou frutanos maiores $\beta(2,6)$ ligados (Duchateau *et al.* 1995, Wei *et al.* 2002).

- Frutano: frutano 6G frutossiltransferase (6^G -FFT, EC 2.4.1.243) é a enzima envolvida na biossíntese da neosérie, que catalisa a transferência da unidade de frutose de um frutano para o carbono 6 da unidade de glucose da sacarose, formando o trissacarídeo neocestose, ou para a unidade de glucose de outro frutano (Shiomi 1989, Lasseur *et al.* 2006). A molécula é em seguida alongada com ligações β (2,1) ou β (2,6), produzindo futanos da neosérie de inulina ou da neosérie de levano, respectivamente.

A degradação de futanos em frutose e sacarose ocorre pela remoção sequencial das unidades terminais de frutose pela ação da frutano exohidrolase (FEH). Dois tipos principais de FEHs podem ser distinguidos, dependendo do tipo de ligação que esta hidrolisa: a 1-frutano exohidrolase (1-FEH, EC 3.2.1.153) que atua sobre ligações β (2,1) e a 6-frutano exohidrolase (6-FEH, EC 3.2.1.154) que atua sobre ligações β (2,6). Entretanto, uma FEH que hidrolisa ambas ligações β (2,1) e β (2,6) foi purificada de *H. vulgare* (Henson & Livingston 1998) enquanto FEHs que hidrolisam preferencialmente ligações β (2,6) foram purificadas de *Avena sativa* (Henson & Livingston 1996) e de *T. aestivum* (Kawakami *et al.* 2005). Adicionalmente, a presença de isoformas de FEH atuando na mobilização de futanos foi reportada para diferentes espécies, como exemplificado para *H. tuberosus* (Edelman & Jefford 1964), *C. intybus* (Claessens *et al.* 1990, Van den Ende *et al.* 2002), *Lolium rigidum* Gaud (Bonnett & Simpson 1993), *T. aestivum* (Van den Ende *et al.* 2003, Van den Ende *et al.* 2005, Van Riet *et al.* 2006) e *V. herbacea* (Asega *et al.* 2004).

Além do seu papel na degradação de futanos durante a mobilização, as FEHs podem também estar envolvidas na biossíntese de 6-cestose a partir da hidrólise da bifurcose (Bancal *et al.* 1992) ou podem ser ativadas durante a biossíntese de graminanos de cevada (Henson 1989, Bancal *et al.* 1991) e de trigo (Van den Ende 2003) estando envolvidas no recorte deste tipo de frutano ramificado.

O tamanho do polímero de frutose armazenado em órgãos de reserva varia entre as espécies. As variações nos comprimentos de cadeia dos polímeros de inulina em diferentes espécies de Asteraceae poderiam ser: a) o resultado de características enzimáticas diferentes de 1-FFTs e/ou b) o resultado de diferenças na atividade da FEH que definem o comprimento da inulina característico de uma dada espécie (Itaya *et al.* 2002, Van den Ende *et al.* 2003). Uma vez que a composição de futanos pode variar dependendo do estágio de desenvolvimento dos órgãos das plantas, bem como de

fatores ambientais, a expressão tempo-específico das enzimas ou isoenzimas poderia também ser responsável pelo comprimento do polímero (Hellwege *et al.* 1998).

3.1. Enzimas do metabolismo de frutanos em Asteraceae do cerrado

Vernonia herbacea

A variação no perfil de frutanos observada ao longo do ciclo fenológico em rizóforos de *V. herbacea* ocorreu concomitantemente às mudanças nas atividades das enzimas do metabolismo de frutanos durante o ciclo. A atividade de 1-FEH foi elevada somente durante a brotação, na primavera, enquanto em outras fases fenológicas a atividade desta enzima foi muito baixa. Resultados similares foram reportados para *T. officinale* (Rutherford & Deacon 1974), *C. intybus* (Van den Ende & Van Laere 1996) e *H. tuberosus* (Marx *et al.* 1997) e são consistentes com a necessidade de mobilização de carboidratos estocados para o crescimento na primavera.

Aumento na atividade da 1-FEH em *V. herbacea* durante a brotação e crescimento foi confirmado quando a brotação foi induzida pela excisão dos ramos aéreos (Asega & Carvalho 2004) (figura 3). Este aumento ocorreu concomitantemente ao alongamento dos novos ramos, indicando que a atividade de hidrólise de frutanos está associada não somente com a brotação, mas também com o crescimento dos ramos. Um declínio na atividade de 1-SST precedeu o aumento da atividade de 1-FEH e parece estar associado com a interrupção de translocação de fotoassimilados para os rizóforos. Este resultado indica que a atividade de 1-SST depende de um fluxo constante de fotoassimilados para o local principal da síntese de frutanos. A atividade de 1-FFT esteve sempre presente, embora tenha mostrado uma diminuição durante o período analisado. A atividade contínua de 1-FFT, entretanto é uma indicação de que esta enzima atua diminuindo o tamanho da cadeia durante a mobilização, favorecendo a subsequente atividade de 1-FEH.

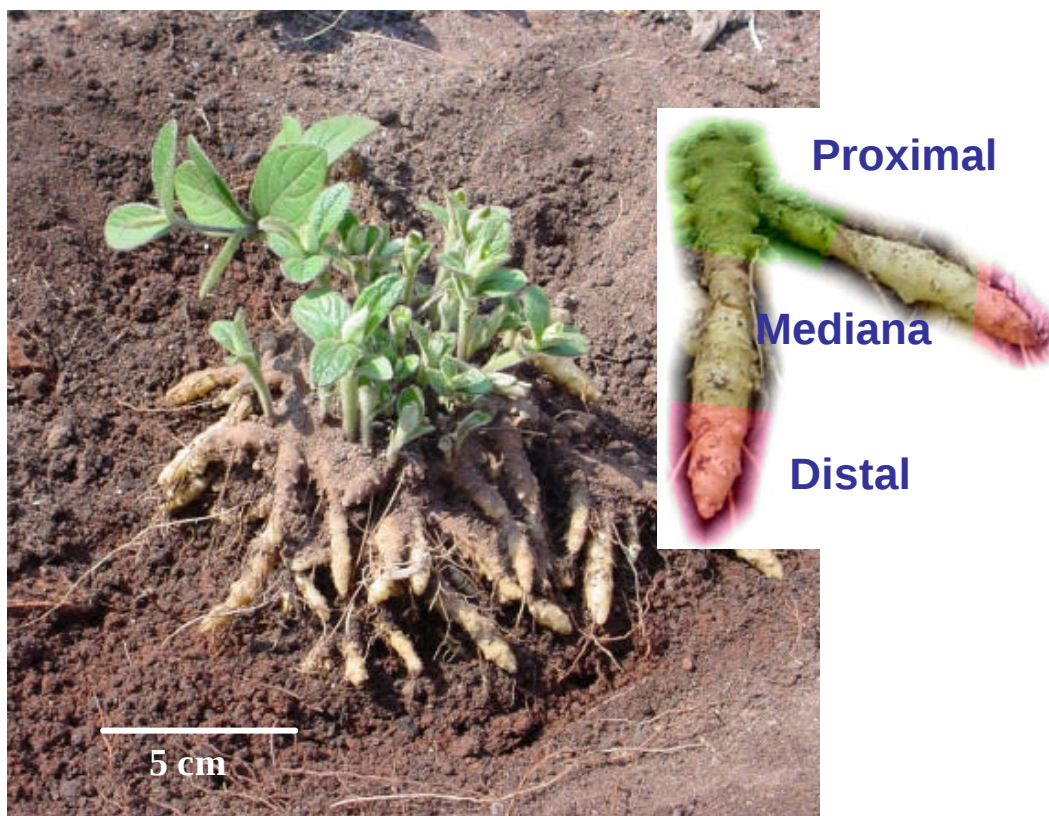


Figura 3. Aspecto geral de planta de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby após 20 dias de excisão dos ramos aéreos, período no qual foi detectado o aumento da atividade de 1-FEH nos rizóforos da planta. Em destaque são apresentadas as regiões proximal, mediana e distal do rizóforo de *Vernonia herbacea*.

Um grande aumento na atividade de 1-FEH, acompanhado de uma diminuição nos níveis de frutanos, como observado em *V. herbacea* após a excisão dos ramos aéreos, também foi detectado em raízes de yacon (*Polymnia sonchifolia* Poep&Endl) após a ocorrência de ventos fortes que causaram sérios danos ao aparato fotossintético das plantas (Fukai *et al.* 1997). Um aumento na atividade de 1-FEH e uma diminuição da atividade de 1-SST foram também detectados em plantas jovens de chicória que foram submetidas à desfolhação (*C. intybus*) (De Roover *et al.* 1999). Os autores sugeriram que, como as mudanças nas atividades destas enzimas foram em direções opostas, um mesmo efector regularia os genes que codificam estas duas enzimas, de maneiras opostas: um repentino aumento de sacarose poderia induzir o gene da 1-SST e inibir o gene da 1-FEH.

A mobilização de frutanos pela ação da 1-FEH em espécies tropicais, como exemplificado por *V. herbacea*, é similar àquela verificada para espécies de Asteraceae

acumuladoras de frutanos de regiões temperadas, levando-se em consideração as diferentes condições climáticas. A mobilização de frutanos pela ação da 1-FEH está associada com a brotação e crescimento inicial do caule após a excisão dos ramos, confirmando o modelo descrito para outras Asteraceae e algumas Poaceae. Foi sugerido também que em *V. herbacea* a 1-FFT esteja envolvida na mobilização em resposta ao aumento da demanda de energia da planta.

Informações adicionais a respeito do metabolismo de frutanos em *V. herbacea* referem-se à distribuição espacial de frutanos e das enzimas do seu metabolismo nos rizóforos.

O rizóforo de *V. herbacea* é um sistema caulinar subterrâneo (Hayashi & Appezzato-da-Glória 2005) com crescimento geotrópico positivo, sendo o ápice (região distal) a região que apresenta os tecidos mais jovens. A brotação de ramos aéreos ocorre pelo desenvolvimento de gemas localizadas no extremo oposto do rizóforo, na região proximal.

O conteúdo de frutanos e as atividades enzimáticas foram analisados nas regiões distal, mediana e proximal dos rizóforos de plantas em diferentes fases fenológicas (Portes & Carvalho 2006). Os resultados mostraram uma distribuição espaço-temporal das atividades de 1-SST, 1-FFT, invertase e 1-FEH com um gradiente decrescente de atividade biossintética da região distal para região proximal do rizóforo durante a fase vegetativa e um gradiente crescente de atividade de despolimerização no sentido distal-proximal do rizóforo na fase de brotação. A atividade de 1-SST foi praticamente ausente nas fases de brotação e dormência, enquanto a atividade de 1-FEH ocorreu principalmente em plantas induzidas à brotação. A atividade de 1-FFT foi verificada em todas as fases fenológicas e nas três regiões do rizóforo e o padrão principal de distribuição espacial desta atividade ao longo do eixo do rizóforo foi geralmente similar ao observado para a 1-SST.

O conteúdo e a composição de frutanos variaram ao longo do eixo do rizóforo e nas fases de desenvolvimento. Altas concentrações de fruto-oligossacarídeos na região distal, detectadas em todas as fases fenológicas, com exceção da fase de brotação, caracterizam estes tecidos como ativos para a síntese de frutanos e corroboram a atividade elevada de 1-SST encontrada nesta região durante a maior parte do ciclo de desenvolvimento da planta. O comprimento da cadeia de frutanos também variou; o tamanho médio aumentou gradualmente dos tecidos jovens da região distal (7,4 kDa) em direção aos tecidos velhos da região proximal (9,6 kDa) do rizóforo. Em relação às

fases de desenvolvimento, a massa molecular média foi discretamente superior na brotação induzida e na dormência (Portes & Carvalho 2006).

Viguiera discolor

Em *V. discolor*, a excisão dos órgãos aéreos também resultou em aumento na atividade da 1-FEH nas raízes tuberosas acompanhando a brotação. Surpreendentemente, esta enzima foi mais ativa sobre frutanos de baixa massa molecular do que sobre a inulina de alto GP extraída da própria planta (Degasperi *et al.* 2003). Com relação à afinidade pelo substrato, a preferência desta enzima por fruto-oligossacarídeos não difere das outras 1-FEHs de Asteraceae.

Itaya *et al.* (1999) verificaram que a biossíntese de frutanos nestas plantas ocorre principalmente no início da dormência, em raízes tuberosas em crescimento, e diminui durante a brotação. Extratos enzimáticos de raízes tuberosas permaneceram estáveis por pelo menos duas semanas durante a incubação com 1-cestose e nistose, o tri- e o tetrassacarídeo da série de inulina, respectivamente, catalisando a produção *in vitro* de fruto-oligossacarídeos e -polissacarídeos com GP de 16 e 70 (Itaya *et al.* 1997). Estes resultados demonstram a importância da seleção do material em uma fase de desenvolvimento específica para se avaliar a capacidade do aparato enzimático da planta em sintetizar *in vitro* o perfil e o tamanho predominante de frutanos encontrados *in vivo*.

A presença de frutanos com GP elevado em algumas espécies de Asteraceae tem sido atribuída às propriedades das suas 1-FFTs. A inulina armazenada nas raízes tuberosas de *C. intybus* e nos tubérculos de *H. tuberosus* apresentam um GP médio de 10 enquanto as de *Echinops ritro* L. e *C. scolymus* apresentam um GP médio de 30 e 65, respectivamente (Hellwege *et al.* 1998, Hellwege *et al.* 2000, Vergauwen *et al.* 2003). Hellwege *et al.* (1998) sugeriram que as diferenças nos tamanhos das cadeias de frutanos, como exemplificado por estudos com *H. tuberosus* e *C. scolymus*, são dependentes da afinidade da 1-FFT aos substratos 1-cestose e nistose. Para a 1-FFT de *H. tuberosus*, a preferência é por frutanos com GP baixo enquanto para a 1-FFT de *C. scolymus* a preferência é por GP elevado. Semelhantemente, a inulina com GP elevado encontrada em *E. ritro* pode ser atribuída à presença de uma 1-FFT capaz de sintetizar frutanos com GP elevado, que apresenta maior afinidade por inulina de cadeias longas como substrato receptor, em comparação com a 1-FFT de *C. intybus* que produz

frutanos de GP baixo e apresenta maior afinidade pela sacarose, frutose e pela 1-cestose como substratos receptores (Vergauwen *et al.* 2003).

Em *V. discolor*, o GP médio de frutanos acumulados nas raízes tuberosas varia entre 130 na fase de floração e 170 no final da dormência (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993). O cDNA que codifica a 1-FFT de *V. discolor* foi clonado e a sua expressão em sistema heterólogo foi realizada utilizando-se *Pichia pastoris* como o organismo hospedeiro de expressão. Após a incubação com 1-cestose e com uma mistura de oligo-inulina (Neosugar), a enzima recombinante produziu *in vitro* a inulina com GP elevado similar ao produzido *in vivo*. Foi demonstrada ausência das atividades de invertase e 1-SST pela enzima recombinante que, por outro lado, apresentou maior afinidade por GP = 6 do que por sacarose ou por fruto-oligossacarídeos com GP baixo (Van den Ende *et al.* 2005). O cDNA da 1-FFT de *V. discolor* (tribo Heliantheae), que sintetiza frutanos de GP elevado, apresenta 76% de identidade com a 1-FFT de *C. intybus* (tribo Cichorieae), que sintetiza frutanos com GP baixo, e com a 1-FFT de *E. ritro* (tribo Cardueae), que sintetiza frutanos com GP elevado. A identidade de 87% com a 1-FFT de *H. tuberosus*, (tribo Heliantheae), que sintetiza frutanos com GP baixo, é consideravelmente alta. Considerando-se apenas a sequência que codifica a proteína madura, a identidade da 1-FFT de *V. discolor* com a sequência da 1-FFT de *H. tuberosus* aumentou para 90%. Por esta razão, a maior identidade foi encontrada entre as 1-FFTs das espécies que pertencem à mesma tribo, porém com diferente predominância de tamanhos de frutanos.

4. PAPEL FISIOLÓGICO NA TOLERÂNCIA À SECA

O papel dos frutanos na tolerância ao frio e à seca vem sendo estudado por vários autores (Pontis & Del Campillo 1985, Puebla *et al.* 1997, Konstantinova *et al.* 2002). Foi sugerido que os frutanos atuam como reguladores osmóticos (Spollen & Nelson 1994). Segundo Hendry and Wallace (1993), as teorias de sobrevivência a baixas temperaturas e regulação osmótica se unem em um único aspecto, o crescimento sazonal das plantas. Como já mencionado, as espécies que contém frutanos são mais abundantes em regiões onde o crescimento ocorre primordialmente em certas fases do ciclo anual da planta, por exemplo, em regiões que apresentam regime sazonal de chuvas. Plantas acumuladoras de frutanos crescem em regiões áridas e muito quentes do México, como por exemplo, *Agave* spp. (Agavaceae) (Mancilla-Margalli & Lopez

2006) e em regiões muito frias da Antártica, como por exemplo, *Deschampsia Antarctica* Desv. (Poaceae) e *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl (Cariophyllaceae), as duas únicas angiospermas que colonizaram as ilhas Antárticas (Bravo *et al.* 2001).

O envolvimento dos frutanos na tolerância à seca foi evidenciado por experimentos com plantas transgênicas que demonstraram a capacidade das plantas de tabaco de sintetizarem frutanos do tipo levano. Essas plantas tiveram a tolerância à seca intensificada quando comparadas com as plantas selvagens (Pilon-Smits *et al.* 1995, Pilon-Smits *et al.* 1999). As membranas são as primeiras afetadas pelo efeito do congelamento e da dessecação, causando injúria nas células. Foi sugerido que os frutanos atuam na estabilização das membranas sob essas condições estressantes (Demel *et al.* 1998). Posteriormente, Vereyken *et al.* (2001) revelaram que tanto o levano quanto a inulina interagiram com as membranas compostas de fosfolipídeos, o que apoia a hipótese de que os frutanos atuam na proteção das membranas durante o período de seca em plantas.

A ampla ocorrência da flora acumuladora de frutanos na região do cerrado aliada ao fato de que estas plantas atravessam períodos de seca durante seu ciclo anual de desenvolvimento reforça a hipótese de que os frutanos atuam na tolerância à seca. A estação seca no cerrado tem a duração de pelo menos três meses e coincide com as baixas temperaturas, características do inverno. Experimentos de suspensão de rega com *V. herbacea* mostraram que o déficit hídrico está associado a mudanças no crescimento da planta e ao metabolismo de frutanos. Foram verificados em plantas submetidas a diferentes frequências de regas a redução da área e do número de folhas e o aumento da frutose livre e da sacarose (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004). Segundo esses autores, enquanto o conteúdo de água no solo diminui, o conteúdo de água dos rizóforos permanece praticamente inalterado nos primeiros 30 dias de suspensão de rega, devido, pelo menos em parte, à diminuição do potencial hídrico. Após 30 dias de suspensão de rega, as plantas apresentaram os maiores conteúdos de fruto-oligossacarídeos e -polissacarídeos. Estudos mais recentes sobre a suspensão de rega em *V. herbacea* mostraram que aumentos nas atividades da 1-SST e 1-FFT no início do período de seca contribuíram para o aumento no conteúdo de frutanos, enquanto o aumento da frutose livre detectado ao final do período de seca foi atribuído ao aumento da atividade de 1-FEH (Carvalho, dados não publicados).

Considerando-se a distribuição geográfica da flora acumuladora de frutanos e os resultados experimentais obtidos até o presente pode-se atribuir aos frutanos a tolerância

à seca. Entretanto, uma associação direta não pode ser feita entre este papel ecofisiológico e o comprimento do polímero de frutano. Plantas de *E. ritro*, *C. scolymus* e *V. discolor* são até o presente as únicas asteráceas nas quais foi detectada a enzima 1-FFT capaz de sintetizar polímeros de frutanos com GP elevado. Contudo, as espécies acumuladoras de inulina com GP baixo, como *V. herbacea*, e com GP elevado, como *V. discolor*, co-existem na vegetação do cerrado (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro 2001). As duas espécies estão submetidas aos mesmos fatores de estresses, necessitam igualmente superar a deficiência hídrica a que estão sujeitas durante parte do seu ciclo de vida.

5. PRODUTIVIDADE E USO POTENCIAL DOS FRUTANOS DA FLORA DO CERRADO

Os frutanos são considerados compostos pré-bióticos uma vez que promovem um crescimento seletivo de bactérias no cólon, como lactobacilos e bifidobactérias (Cummings *et al.* 2001). Devido à configuração β do C₂ anomérico das unidades de frutose que constituem o frutanos, os frutanos do tipo inulina resistem à hidrólise pelas enzimas digestivas intestinais, sendo classificados como carboidratos não digeríveis e assim considerados fibras dietéticas. Os frutanos podem também estimular a absorção de cálcio, além de atuarem, possivelmente, na prevenção do câncer de cólon (Roberfroid 2005).

Desta forma, há um interesse crescente no uso de frutanos como ingrediente alimentar, sendo indicado como alternativa para adoçantes de baixa caloria, fibras dietéticas e substituto de gorduras (Ritsema & Smeekens 2003).

Atualmente, o frutano usado na indústria é principalmente a inulina de GP baixo extraída de raízes de *C. intybus*. A desvantagem destes oligossacarídeos de GP baixo é a sua rápida fermentação na região proximal do cólon, estimulando o crescimento de bactérias benéficas nesta região. O uso de inulinas de GP elevado, que são degradadas lentamente, como aditivo alimentar, permitiria uma função benéfica ao longo de todo o comprimento do cólon (Roberfroid 2005). Com relação às inulinas de GP elevado, a enzima recombinante 1-FFT de *V. discolor* capaz de sintetizar frutanos de GP elevado (Van den Ende *et al.* 2005) apresentaria vantagens na aplicação biotecnológica, com vistas à produção dessas inulinas para o uso nas indústrias alimentícia e outras. A introdução do gene da 1-FFT de *V. discolor* em plantas de *C. intybus* ou em outra planta

do cerrado, como, por exemplo, *V. herbacea*, seria uma ótima alternativa para a produção de inulina de GP elevado.

Uma alternativa adicional para a produção de frutanos de GP elevado de *V. discolor* é a propagação *in vitro* (Itaya *et al.* 2005). Plantas de *V. discolor* propagadas *in vitro* e calos originados de nós caulinares destas plantas apresentaram razão 1-SST/1-FFT < 1, o que indica intensa atividade de síntese, e produziram frutanos do tipo inulina de GP elevado semelhantes aos encontrados em plantas crescidas em condições ambientais naturais, porém em baixas concentrações. Este problema poderia ser solucionado por meio de melhoramento das condições de cultura.

Outro uso importante da inulina é a sua aplicação na determinação da função renal em seres humanos e animais de laboratório (Brenner *et al.* 1986). Quando devidamente preparada, a inulina é fisiologicamente inerte e não tóxica. A avaliação da taxa de filtração glomerular em ratos Wistar machos, usando inulina de *V. herbacea* mostrou que seu desempenho é similar ao da inulina comercial de Dahlia (Sigma) comumente utilizada para este fim (Dias-Tagliacozzo *et al.* 1996).

Assim, *V. herbacea* é outra espécie com potencial tecnológico para a produção de inulina, embora não seja ainda uma espécie cultivada. Aspectos da nutrição mineral, do crescimento da planta e da alocação de biomassa foram investigados com o objetivo de aumentar a biomassa do rizóforo e a produção de inulina (Teixeira *et al.* 1997, Carvalho *et al.* 1998, Cuzzuol *et al.* 2003, Cuzzuol *et al.* 2005). Carvalho *et al.* (1997) mostraram que plantas de *V. herbacea* cultivadas por dois anos consecutivos apresentaram rizóforos novos já nos primeiros seis meses de crescimento com aproximadamente 40% da massa seca de frutano.

No primeiro experimento de produção em campo, utilizando uma área do cerrado, a produção de inulina por plantas de *V. herbacea* atingiu 0,522 ton ha⁻¹ após dois anos de cultivo (Carvalho *et al.* 1998). No segundo, plantas com seis meses de idade tratadas com nitrogênio nas concentrações de 0 a 24 kg N ha⁻¹ apresentaram concentração baixa de frutanos e aumento em altura, área foliar, massa seca dos órgãos aéreos e dos rizóforos relacionados com o aumento da concentração de nitrogênio. Em plantas com doze meses tratadas com nitrogênio nas concentrações entre 6 e 12 kg N ha⁻¹, o crescimento foi estimulado enquanto a produção de frutanos aumentou somente sob tratamento com 24 kg N ha⁻¹. Nestas plantas, verificou-se um aumento de 70% na produção de inulina, sem que mudanças no perfil dos frutanos fossem detectadas, e com uma estimativa de produção de 0,5 ton ha⁻¹ (Cuzzuol *et al.* 2003), semelhante à

produção obtida no primeiro experimento em plantas após dois anos de cultivo. Portanto, a aplicação de 24 kg N ha⁻¹ foi efetiva na produção de frutanos em plantas de *V. herbacea*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a inulina produzida para fins comerciais é obtida, principalmente, de raízes de *C. intybus*. O cerrado brasileiro e sua vasta diversidade de espécies acumuladoras de frutanos seria uma alternativa para a produção de inulina. Embora as plantas de cerrado sejam adaptadas aos solos oligotróficos, seu crescimento e produtividade podem ser estimulados por aplicação de nutrientes minerais. A produção de inulina de GP elevado pode ser obtida pelo uso da enzima recombinante 1-FFT de *V. discolor* e por cultivo *in vitro* dessas plantas, que representam alternativas promissoras em termos de aplicação biotecnológica.

O uso da inulina de plantas do cerrado brasileiro pode ser ampliado, se considerarmos a utilização de microorganismos capazes de produzir inulinases extracelulares, que são associados à flora que contém frutanos, (Figueiredo-Ribeiro *et al.* no prelo). A atividade elevada destas enzimas e o conteúdo elevado de inulina em órgãos subterrâneos de reserva em espécies do cerrado são fontes potenciais para a produção comercial de frutose livre e de outros derivados de inulina. Do ponto de vista fisiológico, o estudo do metabolismo de frutanos da flora do cerrado pode contribuir para a elucidação do papel ecofisiológico na adaptação das plantas à seca.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asega, A.F. & Carvalho, M.A.M. (2004). Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. Plant Physiology and Biochemistry 42: 313- 319.
- Asega, A.F., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Carvalho, M.A.M. (2004). Is fructan hydrolysis in *Vernonia herbacea* orchestrated by an FEH complex? Fifth International Fructan Symposium, Abstracts p. 88. Havana, Cuba.

- Bancal, P., Carpita, N. C. & Gaudillere, J. P.** (1992). Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis *New Phytologist* 120: 313-321.
- Bancal, P., Henson, C.A., Gaudillère, J.P. & Carpita, N.C.** (1991). Fructan chemical structure and sensitivity to an exohydrolase. *Carbohydrate Research* 217: 137-151.
- Bonnett, G. D. & Simpson, R. J.** (1993). Fructan-hydrolizing activities from *Lolium rigidum* Gaudin. *New Phytologist* 123: 443-451.
- Bravo, L.A., Ulloa, N., Zuñiga, E., Casanova, A., Corcuera, L.J. & Alberdi, M.** (2001). Cold resistance in Antarctic angiosperms. *Physiologia Plantarum* 111: 55-65.
- Brenner, B. M., Dworkin, L.D. & Ichikawa, I.** (1986). Glomerular ultrafiltration. In M.D. Brenner, C. Floyd & M.D. Rector(eds.). *The Kidney*, WB Saunders, Philadelphia, pp. 124-144.
- Cairns, A.J.** (2003). Fructan biosynthesis in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 549-567.
- Cairns, A.J., Pollock, C.J., Gallagher, J.A. & Harrison, J.** (2000). Fructans: Synthesis and Regulation. In R.C. Leegood, T.D. Sharkey, and S. von Caemmerer (eds.). *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 301-320.
- Carpita, N.C., Keller, F., Gibeaut, D.M., Housley, T.L. & Matile, P.** (1991). Synthesis of inulin oligomers in tissue slices, protoplasts and intact vacuoles of Jerusalem artichoke. *Journal of Plant Physiology* 138: 204-210.
- Carvalho, M. A.M., & Dietrich, S. M.** (1993). Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (2001). Frutanos: ocorrência, estrutura e utilização, com ênfase em plantas do cerrado brasileiro. In F.M. Lajolo, F. Saura-Calixto, E. Wittig de Penna, & E.W. Menezes (eds). *Fibra dietética em Iberoamérica: Tecnología y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos*. Projeto CYTED XI.6, Editora Varela, São Paulo, pp. 77-89.
- Carvalho, M.A.M., Pinto, M.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (1998). Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21: 281-287.

- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C.** (1997). Growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. *New Phytologist* 136: 153-161.
- Chalmers, J., Lidgett, A., Cummings, N., Cao, Y., Forster, J. & Spangenberg, G.** (2005). Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. *Plant Biotechnology Journal* 3: 459-474.
- Claessens, G., Van Laere, A. & De Proft, M.** (1990). Purification and properties of an inulase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology* 136: 35-39.
- Coutinho, L.M.** (2002). Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. A. L. Klein (Org), Unesp/Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, 77.
- Cummings, J.H., Macfarlane, G.T. & Englyst, H.N.** (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 415-420.
- Cuzzuol, G.R.F., Carvalho, M.A.M., & Zaidan, L.B.P.** (2005). Growth, photosynthate partitioning and fructan accumulation in plants of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby under two nitrogen levels. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 401-410.
- Cuzzuol, G.R.F., Carvalho, M.A.M., Barbedo, C.J. & Zaidan, L.B.P.** (2003). Crescimento e conteúdo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas à adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 81-91.
- Degasperi, M.I., Itaya, N.M., Buckeridge, M.S. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (2003). Fructan degradation and hydrolytic activity in tuberous roots of *Viguiera discolor* (Baker) (Asteraceae), an herbaceous species from the cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 11-21.
- Demel, R. A., Dorrepaal, E., Ebskamp, M.J.M., Smeekens, J. C. M. & de Kruijff, B.** 1998, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1375: 36-42.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Dietrich, S.M.C. & Mello-Aires, M.** (1996). Measurement of glomerular filtration rate using inulin prepared from *Vernonia herbacea*, a brazilian native species. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29: 1393-1396.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Itaya, M.A.M., Carvalho, M.A.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Dietrich, S.M.C.** (2004). Fructans and water suppression on intact and

fragmented rhizophores of *Vernonia herbacea*. Brazilian Archives of Biological Technology 47:363-373.

Duchateau, N., Bortlik, K., Simmen, U., Wiemken, A. & Bancal, P. (1995). Sucrose: fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme for diverting carbon from sucrose to fructan in barley leaves. Plant Physiology 107: 1249-1255.

Edelman, J. & Jefford, T. G. (1968). The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. New Phytologist 67: 517-531.

Edelman, J. & Jefford, T. G. (1964) The mechanism of fructose polymers in plants. 4. β -fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. Biochemical Journal 93: 148-161.

Eiten, G. (1972). The cerrado vegetation of Brazil. Botanical Review 38: 201-341.

Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Pessoni, R.B. & Braga, M.R. Inulinases produced by microbes from the Brazilian cerrado: characterization and potential uses. In N. Shiomi (ed.). Advances in fructooligosaccharides research (no prelo).

Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Dietrich, S.M.C., Chu, E.P., Carvalho, M.A.M., Vieira, C.C.J. & Graziano, T.T. (1986). Reserve carbohydrate in underground organs of native brazilian plants. Revista Brasileira de Botânica 9: 159-166.

Fukai, K., Ohno, S., Goto, K., Nanjo, F. & Hara, Y. (1997). Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Soil Science of Plant Nutrition 43: 171-177.

Hayashi, A.H. & Appezzato-Da-Gloria B. (2005). The origin and anatomy of rhizophores in *Vernonia herbacea* and *V. platensis* (Asteraceae) from the Brazilian Cerrado. Australian Journal of Botany 53: 273-279.

Hellwege, E. M., Czapla, S., Jahnke, A., Willmitzer, L. & Heyer, G. (2000). Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesise the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. PNAS, 97: 8699-8704.

Hellwege, E.M., Raap, M., Gritscher, D., Willmitzer, L. & Heyer, G. (1998). Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflect in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. FEBS Letters 427: 25-28.

Hendry, G. A. F. (1993). Evolutionary origins and natural fractions of fructans: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. New Phytologist 123: 3-14.

- Hendry, G.A.F. & Wallace, R.K.** (1993). The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In M. Suzuki & N.J.Chatterton (eds.). Science and Technology of Fructans, CRC Press, Boca Raton, pp. 119-139.
- Henson, C. A.** (1989). Purification and properties of barley stem fructan exohydrolase. Journal of Plant Physiology 134: 186-191.
- Henson, C.A. & Livingston, D.P.** (1996). Purification and characterization of an oat fructan exohydrolase that preferentially hydrolyzes β -2,6-fructans. Plant Physiology 110: 639-644.
- Henson, C.A. & Livingston, D.P.** (1998). Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolyzes multiple fructofuranosidic linkages. Plant Physiology and Biochemistry 36: 715-720.
- Isejima, E.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.** (1993). Fructan variations in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae): the influence of phenology. Plant and Cell Physiology 34: 723-727.
- Isejima, E.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C. L. & Zaidan, L.B.P.** (1991). Fructan composition in adventitious tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by daylength. New Phytologist 119: 149-154.
- Itaya, N.M., Buckeridge, M.S. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (1997). Biosynthesis in vitro of high molecular mass fructan by cell-free extracts from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). New Phytologist 136: 53-60.
- Itaya, N.M., Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (2002). Fructosyl transferase and hydrolase activities in rhizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). Physiologia Plantarum 116: 451-459.
- Itaya, N.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Buckeridge, M.S.** (1999). Synthesis of fructans by fructosyltransferase from the tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). Brazilian Journal of Medical and Biological Research 32: 435-442.
- Itaya, N.M., Vaz, A.P.A., Kerbaux, G.B. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (2005). Produção de frutanos em calos e plântulas clonadas in vitro de *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae). Acta Botanica Brasiliense 19: 579-586.
- Kawakami, A., Yoshida, M. & Van Den Ende, W.** (2005). Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum*) preferentially degrading small graminans like bifurcose. Gene, 358: 93-101.

- Konstantinova, T., Parvanova, D., Atanasov, A. & Djilianov, D.** (2002). Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science* 163: 157-164.
- Koops, A.J. & Jonker, H.H.** (1996). Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II. 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* 110: 1167-1175.
- Lasseur, B., Lothier, J., Djoumad, A., De Coninck, B., Smeekens, S., Van Laere, A., Morvan-Bertrand, A., Van den Ende, W. & Prud'homme, M.P.** (2006). Molecular and functional characterization of a cDNA encoding fructan: fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT)/fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal of Experimental Botany* 57: 2719-2734.
- Livingsgton, D.P., Chatterton, N.J. & Harrison, P.A.** (1993). Structure and quantify of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.) *New Phytologist* 123: 725-734.
- Lüscher, M., Erdin, C., Sprenger, N., Hochstrasser, U., Boller, T. & Wimken, A.** (1996). Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Letters* 385: 39-42.
- Mancilla-Margalli, N. A., & Lopez, M.G.** (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7832-7839.
- Mantovani, W. & Martins, F.R.** (1988). Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 11: 101-112.
- Marx, S.P., Nosberger, J. & Frehner, M.** (1997). 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* 135: 267-277.
- Moraes, M.G, Chatterton, N.J. Harrison, P.A. & Figueiredo-Ribeiro RCL.** (2001). Distribution of non-structural carbohydrates in native grasses from the cerrado. In 8º Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal. Ilhéus, Ba, Brasil. Resumos p. 191.

- Pilon-Smits, E.A.H., Ebskamp, M.J.M., Paul, M.J., Jeuken, M.J.W., Weisbeek, P.J. & Smeekens, S.C.M.** (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* 107: 125-130.
- Pilon-Smits, E.A.H., Terry, N., Sears, T. & Van Dun, K.** (1999). Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 313-317.
- Pollard, C.J. & Amuti, K.S.** (1981). Fructose oligosaccharides, possible markers of phylogenetic relationships among dicotyledonous plant families. *Biochemical and Systematic Ecology* 9: 69-78.
- Pollock, C.J. & Chatterton, N.J.** (1988). Fructans. In J. Preiss (ed.). *The Biochemistry of Plants – A comprehensive Treatise*. Vol. 14. Carbohydrates: Structure and function, Academic Press, New York, pp. 109-140.
- Pollock, C. J., Cairns, A.J., Sims, I.M. & Housley, T.L.** (1996). Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. In E. Zamski and A.A. Shaffer (eds). *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops : Source - Sink Relationships*, A.A. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 97-113.
- Pontis, H.G. & Del Campillo, E.** (1985). Fructans. In P.M. Dey & R.A. Dixon (eds). *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*, Academic Press, New York, pp. 205-226.
- Portes, M.T. & Carvalho, M.A.M.** (2006). Spatial distribution of fructans and fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby in different developmental phases. *Plant Science* 170: 624-633.
- Puebla, A.F., Salerno, G.L. & Pontis, H.G.** (1997). Fructan metabolism in two species of *Bromus* subjected to chilling and water stress. *New Phytologist* 136: 123-129.
- Ritsema, T. & Smeekens, S.** (2003). Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 223-230.
- Roberfroid, M.B.** (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition* 93: 13-25.
- Roover, J.D., Van Laere, A., Winter, M.D., Timmermans, J.W. & Van den Ende, W.** (1999). Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiologia Plantarum* 106: 28-34.
- Rutherford, P.P & Deacon, A.C.** (1974). Seasonal variation in dandelion roots of fructosan composition, metabolism and response to treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Annals of Botany* 38: 251-260.

- Sévenier, R., Hall, R. D., van der Meer, I. M., Hakkert, H. J. C., van Tunen, A. J. & Koops, A. J.** (1998). High level fructan accumulation in transgenic sugar beet. *Nature Biotechnology* 16: 843-846.
- Shiomi, N.** (1989). Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructans in Liliaceous plants. *Journal of Plant Physiology* 134: 151-155.
- Shiomi, N., Onodera, S., Vieira, C.C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (1996). Structure of fructan polymers from tuberous roots of *Gomphrena macrocephala* (Amaranthaceae) from the cerrado. *New Phytologist* 133: 643-650.
- Spollen, W.G. & Nelson, C.J.** (1994). Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* 106: 329-336.
- Teixeira, P.G., Carvalho, M. A. M., Zaidan, L.B.P. & Klein, A.L.** (1997). Effect of mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea* *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 9: 89-96.
- Tertuliano, M.F. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (1993). Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. *New Phytologist* 123: 741-749.
- Van den Ende, W. & Van Laere, A.** (1996). Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. *Journal of Plant Physiology* 149: 43-50.
- Van den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J. & Van Laere, A.** (2002). Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal* 2: 1273-1287.
- Van den Ende, W., Van Laere, A., Le Roy, K., Vergauwen, R., Boogaerts, D., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Carvalho, M.A.M.** (2005b). Molecular cloning and characterization of a high DP fructan: fructan 1-fructosyl transferase from *Viguiera discolor* (Asteraceae) and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Physiologia Plantarum* 125: 419-429.
- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Van Riet, L., Van Laere, A., Yoshida, M. & Kawakami, A.** (2003). Fructan 1-exohydrolases. β -(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiology* 131: 621-631.

- Van den Ende, W., Yoshida, M., Clerens, S., Vergauwen, R. & Kawakami, A.** (2005a). Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum* L.). *New Phytologist* 166: 917-932.
- Van Riet, L., Nagaraj, V., Van den Ende, W., Clerens, S., Wiemken, A. & Van Laere, A.** (2006). Purification, cloning and functional characterization of an fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 57: 213-223.
- Vereyken, I.J., Chupin, V., Demel, R.A., Smeekens, S.C.M., & De Kruijff, B.** 2001, Fructans insert between the headgroups of phospholipids *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, 1510, 307-320.
- Vergauwen, R., Van Laere, A. & Van Den Ende, W.** (2003). Properties of fructan: fructan 1-fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two asteracean plants storing greatly different types of inulin. *Plant Physiologia* 133: 391-401.
- Vieira, C.C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (1993). Fructose- containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae) at different phonological phases. *Plant and Cell Environmental* 16: 919-928.
- Wei, J.Z., Chatterton, N.J., Harrison, P. A., Wang, R.R.C. & Larson, S.R.** (2002). Characterization of fructan biosynthesis in big bluegrass (*Poa secunda*). *Journal of Plant Physiology* 159: 705-715.

CAPÍTULO II

**Purificação parcial de 1-FEHs de plantas
de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby em
brotação**

Resumo

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby é uma espécie nativa do cerrado brasileiro que apresenta crescimento sazonal e órgãos subterrâneos de reserva, denominados rizóforos, que acumulam altas concentrações de frutanos do tipo inulina. A enzima responsável pela despolimerização de frutanos é a 1-FEH. A atividade mais elevada desta enzima é detectada principalmente em rizóforos de plantas em brotação natural e de plantas induzidas à brotação pela excisão dos órgãos aéreos. Esta atividade de 1-FEH pode ser ainda intensificada pelo armazenamento no frio das plantas induzidas à brotação. Este trabalho teve como objetivo a purificação de 1-FEHs em plantas em fase de brotação natural. A metodologia utilizada consistiu de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de afinidade em coluna ConA e cromatografia de troca iônica e resultou na separação de diversas frações com atividade de 1-FEH e no isolamento de uma invertase com massa molecular de 60 kDA estimada por SDS-PAGE. A separação das 1-FEHs das invertases foi obtida com a utilização da coluna de troca aniônica. As atividades da 1-FEH e da invertase foram determinadas por colorimetria e por HPAEC/PAD, respectivamente. A fração 4A apresentou fatores de purificação de 179 e 94, utilizando inulina e nistose como substrato, respectivamente e baixa atividade invertásica. As frações obtidas de plantas em fase de brotação natural apresentaram um comportamento diferente em coluna de troca aniônica quando comparado com o das frações obtidas de plantas induzidas à brotação e armazenadas no frio, indicando a presença de diferentes isoformas de 1-FEH em ambas as preparações. Os resultados obtidos sugerem que durante o processo de brotação, natural ou induzido, a mobilização de frutanos ocorre por um conjunto de proteínas com atividade hidrolítica que diferem na sua estrutura física e química.

Abstract

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby is a native species from the Brazilian cerrado presenting a seasonal growth pattern. Its underground organs, named rhizophores, accumulate high levels of inulin-type fructan. FEH is the enzyme responsible for fructan depolymerization. The highest FEH activity in rhizophores is detected mainly during sprouting and in plants induced to sprouting by defoliation. This FEH activity is also enhanced by cold storage of the induced plants. The aim of this work was the purification of 1-FEH from rhizophores of sprouting plants. A combination of ammonium sulphate precipitation, ConA affinity chromatography and ion exchange chromatography allowed the separation of several fractions with FEH activity and one soluble invertase with molecular mass of 60 kDa estimated by SDS-PAGE. The utilization of anion exchange column allowed the separation of FEH from invertases. Enzymatic activities were determined by colorimetry and by HPAEC/PAD. All fractions with FEH activity were shown to be glycoproteins. This protocol allowed a 179 and 94 – fold purification of fraction 4A using inulin and nystose as substrates, respectively. This fraction also showed low invertase activity. Fractions presenting FEH activity obtained from sprouting plants showed different behavior in anion exchange column when compared to fractions obtained from plants induced to sprouting by defoliation and cold storage, indicating differences in the isoforms of FEH from both preparations. Results suggest that during the sprouting process, either natural or induced by defoliation, fructan mobilization occurs by a set of protein with hydrolytic activity which differs in its physical and chemical structure.

INTRODUÇÃO

Levantamentos florísticos realizados no cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (SP) mostraram a predominância de espécies de Asteraceae no estrato herbáceo (Mantovani 1983). Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro (1993), estudando espécies herbáceas de Asteraceae nesta mesma área restrita do cerrado, mostraram que 60% das espécies que apresentam órgãos subterrâneos espessados acumulam frutanos como principal carboidrato de reserva. Dentre estas espécies destaca-se *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, espécie nativa, com frutanos com GP médio de 40 (Carvalho *et al.* 1997).

O cerrado caracteriza-se pela sazonalidade bem definida e regime de água que inclui verão úmido e inverno seco, em geral com duração de cinco meses, e por sua vegetação florística e fisionomicamente diversa (Coutinho 2002). A maioria das espécies ricas em frutanos encontra-se em áreas onde o crescimento é sazonal (Pontis & Del Campillo 1985). Este conhecimento foi aprofundado por Hendry & Wallace (1993) que confirmaram que a expansão da flora que contém frutanos coincidiu com o desenvolvimento da sazonalidade durante o Eoceno-Mioceno. O período Mioceno foi caracterizado pelo aparecimento e a expansão das vegetações de savana e cerrado.

V. herbacea apresenta um ciclo sazonal de crescimento bem definido (Carvalho & Dietrich 1993) e acumula os frutanos nos órgãos subterrâneos espessados, de estrutura caulinar, denominados rizóforos por Menezes *et al.* (1979) para outras espécies do gênero. Os rizóforos são responsáveis pela reprodução vegetativa da espécie por apresentarem gemas axilares que dão origem aos ramos aéreos (Hayashi & Appezzato-da-Glória 2005), além de atuarem como órgãos de reserva para a planta, acumulando até 80% do seu peso seco em inulina (Carvalho & Dietrich 1993). Esses autores detectaram diferenças na concentração e no tamanho das cadeias de frutanos nos órgãos de reserva dessa planta em diferentes fases fenológicas. Entre agosto e setembro ocorre a brotação dos ramos aéreos pelo desenvolvimento das gemas presentes nos rizóforos, principalmente daquelas próximas à superfície do solo, na região proximal do órgão. A floração ocorre logo após a brotação. Foi observado o declínio do conteúdo de frutanos entre as fases de brotação e floração, indicando a mobilização desses carboidratos para suprir a demanda energética da planta durante o crescimento da parte aérea e desenvolvimento floral, após a fase de dormência. Segundo Carvalho & Dietrich (1993), variações nas concentrações de frutanos nos rizóforos durante o ciclo fenológico desta planta indicam processos de síntese e despolimerização destes compostos e

confirmam o papel de reserva destes carboidratos. Além das variações nos teores e na composição de frutanos nas diferentes fases fenológicas, variações na concentração de frutanos também foram observadas ao longo do comprimento dos rizóforos, entre as regiões proximal, mediana e distal (Portes & Carvalho 2006).

Os frutanos são polímeros de frutose, sintetizados a partir da sacarose. Os frutanos do tipo inulina, encontrados em espécies de Asteraceae, são baseados no trissacarídeo 1-cestose e apresentam unidades de frutose unidas por ligações do tipo $\beta(2,1)$. Outro tipo de frutano é o levano, encontrado em espécies de Poaceae e Liliaceae e também sintetizado por bactérias; esses frutanos são baseados no trissacarídeo 6-cestose e apresentam unidades de frutose unidas por ligações do tipo $\beta(2,6)$ (Pollock *et al.* 1996). Nas células, os frutanos e as enzimas envolvidas em seu metabolismo são encontrados no vacúolo (Frehner *et al.* 1984), embora a presença da enzima responsável pela sua degradação tenha sido detectada também no fluido apoplástico (Livingston & Henson 1998, Van den Ende *et al.* 2005).

Segundo modelo proposto por Edelman & Jefford (1968), para tubérculos de *Helianthus tuberosus* L., os frutanos são sintetizados pela ação de duas enzimas. A primeira enzima é a 1-sacarose: sacarose frutossiltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99) que catalisa irreversivelmente a formação de 1-cestose e a outra é a 1-frutano: frutano frutossiltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100) que catalisa a transferência reversível de unidades terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora.

Segundo esse mesmo modelo, a hidrólise de frutanos ocorre pela remoção sequencial das unidades terminais de frutose por uma frutano exohidrolase (FEH). Esta enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose. Os principais produtos da FEH são a frutose e a sacarose, sendo a enzima fortemente inibida por esta última (Edelman & Jefford 1964). Como os açúcares são transportados nas plantas na forma de sacarose, deve haver uma conversão de frutose para glucose, para formar sacarose que então será translocada para fora da célula. Dependendo do tipo de ligação entre as unidades de frutose que é hidrolisada, pode-se distinguir a 1-frutano exohidrolase (1-FEH, EC 3.2.1.153), enzima que hidrolisa ligações $\beta(2,1)$, da 6-frutano exohidrolase (6-FEH, EC 3.2.1.154), enzima que hidrolisa ligações $\beta(2,6)$.

O principal papel das FEHs em plantas acumuladoras de frutanos é mobilizar reservas quando a demanda energética da planta aumenta, como, por exemplo, em situações de fotossíntese reduzida ou de dano ao aparato fotossintético. Aumento na

atividade da FEH nos órgãos subterrâneos de reserva foi relacionado à brotação de órgãos aéreos em várias espécies de Asteraceae, seja durante o ciclo normal de desenvolvimento, conforme demonstrado em *Taraxacum officinale* (Web.) Wigg (Rutherford & Deacon 1974), *Cichorium intybus* L. (Van den Ende & Van Laere 1996) e *H. tuberosus* (Marx *et al.* 1997), seja em plantas induzidas à brotação após a retirada dos órgãos aéreos, conforme observado em *Polymnia sonchifolia* Poep & Endl (Fukai *et al.* 1997), *C. intybus* (De Roover *et al.* 1999a) e em *Viguiera discolor* (Degasperi *et al.* 2003). Estudos realizados durante o ciclo fenológico em *V. herbacea* mostraram que a FEH presente nos rizóforos apresenta atividade elevada apenas na época de brotação (Ribeiro Sobrinho *et al.* 1996) e que esta enzima pode ser induzida, em outras fases fenológicas, pela excisão e rebrota de seus ramos aéreos (Asega & Carvalho 2004). Esta atividade elevada de FEH pode ser observada, especialmente, na região proximal dos rizóforos de plantas em brotação natural ou induzida, região onde ocorre o desenvolvimento das gemas que dão origem aos ramos aéreos (Portes & Carvalho 2006).

O aumento da atividade de FEH em plantas de *V. herbacea* induzidas à brotação foi intensificado pelo armazenamento dos rizóforos no frio (Portes 2005). O efeito promotor do frio na atividade da FEH já havia sido detectado em plantas de *C. intybus*. Este aumento induzido pela baixa temperatura resulta no aumento de hexoses e frutanos de baixo GP, responsáveis pelo aumento da pressão osmótica que poderia promover a tolerância ao frio (Van den Ende & Van Laere 1996).

A compreensão do modo de atuação da FEH depende de estudos bioquímicos e moleculares como a purificação, a clonagem dos genes e análises de expressão desta enzima.

Até o presente, várias FEHs foram purificadas até a homogeneidade eletroforética, a partir de diferentes espécies vegetais e o papel que estas desempenham no desenvolvimento vegetal foi mais bem discutido, na maioria dos casos, como exemplificado para a 6-FEH de *Dactylis glomerata* L. (Yamamoto & Mino 1985); 1-FEH I de *C. intybus* (Claessens *et al.* 1990); FEH de *Avena sativa* L. (Henson & Livingston 1996); 1-FEH de *H. tuberosus* (Marx *et al.* 1997); 6-FEH de *Lolium perenne* L. (Marx *et al.* 1997b); FEH de *Hordeum vulgare* L. (Henson & Livingston 1998); 1-FEH IIa e 1-FEH IIb (De Roover *et al.* 1999b, Van den Ende *et al.* 2001) de *C. intybus*; 1-FEHw1 e 1-FEHw2 de *Triticum aestivum* L. (Van den Ende *et al.* 2003), 6-

FEH de *Beta vulgaris* L. (Van den Ende *et al.* 2003b), 6-KEHw1 e 6-KEHw2 de *T. aestivum* (Van den Ende *et al.* 2005) 6-FEH (Atcw INV3) e 6&1-FEH (AtcwINV6) de *Arabidopsis thaliana* L. (De Coninck *et al.* 2005), 6&1-FEH (Kawakami *et al.* 2005) e 6-FEH (Van Riet *et al.* 2006) ambas de *T. aestivum*.

Estudos de purificação da FEH de *V. herbacea* possibilitaram o isolamento de quatro frações com atividade de FEH em rizóforos armazenados no frio por sete dias, obtidos de plantas submetidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Asega 2003). Foi sugerido que estas frações ativas poderiam ser resultantes da expressão de isoformas de FEH induzidas por esses tratamentos.

Em vista dos altos teores de frutanos encontrados em *V. herbacea*, da importância do conhecimento do metabolismo de degradação de frutanos e do papel que estas substâncias desempenham na adaptação das plantas ao cerrado, este capítulo tem como objetivo a purificação das enzimas envolvidas na degradação dos frutanos, as FEHs, durante o processo de brotação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram utilizados rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (SP 169567) em fase de brotação natural em setembro de 2003, cultivadas em viveiro da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu.

Extração e purificação das frutano-exohidrolases

Os rizóforos (2,23 kg) foram homogeneizados em liquidificador em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,5, contendo 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β -mercaptoetanol e 10 % de PVPP (p/v), na proporção 1:2 (p/v). O homogeneizado foi mantido em repouso por 30 min e, em seguida, filtrado em nylon duplo. O filtrado foi mantido em repouso por 30 min e, após centrifugação a 13.000 *g* por 20 min, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 20% de saturação (p/v), mantendo-se a mistura em repouso por uma noite. Após centrifugação a 13.000 *g* por 20 min, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 80 % de saturação (p/v), seguido por repouso por duas horas. A proteína precipitada foi coletada por centrifugação a 13.000 *g* por 20 min. O precipitado foi ressuspensionado em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, contendo 1 mM de cloreto de manganês, 1 mM de cloreto de magnésio e 1 mM de cloreto de cálcio e mantido a -20 °C por uma noite para a precipitação do frutano residual. Após descongelamento e centrifugação a 5.000 *g* por 30 min, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna (20 x 120 mm) de Concanavalina A (Con A) Sepharose (Pharmacia Biotech) em sistema FPLC (Akta-Purifier 10/100 – Pharmacia-Biotech) equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 contendo 1 mM de cloreto de manganês, 1 mM de cloreto de magnésio e 1 mM de cloreto de cálcio, com um fluxo de 3,0 mL min⁻¹. Após lavagem da coluna com três volumes do mesmo tampão, as proteínas ligadas foram eluídas com 1 M de metil α D-mano-piranosídeo em tampão acetato de sódio pH 5,0. As frações apresentando atividade hidrolítica sobre frutanos foram reunidas e tiveram o pH ajustado para 6,0 com tampão histidina HCl 100 mM, e em seguida foram aplicadas em uma coluna de troca aniônica Mono Q (Pharmacia HR 5/5), em sistema FPLC, equilibrada previamente com tampão histidina HCl 20 mM, pH 6,0. As proteínas foram eluídas utilizando-se um gradiente linear de 0 a 500 mM de cloreto de sódio em 76 min com fluxo de 1 mL min⁻¹,

no mesmo tampão. As frações ativas foram reunidas e dialisadas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, com três trocas de tampão durante um dia. As proteínas foram aplicadas em uma coluna de troca catiônica Mono S (Pharmacia HR 5/5), em sistema FPLC, equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e eluídas, utilizando-se um gradiente linear de 0 a 500 mM de cloreto de sódio em 75 min com fluxo de 1 mL min⁻¹, no mesmo tampão. As frações que não interagiram com a matriz da coluna sob pH 5,0 foram reunidas, tiveram o pH acertado para 4,0 com ácido acético 1M e foram aplicadas novamente em uma coluna de troca catiônica Mono S, em sistema, equilibrada, nesta etapa, com um tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 e eluídas, utilizando-se um gradiente linear de 0 a 500 mM de cloreto de sódio em 75 min com fluxo de 1 mL min⁻¹, no mesmo tampão. As proteínas foram mantidas no gelo durante todas as etapas de extração e purificação. Azida de sódio foi adicionada em todos os tampões para prevenir o crescimento microbiano.

Ensaio Enzimático

Durante todas as etapas da purificação, a atividade enzimática foi determinada a partir da incubação do substrato com o extrato enzimático na proporção de 1:1 (v/v). Para a análise da atividade da FEH, os substratos utilizados foram inulina de *H. tuberosus* (frutanos com grau de polimerização médio de 35, Sigma) e nistose, o tetrassacarídeo da série de inulina, nas concentrações finais de 50 mg mL⁻¹ e 0,1 M, respectivamente, ambos preparados em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,5. As frações obtidas durante as etapas de purificação foram incubadas também com sacarose 0,2 M, pH 4,5 para detecção de atividade invertásica. As incubações foram realizadas a 30 °C. Alíquotas das misturas de incubação foram submetidas à fervura por 5 min para a interrupção da reação e congeladas para posterior análise dos produtos formados. A nistose utilizada como substrato foi cedida pelo Dr. Norio Shiomi, da Rakuno Gakuen University (Japão).

Quantificação de proteína

O teor de proteína nas frações obtidas durante as etapas da purificação foi estimado pelo método de Bradford (1976) com o reagente da Bio Rad. BSA (Sigma) (1 mg mL⁻¹) foi utilizado como padrão.

Análise das atividades enzimáticas

As atividades da FEH e de invertase foram determinadas pela quantidade de frutose liberada na mistura de incubação, através da quantificação de açúcar redutor, de acordo com Somogyi (1945), utilizando-se frutose ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) como padrão. As análises qualitativas foram realizadas por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo DX-300 e coluna Carbo Pac PA1. O gradiente foi estabelecido misturando-se o eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio). Para a análise dos produtos de incubação, utilizando-se sacarose e nistose como substratos, foi utilizada 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. Para a análise dos produtos de incubação utilizando-se inulina como substrato foi utilizada 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. 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} .

Análise das proteínas purificadas

As análises das proteínas purificadas foram efetuadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), empregando-se um sistema descontínuo, baseado no método descrito por Laemmli (1970) e utilizando géis com 10 % de poliacrilamida em tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M pH 8,3, contendo 0,1 % de SDS (p/v). Foram utilizados géis (9X6 cm) de 0,75 mm de espessura, montados em cuba vertical de eletroforese modelo Mini-Protean (Bio Rad). Como marcadores de massa molecular foram utilizados fosforilase b (97,4 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisosima (14,4 kDa), todos integrantes do conjunto de calibração de baixo peso molecular da Bio Rad. Os géis foram fixados em uma solução de 30 % de ácido acético (v/v) e 10 % de metanol (v/v) e lavados três vezes com água deionizada. Em seguida, adicionou-se solução de nitrato de prata e deixou-se por 30 min. sob agitação. Os géis foram lavados rapidamente com água deionizada e em seguida foi adicionada uma solução de 2,5 % de carbonato de prata (p/v) contendo 0,02 % de formaldeído (v/v), sob agitação até que as bandas ficassem suficientemente nítidas, interrompendo-se a revelação pela adição de ácido acético 5 % (v/v).

RESULTADOS

Durante todas as etapas de purificação, a atividade enzimática e o conteúdo de proteína foram determinados para avaliação da eficiência do procedimento de purificação utilizado.

Como mostra a figura 1, as proteínas extraídas de rizóforos de plantas em fase de brotação natural apresentaram atividade hidrolítica sobre inulina, nistose e sacarose demonstrando atividade de 1-FEH e de invertase. As proteínas foram retidas na coluna de afinidade Con A e eluídas com metil α D-manopiranosídeo, confirmando que a enzima de interesse, a 1-FEH, e a invertase são glicoproteínas.

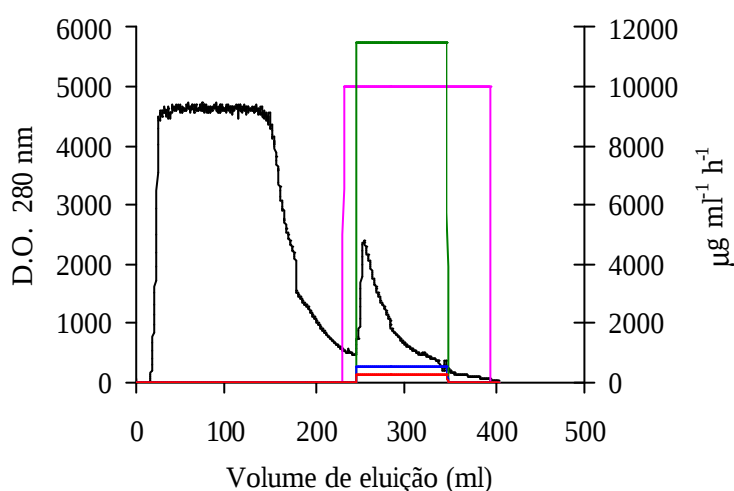


Figura 1 Cromatografia de afinidade em concanavalina A do extrato enzimático de rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. A absorvância foi monitorada a 280 nm (—). As proteínas retidas foram eluídas com 1M de metil α D-manopiranosídeo em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (—). Atividade total sobre inulina (—), nistose (—) e sacarose (—).

As frações contendo atividade hidrolítica foram reunidas e aplicadas em coluna MonoQ pH 8,0, conforme condições experimentais utilizadas anteriormente por Asega (2003) e também em pH 7,5. Entretanto, as proteínas não interagiram com a matriz da coluna em nenhuma destas condições de pH, sendo eluídas antes do gradiente. As frações foram novamente aplicadas em coluna Mono Q utilizando um pH mais ácido

(pH 6,0) que permitiu a interação das proteínas com a matriz, como mostra a figura 2. Parte das proteínas foi eluída antes do gradiente de NaCl em tampão histidina HCl 20 mM, pH 6,0 (fração MQA) e outra parte foi eluída no gradiente (fração MQG).

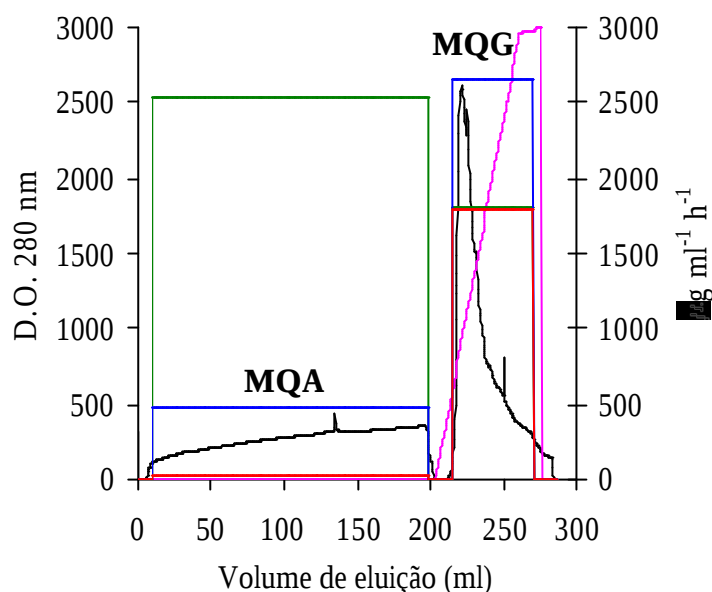


Figura 2. Cromatografia de troca aniônica em MonoQ do extrato enzimático de rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. A absorbância foi monitorada a 280 nm (—). As proteínas retidas foram eluídas em um gradiente linear crescente de NaCl (0 a 500 mM) em tampão histidina HCl 20 mM, pH 6,0 (—). Atividade total sobre inulina (—), nistose (—) e sacarose (—).

Esta etapa permitiu a separação da atividade invertásica da inulinásica, sendo a primeira predominante na fração MQA, enquanto a atividade inulinásica, mais elevada sobre nistose do que sobre inulina, foi predominantemente eluída na fração MQG.

As frações MQA e MQG foram em seguida aplicadas separadamente em coluna MonoS, pH 5,0.

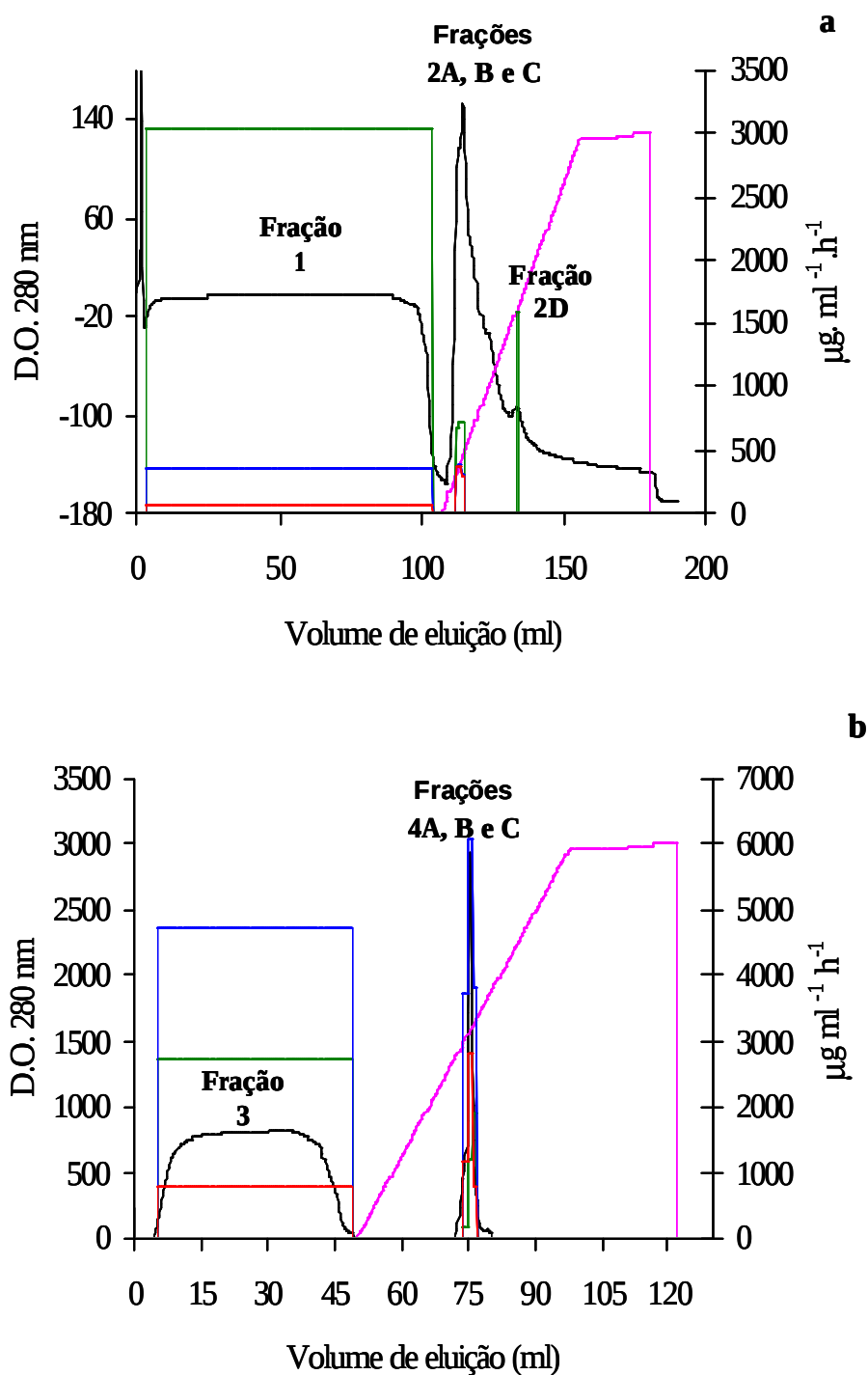


Figura 3. Cromatografia de troca catiônica em MonoS pH 5,0 das frações (a) MQA e (b) MQG obtidas do extrato enzimático de rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. A absorbância foi monitorada a 280 nm (—). As proteínas retidas foram eluídas em um gradiente linear crescente de NaCl (0 a 500 mM) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (—). Atividade total sobre inulina (—), nistose (—) e sacarose (—).

A fração MQA em coluna MonoS pH 5,0 (figura 3a), deu origem à fração 1, de proteínas eluídas antes do gradiente, e frações 2A, 2B, 2C e 2D, eluídas no gradiente de NaCl. A fração 1 apresentou atividade predominantemente invertásica muito elevada (figura 4a, b), atividade baixa sobre nistose (figura 4e, f), além de atividade de frutossiltransferases, evidenciada pela presença de frutanos com GP 5 na mistura de incubação (figura 4c, d). A fração não apresentou atividade inulinásica (figura 4 e, f). As frações 2A, B e C também apresentaram atividade invertásica alta (figura 5a, d, g, j), atividade de frutossiltransferases, demonstrada pela presença de frutanos de GP 5 e 6 (figura 5b, e, h, k) e atividade de 1-FEH (figura 5c, f, i, l), evidenciada pelo aumento da frutose. Quando visualizadas em SDS-PAGE, estas frações apresentaram diversas bandas, indicando uma purificação parcial (figura 8a). A fração 2D, entretanto, apresentou atividade apenas sobre sacarose (figura 5m) e uma única banda de 60 kDa em SDS-PAGE (figura 8a).

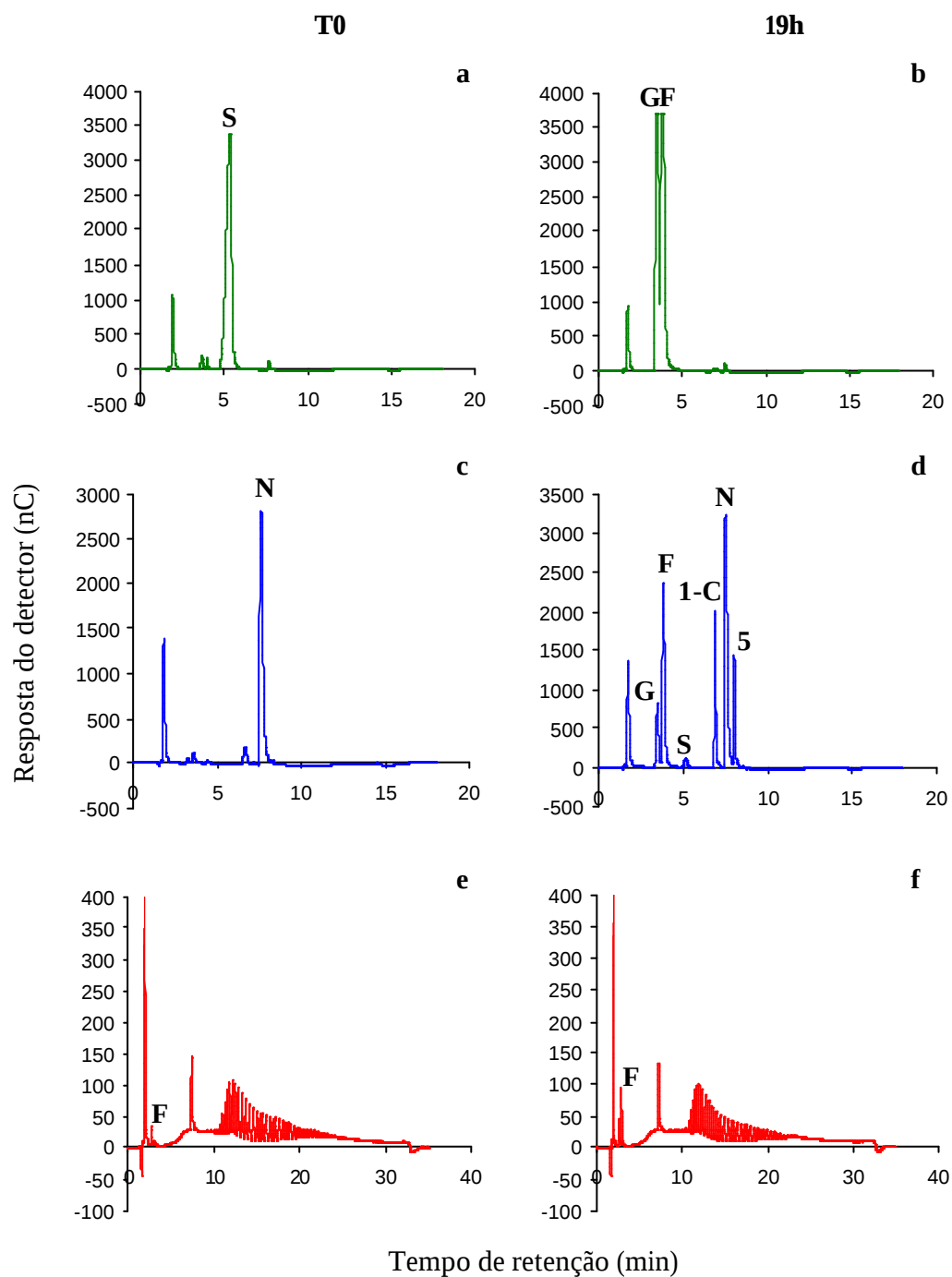


Figura 4 a-f. Análise por HPAEC/PAD dos produtos formados após 19 horas de incubação da fração 1, obtida da fração MQA do extrato enzimático de rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural, com os substratos sacarose (a,b,___), nistose (c,d,___) e inulina (e,f,___). G, F, S, 1-C, N, 5 e T0 correspondem a glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose, frutano com grau de polimerização 5 e tempo zero de incubação, respectivamente.

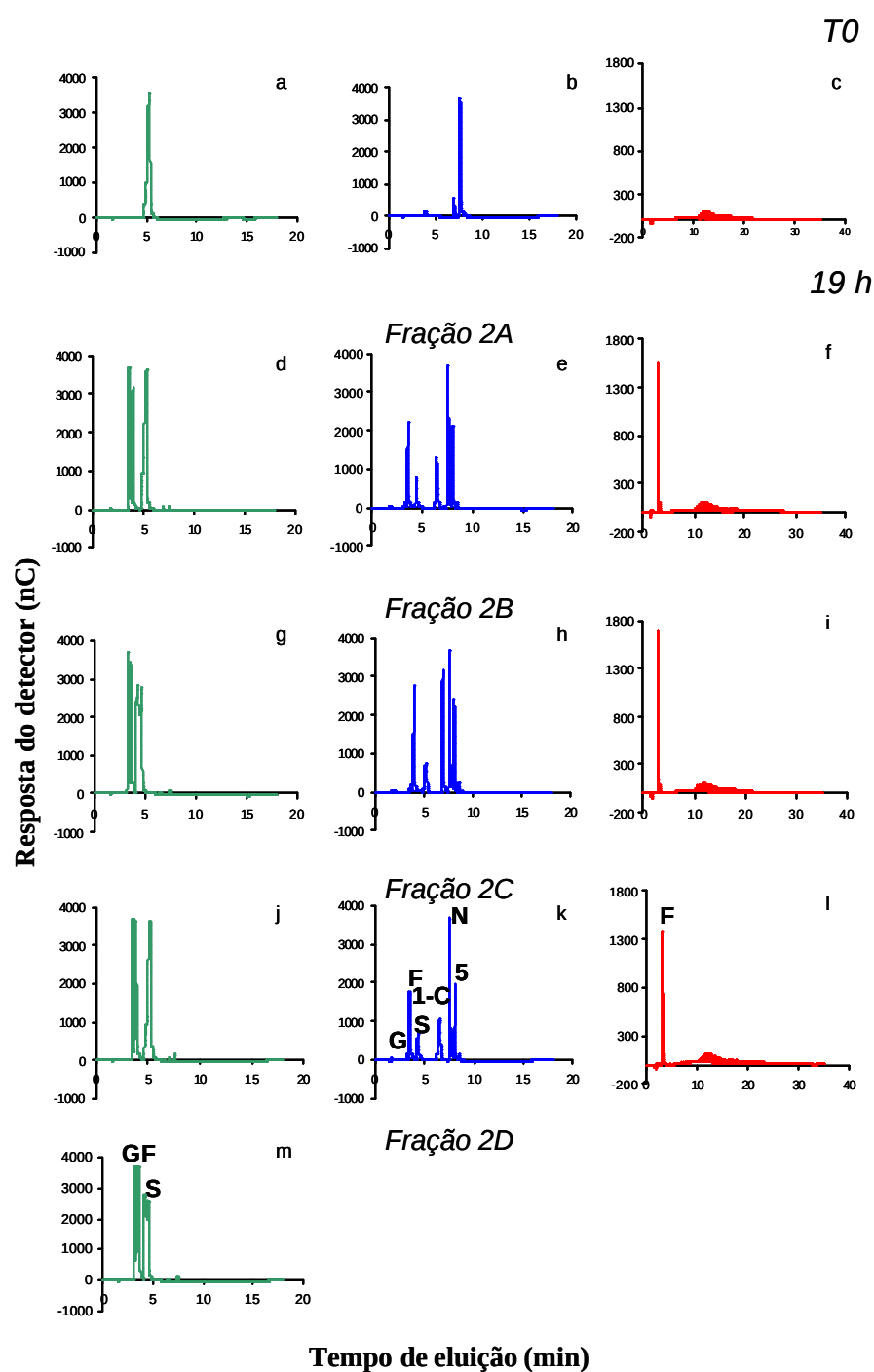


Figura 5 a-m. Análise por HPAEC/PAD dos produtos formados após 19 horas de incubação das frações 2A, 2B, 2C e 2D, obtidas da fração MQA do extrato enzimático de rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural, com os substratos sacarose (a,d,g,j,m), nistose (b,e,h,k) e inulina (c,f,i,l). G, F, S, 1-C, N, 5, 6 e T0 correspondem a glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutano com grau de polimerização 5 e 6 e tempo zero de incubação, respectivamente.

A fração MQG em coluna MonoS pH 5,0 (figura 3b), deu origem à fração 3, de proteínas eluídas antes do gradiente, e frações 4A, 4B e 4C, eluídas no gradiente. Todas apresentaram atividade mais elevada sobre nistose do que sobre os demais substratos. A fração 3 apresentou atividade invertásica (figura 6a, b), atividade de 1-FEH (figura 6c, d, e, f), demonstrada pelo o aumento do pico referente à frutose após incubação com nistose e inulina e pelo aparecimento de sacarose após incubação com nistose. Apresentou também atividade de frutossiltransferases, indicada pela presença de frutanos de GP 5 (figura 6c, d). As frações 4A, 4B e 4C, quando incubadas com sacarose, produziram glucose e frutose, indicando atividade invertásica (figura 7a, d, g, j), quando incubadas com inulina produziram frutose livre, confirmando o caráter de exoenzima da 1-FEH (figura 7c, f, i, l). A incubação destas frações com nistose produziu frutano com GP 5 (figura 7b, e, h, k), indicando atividade de frutossiltransferases, além de frutose e sacarose, produtos da ação da 1-FEH.

A fração 4A foi a que apresentou os maiores fatores de purificação já encontrados para a 1-FEH de *V. herbacea*, de 179 e 94 vezes, indicadas pelas setas na tabela 1, utilizando inulina e nistose como substratos, respectivamente. Entretanto, esta fração apresentou diversas bandas em SDS-PAGE (figura 8b) e também baixa atividade invertásica (figura 7a, d).

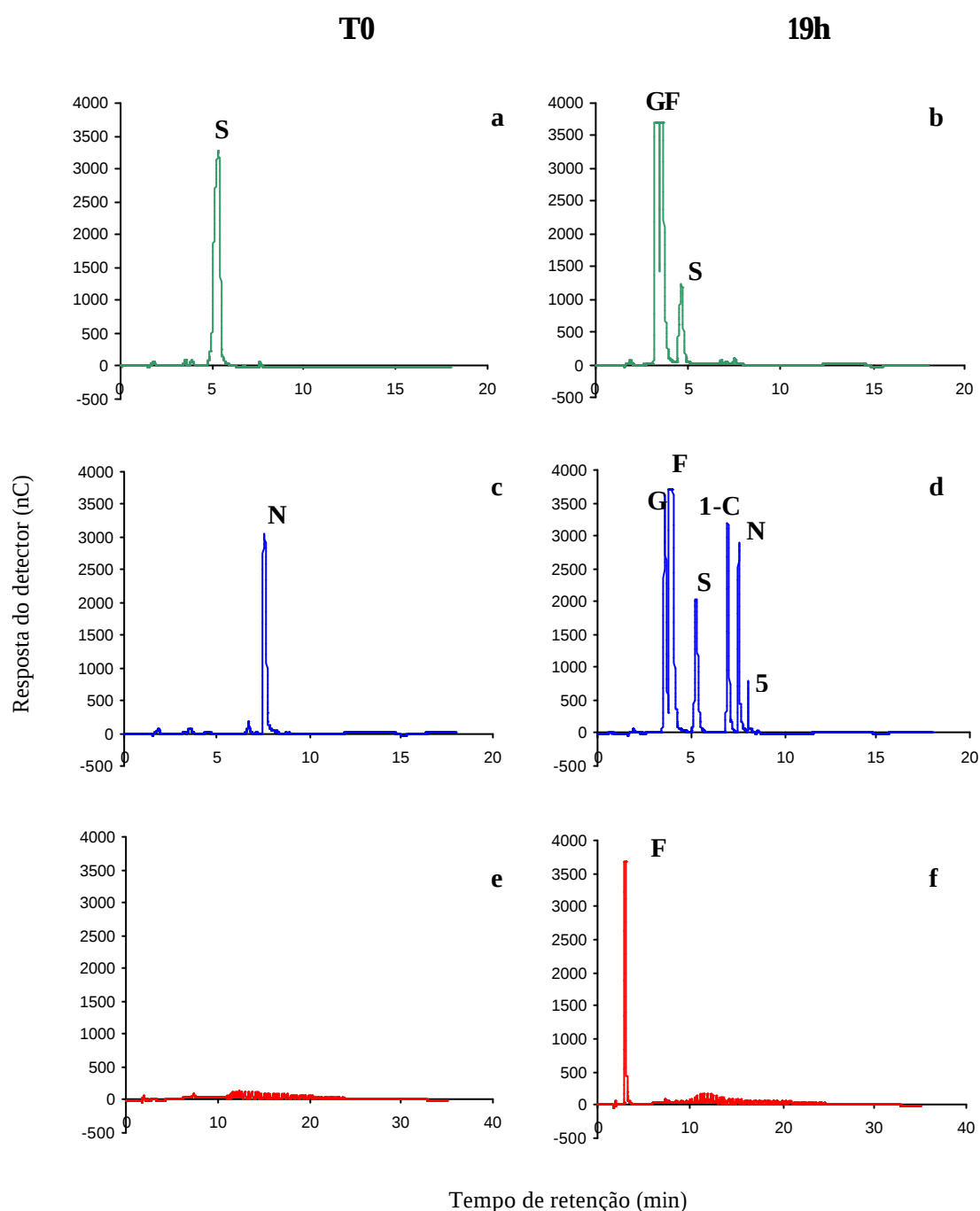


Figura 6 a-f. Análise por HPAEC/PAD dos produtos formados após 19 horas de incubação da fração 3, obtida da fração MQG do extrato enzimático de rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural, com os substratos sacarose (a,b,___), nistose (c,d,___) e inulina (e,f,___). G, F, S, 1-C, N, 5 e T0 correspondem a glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose, frutano com grau de polimerização 5 e tempo zero de incubação, respectivamente.

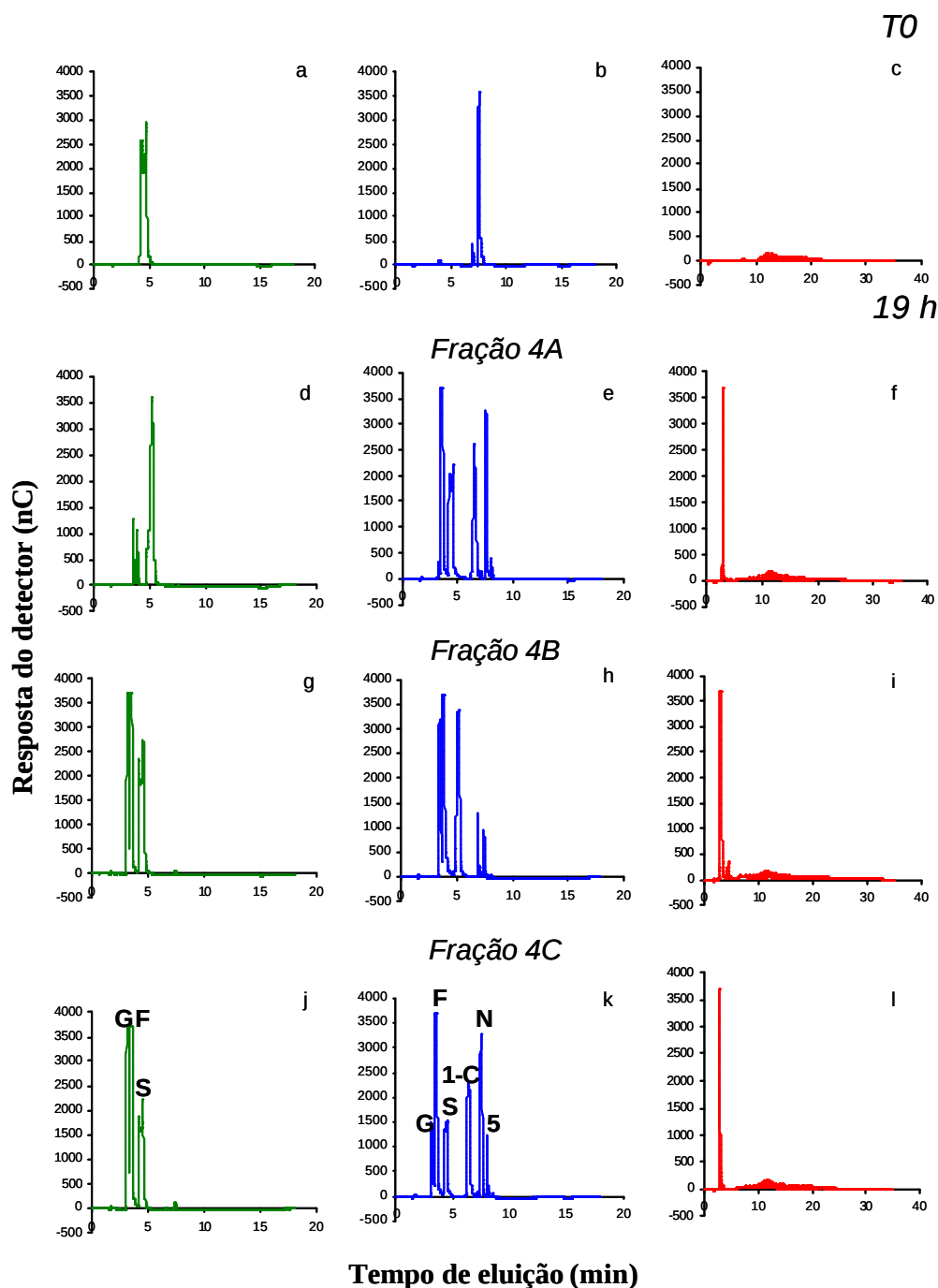


Figura 7- a-l. Análise por HPAEC/PAD dos produtos formados após 19 horas de incubação das frações 4A, 4B e 4C, obtidas da fração MQG do extrato enzimático de rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural, com os substratos sacarose (a,d,g,j___), nistose (b,e,h,k___) e inulina (c,f,i,l___). G, F, S, 1-C, N, 5 e T0 correspondem a glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose, frutano com grau de polimerização 5 e tempo zero de incubação, respectivamente.

Tabela 1. Purificação da 1-FEH de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. Atividade enzimática determinada sobre inulina, nistose e sacarose. Setas indicam os maiores fatores de purificação já encontrados para a 1-FEH desta espécie.

Frações	Proteína total mg de proteína	Atividade Total mg de produto	Atividade Total mg de produto h ⁻¹	Atividade específica mg mg ⁻¹ de prot h ⁻¹	Fator de purificação
Inulina					
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20-80 %	544,16	342,437	171,219	0,315	1
Con A	42,10	57,471	28,736	0,683	2,17
MQA	15,75	65,380	3,846	0,244	0,78
MQG	10,206	74,936	74,936	7,342	23,34
Fração 3	7,48	616,693	36,276	4,850	15,41
Fração 4A	0,021	20,032	1,178	56,111	178,33 ←
Fração 4B	0,122	47,748	2,809	23,022	73,17
Fração 4C	0,181	12,976	0,763	4,217	13,40
Fração 1	12,32	211,339	11,123	0,903	2,87
Fração 2A	0,0287	6,898	0,363	12,649	40,20
Fração 2B	0,312	7,071	0,372	1,193	3,79
Fração 2C	0,314	5,575	0,293	0,934	2,97
Fração 2D	0,053	0,000	0,000	0,000	0,00
Nistose					
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20-80 %	544,16	2054,622	1027,311	1,888	1
Con A	42,1	648,276	324,138	7,699	4,08
MQA	15,75	1484,690	87,335	5,545	2,94
MQG	10,206	111,756	111,756	10,950	5,80
Fração 3	7,480	3533,858	207,874	27,791	14,72
Fração 4A	0,021	63,307	3,724	177,331	93,93 ←
Fração 4B	0,122	103,307	6,077	49,811	26,38
Fração 4C	0,181	65,197	3,835	21,188	11,22
Fração 1	12,32	1462,047	76,950	6,246	3,31
Fração 2A	0,0287	6,898	0,363	12,649	6,70
Fração 2B	0,312	7,386	0,389	1,246	0,66
Fração 2C	0,314	5,795	0,305	0,971	0,51
Fração 2D	0,053	0,299	0,016	0,297	0,16
Sacarose					
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20-80 %	544,16	43188,965	21594,482	19,842	1,00
Con A	42,1	18372,414	4593,104	54,550	2,75
MQA	15,75	15492,415	911,319	28,931	1,46
MQG	10,206	2583,724	151,984	7,446	0,38
Fração 3	7,480	4102,047	241,297	16,129	0,81
Fração 4A	0,021	5,764	0,339	8,073	0,41
Fração 4B	0,122	40,945	2,409	9,871	0,50
Fração 4C	0,181	64,252	3,780	10,441	0,53
Fração 1	12,32	25499,212	1342,064	54,467	2,75
Fração 2A	0,0287	25,827	1,359	23,681	1,19
Fração 2B	0,312	27,402	1,442	2,311	0,12
Fração 2C	0,314	27,402	1,442	2,296	0,12
Fração 2D	0,053	60,472	3,183	30,026	1,51

Na figura 8 são apresentados os resultados da eletroforese (SDS-PAGE) das frações 1, 2A, 2B, 2C, 2D, 3, 4A, 4B e 4C. Podem-se visualizar diversas bandas em todas as frações, com exceção da fração 2D, que deu origem a uma única banda com massa molecular aparente de 60 kDa, e com atividade de invertase. A ocorrência de diversas bandas em SDS-PAGE indica contaminação das demais frações. A eletroforese das frações 4A, 4B e 4C (figura 8b) revelou a presença de uma banda com massa molecular estimada para 80 kDa, semelhante às de 1-FEH descritas na literatura.

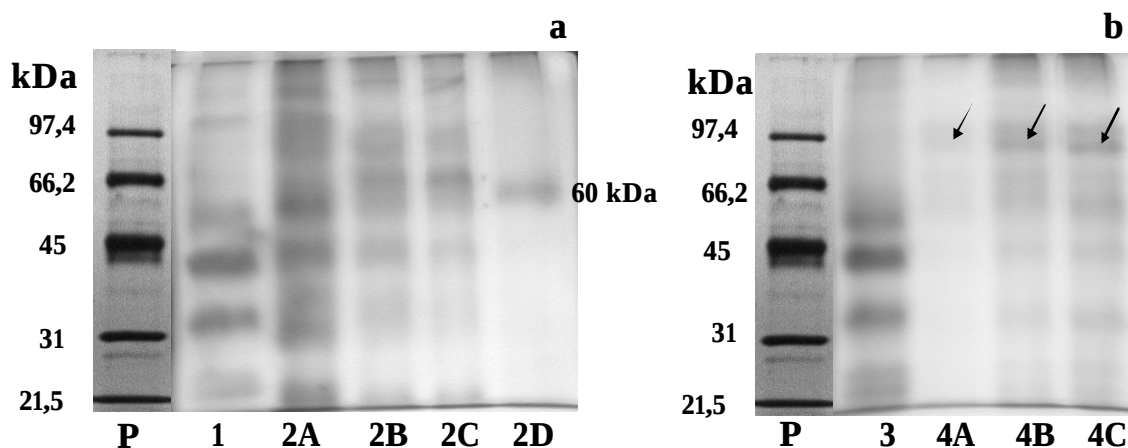


Figura 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (a) Frações obtidas em MonoS, pH 5,0 e (b) frações obtidas em MonoS, pH 5,0, originadas das frações MQA e MQG, respectivamente, obtidas do extrato enzimático de rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. As proteínas (2µg) foram visualizadas por coloração com prata. Os marcadores de peso molecular (kDa) são apresentados em P. Setas indicam bandas com massa molecular semelhante às de 1-FEHs descritas na literatura.

A proteína presente na fração 2D foi seqüenciada no laboratório do Departamento de Micro-Imuno-Parasitologia da Universidade Federal do Estado de São Paulo, pelo grupo do Profº Dr. Sérgio Schenkman, sendo obtida uma pequena parte da seqüência de aminoácidos que, entretanto, quando analisada pelo Programa BLAST (Altschul et al., 1990), não apresentou homologia com outras seqüências de invertase disponíveis.

As frações 1 e 3 da MonoS, provenientes das frações MQA e MQG (figura 3) respectivamente, foram novamente aplicadas em coluna MonoS (figura 9), porém em

pH 4,0 com a finalidade de purificar melhor estas frações que não interagiram com a matriz da coluna sob as condições de pH utilizadas anteriormente (pH 5,0). O perfil cromatográfico pode ser observado na figura 9.

A fração 1, submetida à MonoS em pH 4,0 (figura 9a), deu origem à fração 5, eluída antes do gradiente e com atividade mais elevada sobre nistose do que sobre inulina e sacarose e às frações denominadas gradiente 1, eluídas durante o gradiente e com atividade mais elevada sobre sacarose do que sobre os demais substratos.

A fração 3, submetida à Mono S em pH 4,0 (figura 9b) deu origem à fração 6, eluída antes do gradiente e sem atividade detectável, e às frações gradiente 3, com atividade mais elevada sobre nistose do que sobre inulina e sacarose. As proteínas presentes nas frações gradiente 1 e gradiente 3 não foram analisadas em SDS-PAGE, uma vez que a quantidade de proteína foi insuficiente para a realização deste procedimento.

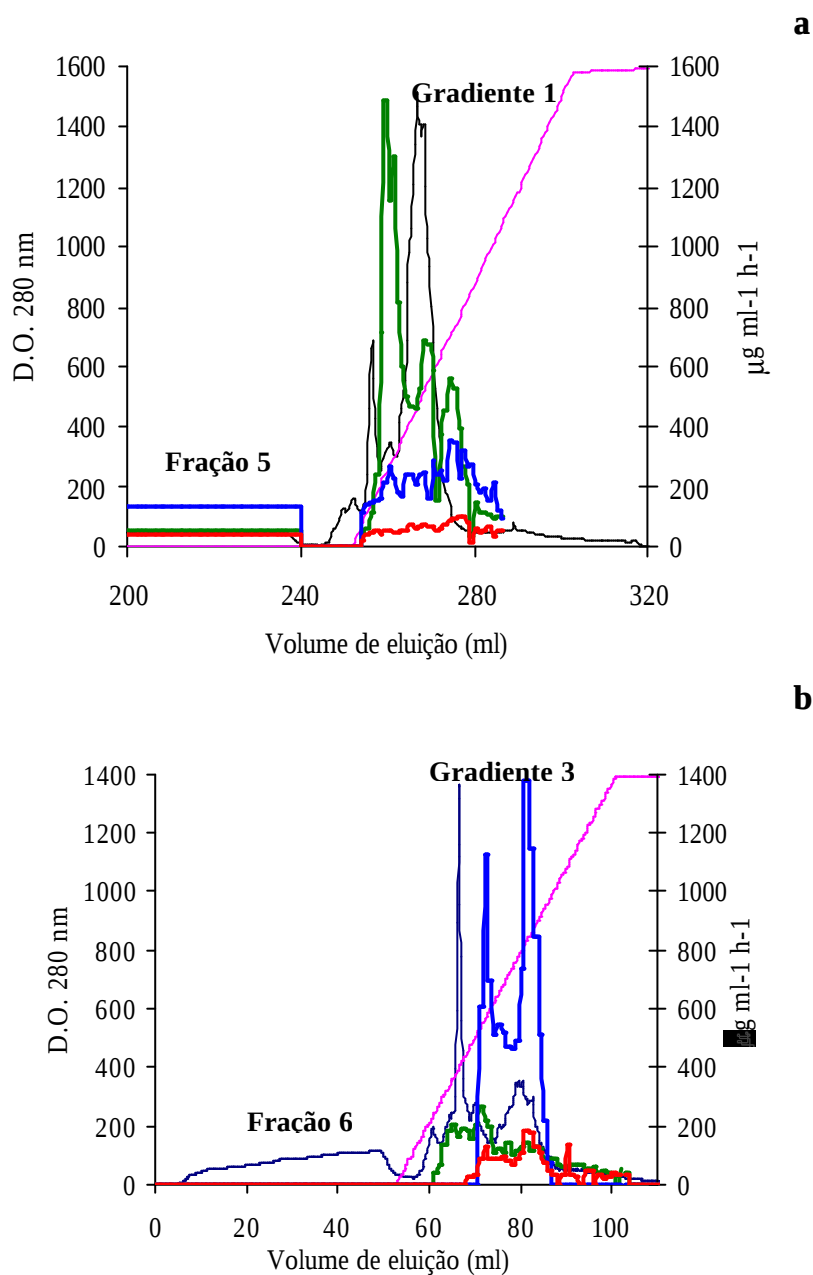


Figura 9. Cromatografia de troca catiônica em MonoS pH4,0 das (a) Fração 1, obtida da coluna MonoS da fração MQA e (b) fração 3, obtida da coluna MonoS da fração MQG. As frações são originadas do extrato enzimático de rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. A absorbância foi monitorada a 280 nm (—). As proteínas retidas foram eluídas em um gradiente linear crescente de NaCl (0 a 500 mM) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 (—). Atividade total sobre inulina (—), nistose (—) e sacarose (—).

DISCUSSÃO

Os métodos rotineiramente empregados para a purificação das enzimas do metabolismo de frutanos são semelhantes e incluem a precipitação das proteínas com sulfato de amônio, cromatografias de troca iônica, de afinidade, interação hidrofóbica e exclusão molecular (Itaya 2002). Contudo, a ordem com que estas técnicas são utilizadas difere de acordo com as características da proteína a ser purificada. Utilizando uma combinação destes métodos de purificação, Itaya (2002) isolou a 1-SST, a 1-FFT, três 1-FEHs de rizóforos e três 1-FEHs de raízes tuberosas de *P. sonchifolia*, e a 1-SST, a 1-FFT e uma 1-FEH de *V. discolor*.

A 1-SST, 1-FFT e duas 1-FEHs de raízes de *C. intybus* foram purificadas utilizando-se cromatografia de afinidade, troca aniônica (Mono Q) e troca catiônica (Mono S) (Van den Ende *et al.* 1996b, c, De Roover *et al.* 1999, Van den Ende *et al.* 2001).

Experimentos visando à purificação de 1-FEH de *V. herbacea* foram iniciados por Asega (2003). A metodologia consistiu de cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A em pH 5,0, cromatografia de troca aniônica Mono Q em pH 8,0 e cromatografia de troca catiônica Mono S em pH 5,0. A metodologia utilizada permitiu a separação de quatro frações com atividade de 1-FEH em rizóforos armazenados a 5°C, obtidos de plantas induzidas à brotação através da excisão dos ramos aéreos. Como o armazenamento no frio de plantas previamente induzidas à brotação intensifica a atividade da 1-FEH, foi sugerido que as diferentes frações ativas obtidas durante as etapas de purificação seriam referentes a diferentes isoformas de 1-FEH induzidas nestas condições.

A possibilidade da presença de subunidades, de diferentes isoenzimas, de mais de uma atividade enzimática associada a uma única proteína e da presença de complexos enzimáticos solúveis devem ser consideradas na tentativa de se purificar uma enzima. Através do comportamento das proteínas durante as etapas de purificação obtém-se uma considerável quantidade de informação bastante útil para a resolução de misturas complexas de proteínas (Rhodes 1977).

Assim, para compreender os mecanismos de regulação da mobilização de frutanos pelas FEHs de plantas de *V. herbacea* sob diferentes condições fisiológicas, foram realizados os experimentos de purificação em rizóforos de plantas em brotação natural, com vistas à comparação com os resultados obtidos anteriormente com plantas

induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos. Para tanto, a metodologia utilizada no presente trabalho foi baseada naquela utilizada por Asega (2003).

Confirmando resultados prévios (Asega 2003), as proteínas que apresentaram atividade hidrolítica sobre os substratos utilizados (inulina, nistose e sacarose) ficaram retidas na coluna de afinidade e foram eluídas com metil α D-manopiranosídeo, indicando que são glicoproteínas (figura 3) como as FEHs de inúmeras espécies de Asteraceae e Poaceae (Simpson & Bonnett 1993). Esta característica, aliada ao pH ácido ótimo para a atividade da FEH, que é de 4,5 (Asega 2003), dá suporte à hipótese de localização vacuolar para esta enzima.

A alteração de pH de 8,0 para 6,0 do tampão de eluição utilizado na coluna MonoQ (figura 4) foi necessária para a separação das frações protéicas contendo atividade de 1-FEH. Este fato evidencia a diferença existente entre o extrato enzimático de plantas em fase de brotação natural e o obtido anteriormente de plantas induzidas à brotação, que ficaram retidas na matriz quando utilizado o pH 8,0, e sugere diferentes propriedades físico-químicas para as FEHs presentes nos rizóforos de plantas em fase de brotação natural e brotação induzida.

A coluna MonoQ parece ser uma etapa importante na separação de isoformas de FEHs. Em *C. intybus*, a isoforma 1-FEH I pode ser claramente separada da 1-FEH II em MonoQ pH 6,0, que retém a 1-FEH II e exclui 1-FEH I (De Roover *et al.* 1999).

No presente trabalho diversas frações contendo atividade de 1-FEH puderam ser separadas, além da purificação até homogeneidade eletroforética de uma invertase vacuolar (EC 3.2.1.26). A fração 4A foi a que apresentou os maiores fatores de purificação já encontrados para FEH de *V. herbacea*, de 179 e 94 vezes, utilizando inulina e nistose como substratos, respectivamente (tabela 1). Esta fração apresentou mais de uma banda em SDS-PAGE (figura 8b), apesar do elevado fator de purificação obtido, quando comparado com valores reportados para outras FEH, tais como: 10 para *L. perenne* (Marx *et al.* 1997b), 41 para *H. tuberosus* (Marx *et al.* 1997a), 54 para *D. glomerata* (Yamamoto & Mino 1985), 70 para a 1-FEH II em *C. intybus* (De Roover, *et al.* 1999) e 75 para as 1-FEHs de *T. aestivum* (Van den Ende *et al.* 2003).

Outro aspecto a ser considerado, conforme já apontado por Rhodes (1977), é a dificuldade em se isolar a enzima sob uma forma estável, não modificada e a manutenção desta condição estável pelo período necessário para que todas as etapas de purificação possam ser aplicadas.

A visualização de diversas bandas nas frações que apresentaram atividade de 1-FEH, também foi observada previamente nas frações purificadas de rizóforos submetidos à brotação por excisão dos ramos aéreos (Asega 2003). O perfil protéico foi muito semelhante em ambos os casos, sendo localizada uma banda com massa molecular ao redor de 80 kDa (indicada pelas setas na figura 8b), semelhantemente a outras FEHs descritas na literatura como 68-72 kDa para a 1-FEH I (Claessens *et al.* 1990) e 64 kDa para a 1-FEH II (De Roover *et al.* 1999, Van den Ende *et al.* 2001) de *C. intybus*, 79 kDa para a FEH de *H. tuberosus* (Marx *et al.* 1997a), 69 kDa para a de *L. perenne*, (Marx *et al.* 1997b), 70 kDa para as 1-FEH w1 e w2 de *T. aestivum* (Van den Ende *et al.* 2003) e 75 kDa para a 6-FEH de *B. vulgaris* (Van den Ende *et al.* 2003b), estimados por SDS-PAGE.

Dois mecanismos de degradação exolítica de polímeros podem ser cineticamente distinguidos, i) o ataque a uma única cadeia, no qual a molécula de substrato é completamente degradada pela enzima antes desta se ligar à molécula seguinte e ii) o ataque simultâneo a múltiplas cadeias, no qual a ligação glicosídica terminal de uma molécula de substrato é hidrolisada antes da próxima molécula ser selecionada ao acaso (Marx *et al.* 1997). As frações com atividade de 1-FEH separadas de plantas de *V. herbacea* em brotação natural parecem hidrolisar as unidades de frutose terminal das moléculas de inulina através do mecanismo de ataque de múltiplas cadeias, conforme evidenciado pela produção de frutose durante as incubações com inulina. Em *C. intybus* (Claessens *et al.* 1990), *A. sativa* (Henson & Livingston 1996), *D. glomerata* (Yamamoto & Mino 1985) e *T. aestivum* (Van Riet 2005), o mecanismo pelo qual as FEHs atuam sobre o polímero é o de múltiplas cadeias.

A fração 2D purificada até a homogeneidade eletroforética apresentou exclusivamente atividade invertásica, sugerindo tratar-se de uma invertase vacuolar. Sua localização vacuolar pode ser inferida, uma vez que somente as invertases ácidas solúveis são glicosiladas. Entretanto, a seqüência parcial obtida para esta proteína através de seqüenciamento não apresentou homologia com as seqüências de invertases disponíveis no banco eletrônico de dados do programa Blast (Altschul *et al.* 1990). O valor de massa molecular estimado para esta proteína, 60 kDa, encontra-se próximo aos valores obtidos para outras invertases vacuolares, purificadas de espécies acumuladoras de frutanos, tais como, a invertase monomérica de folhas de *Lolium temulentum* L. com massa molecular de 68 kDa (Walker *et al.* 1997), uma monomérica de 62 kDa (Johnson

et al. 2003), outra monomérica de 64 kDa e duas multiméricas de 116 e 155 kDa (Obeland *et al.*, 1993) de folhas de *L. perenne*, e uma monomérica de 60 kDa de folhas de *C. intybus* (Van den Ende *et al.* 2002).

Em tecidos em crescimento, a invertase é responsável pelo fornecimento de hexoses para o metabolismo, além de facilitar o descarregamento do floema pelo aumento do gradiente da concentração de sacarose entre fonte e dreno (Ruffer *et al.* 1990).

O papel das invertases no processo de mobilização de carboidratos durante o processo de brotação e crescimento inicial dos ramos aéreos foi discutido por Asega & Carvalho (2004). Estas autoras verificaram que durante a rebrota de plantas de *V. herbacea* induzidas à brotação por excisão dos ramos aéreos, o pico de atividade de invertase antecedeu o de atividade de 1-FEH. Como a sacarose e os frutanos estão localizados no vacúolo e como a 1-FEH é inibida por altas concentrações de sacarose (Marx *et al.* 1997), foi sugerido que o aumento da atividade de invertase anterior ao da 1-FEH promove a diminuição dos níveis de sacarose, disponibilizando uma condição vacuolar ideal para a ação da 1-FEH e a consequente despolimerização de frutanos.

Todas as frações obtidas durante as etapas de purificação apresentaram atividade de 1-FEH e de invertase. Segundo Van den Ende *et al.* (2002b), as FEHs verdadeiras são capazes de degradar somente frutanos, enquanto que as β -frutofuranosidases (EC 3.2.1.26) podem degradar tanto sacarose como frutanos. Estes autores acreditam que as FEHs de plantas não poderiam ser classificadas como β -frutofuranosidases. A presença dessas β -frutofuranosidases em plantas ainda não foi bem esclarecida. Dessa forma, acredita-se que em alguns casos, a proteína purificada poderia, ainda, conter uma mistura de invertase e de FEH (Simpson & Bonnett 1993).

Os resultados obtidos com as FEHs de *V. herbacea* até o momento mostram uma purificação parcial dessas proteínas. Entretanto, a possibilidade da enzima apresentar duas atividades (inulinásica e invertásica) e destas estarem associadas apenas a uma proteína não pode ser descartada e nem tampouco a possibilidade da existência de isoformas, levando à detecção de mais de uma banda em SDS-PAGE.

A ocorrência de isoformas de FEH já foi documentada para *H. tuberosus* (Edelman & Jefford 1964), *C. intybus* (Classens *et al.* 1990, Van den Ende *et al.* 2001), *L. temulentum* (Simpson *et al.*, 1991), *L. rigidum* (Bonnett & Simpson 1993), *T. officinale* (Rutherford & Deacon 1972), *T. aestivum* (Van den Ende *et al.* 2005,

Kawakami *et al.* 2005, Van Riet *et al.* 2006). Nestes casos, as isoformas foram separadas com base nas suas cargas elétricas.

Em *V. herbacea*, assim como nas espécies citadas, o metabolismo de frutanos parece contar com um conjunto de FEHs para despolimerizar os frutanos e suprir a demanda energética da planta. Outra função importante das FEHs é a manutenção da condição osmótica das células, envolvendo o ajuste na concentração, no tamanho e no grau de polimerização dos frutanos.

Utilizando precipitação com sulfato de amônio (20-80%), cromatografia de afinidade (concanavalina A) e cromatografias de troca aniônica e catiônica, foi possível separar diversas frações com atividade de 1-FEH em rizóforos de plantas em brotação natural. Este trabalho evidenciou a diferença existente entre estas plantas, em fase de brotação natural e as plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos e submetidas à baixa temperatura estudadas por Asega (2003). Essas diferenças baseiam-se principalmente no comportamento das proteínas durante as etapas de purificação, e a ocorrência de isoformas de 1-FEH ativas diferentes nas duas condições acima descritas. Estes resultados sugerem que no processo de brotação, natural ou induzido, a mobilização de frutanos ocorre por um conjunto de proteínas com atividade hidrolítica, porém com sutis diferenças na sua estrutura física e química.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asega, A.F.** (2003). Enzimas do metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 98p.
- Asega, A.F. & Carvalho, M.A.M.** (2004). Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 313-319.
- Bonnett, G.D. & Simpson, R.J.** (1993). Fructan-hydrolyzing activities from *Lolium rigidum* Gaudin. *New Phytologist* 123: 443-451.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.** (1993). Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C.** (1997). Growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. *New Phytologist* 136: 153-161.
- Claessens, G., Van Laere, A. & De Proft, M.** (1990). Purification and properties of an inulase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology* 136: 35-39.
- Coutinho, L.M.** (2002). Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. A. L. Klein (Org), Unesp/Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, 77.
- De Coninck, B., Le Roy, K., Francis, I., Clerens, S., Vergauwen, R., Halliday, A.M., Smith, S.M., Van Laere, A. & Van Den Ende, W.** (2005). Arabidopsis AtcwINV3 and AtcwINV6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant, Cell and Environment* 28: 432-443.
- Degasperi, M.I., Itaya, N.M., Buckeridge, M.S., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2003. Fructan degradation and hydrolytic activity in tuberous roots of *Viguiera discolor* (Baker) (Asteraceae), a herbaceous species from the cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 11-21.

- De Roover, J.D., Van Laere, A. & Van den Ende, W.** (1999). Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 106: 158-163.
- De Roover, J.D., Van Laere, A., Winter, M.D., Timmermans, J.W. & Van den Ende, W.** (1999b). Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiologia Plantarum* 106: 28-34.
- Edelman, J. & Jefford, T. G.** (1964) The mechanism of fructose polymers in plants. 4. β -fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Biochemical Journal* 93: 148-161.
- Edelman, J. & Jefford, T. G.** (1968) The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* 67: 517-531.
- Frehner, M., Keller, F. & Wiemken, A.** (1984). Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal of Plant Physiology* 116: 197 - 208.
- Fukai, K., Ohno, S., Goto, K., Nanjo, F. & Hara, Y.** (1997). Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science Plant Nutrition* 43: 171-177.
- Hayashi, A.H. & Appezzato-Da-Gloria B.** (2005). The origin and anatomy of rhizophores in *Vernonia herbacea* and *V. platensis* (Asteraceae) from the Brazilian Cerrado. *Australian Journal of Botany* 53: 273-279.
- Henson, C.A. & Livingston, D.P.** (1996). Purification and characterization of an oat fructan exohydrolase that preferentially hydrolyzes β -2,6-fructans. *Plant Physiology* 110: 639-644.
- Henson, C.A. & Livingston, D.P.** (1998). Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolyzes multiple fructofuranosidic linkages. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 715-720.
- Itaya, N.M.** (2002). Purificação e caracterização comparada das enzimas de síntese e de degradação de frutanos em *Viguiera discolor* Baker e *Polymnia sonchifolia* Poep. Endl. (Asteraceae). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 155p.
- Johnson, X., Lidgett, A., Chalmers, J., Guthridge, K., Jones, E., Cummings, N. & Spangenberg, G.** (2003). Isolation and characterisation of an invertase cDNA from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal of Plant Physiology* 160: 903-911.

- Kawakami, A., Yoshida, M. & Van den Ende, W.** (2005). Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum*) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* 358: 93-101.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Livingston, D.P. & Henson, C.A.** (1998). Apoplastic sugars, fructans, fructan exohidrolase, and invertase in winter oat : responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiology* 116: 403-408.
- Mantovani, W.** (1983). Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 147p.
- Marx, S.P., Nösberger, J. & Frehner, M.** (1997). 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* 135: 267-277.
- Marx, S.P., Nösberger, J. & Frehner, M.** (1997b). Hydrolysis of fructan in grasses: a β (2,6) linkage specific fructan - β - fructosidase from stubble of *Lolium perenne*. *New Phytologist* 135: 279 - 290.
- Menezes, N.L., Muller, C. & Sajo, M.G.** (1979). Um novo e peculiar tipo de sistema subterrâneo em espécies de *Vernonia* da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil). *Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo*, 7: 33-38.
- Obenland, D.M., Simmen, U., Boller, T. & Wiemken, A.** (1993). Purification and characterization of three soluble invertases from barley (*Hordeum vulgare*) leaves. *Plant Physiology* 101: 1331-1339.
- Pollock, C. J., Cairns, A.J., Sims, I.M. & Housley, T.L.** (1996). Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. In E. Zamski and A.A. Shaffer (eds.). Photoassimilate Distribution in Plants and Crops : Source - Sink Relationships, A.A. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 97-113.
- Pontis, H.G. & Del Campillo, E.** (1985). Fructans. In P.M. Dey & R.A. Dixon (eds.). Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants, Academic Press, New York, pp. 205-226.
- Portes, M.T.** (2005). Biossíntese e degradação de frutanos em diferentes regiões do rizóforo de *Vernonia herbacea* (Vell). Rusby (Asteraceae). Dissertação de

Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 112p.

- Portes, M.T. & Carvalho, M.A.M.** (2006). Spatial distribution of fructans and fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby in different developmental phases. *Plant Science* 170: 624-633.
- Rhodes, M.J.C.** (1977). The extraction and purification of enzymes from plant tissues. In H. Smith (ed), *Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants*, Academic Press, London, pp. 245-269.
- Ribeiro Sobrinho, D.S., Buckeridge, M. S. & Carvalho, M.A.M.** (1996). Fructan hydrolase from rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell) Rusby and its role in fructan mobilization. In *Third International Fructan Conference*, Utah. Abstracts, Third International Fructan Conference, Utah, p.45.
- Ruffner, H.P., Alder, S. & Rast, D.M.** (1990). Soluble and wall associated forms of invertase in *Vitis vinifera*. *Phytochemistry* 29: 2083-2086.
- Rutherford, P.P & Deacon, A.C.** (1974). Seasonal variation in dandelion roots of fructosan composition, metabolism and response to treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Annals of Botany* 38: 251-260.
- Simpson, R.J. & Bonnett, G.D.** (1993). Fructan exohydrolase from grasses. *New Phytologist* 123: 453-469.
- Somogyi, M.** (1945). A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-63.
- Tertuliano, M.F. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (1993). Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. *New Phytologist* 123: 741-749.
- Van den Ende, W. & Van Laere, A.** (1996a). Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. *Journal of Plant Physiology* 149: 43-50.
- Van den Ende, W., Van Wouterghem, D., Dewil, E., Verhaest, P., De Loof, A. & Van Laere, A.** (1996b). Purification and characterization of 1-SST, the key enzyme initiating fructan biosynthesis in young chicory roots (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 98: 455-466.

- Van den Ende, W., Van Wouterghem, D., Verhaest, P., Dewil, E. & Van Laere, A.** (1996c). Purification and characterization of fructan: fructan fructosyltransferase from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Planta* 199: 493-502.
- Van den Ende, W., Michiels, A., Van Wouterghem, D., Clerens, S., Roover, J. & Van Laere, A.** (2001). Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEH IIa e 1-FEH IIb). Mass fingerprint of the 1-FEH II enzymes. *Plant Physiology* 126: 1186-1195.
- Van den Ende, W., Michiels, A., Le Roy, K. & Van Laere, A.** (2002a). Cloning of a vacuolar invertase from Belgian endive leaves (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 115: 504-512.
- Van den Ende, W., Michiels, A., Roover, J. & Van Laere, A.** (2002b). Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World* 2: 1281-1295.
- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Van Riet, L., Van Laere, A., Yoshida, M. & Kawakami, A.** (2003a). Fructan 1-exohydrolases. β -(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiology* 131: 621-631.
- Van den Ende, W., De Coninck, B., Clerens, S., Vergauwen, R. & Van Laere, A.** (2003b). Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants: characterisation, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel 'cell-wall invertase-like' specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris*). *The Plant Journal* 36: 697-710.
- Van den Ende, W., Yoshida, M., Clerens, S., Vergauwen, R. & Kawakami, A.** (2005). Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* 166: 917-932.
- Van Riet, L., Nagaraj, V., Van den Ende, W., Clerens, S., Wiemkem, A. & Van Laere, A.** (2006). Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 57: 213 – 223.

- Walker, R.P., Winters, A.L. & Pollock, C. J.** (1997). Purification and characterization of invertases from leaves of *Lolium temulentum*. *New Phytologist* 138: 259-266.
- Yamamoto, S. & Mino, Y.** (1985). Partial purification and properties of phleinsase induced in stem base of orchardgrass after defoliation. *Plant Physiology* 78: 591-595.

CAPÍTULO III

**Clonagem e análise funcional
do cDNA da 1-FEH de
Vernonia herbacea (Vell.) Rusby**

Resumo

Variações nas concentrações de inulina foram encontradas em rizóforos de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby durante seu ciclo fenológico e ao longo do comprimento deste órgão. Estas variações indicam processos de síntese e degradação desses compostos e um papel de composto de reserva para este carboidrato. A enzima FEH é a responsável pela degradação da inulina e encontra-se ativa nos rizóforos, especialmente na fase de brotação. Esta atividade é intensificada durante a brotação induzida pela excisão dos ramos aéreos e pelo armazenamento dos rizóforos em baixa temperatura. O objetivo deste trabalho foi a clonagem da 1-FEH de plantas de *V. herbacea* em brotação. Foram utilizados rizóforos de plantas em fase de brotação natural e de plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos seguida de armazenamento a 5 °C por uma semana, ambas com atividade elevada de 1-FEH. Duas seqüências distintas de FEH foram obtidas de plantas em fase de brotação, natural (1-FEH Natural) e induzida (1-FEH Induzida/5 °C). As seqüências foram obtidas por PCR e iPCR, utilizando oligonucleotídeos degenerados e específicos, respectivamente. A seqüência parcial do cDNA da 1-FEH Natural apresentou alta identidade com invertase e com as FEHs de outras espécies, enquanto o cDNA da 1-FEH Induzida/5°C apresentou alta identidade somente com outras FEHs. Este último cDNA foi eficientemente expresso em *Pichia pastoris* e a proteína recombinante apresentou atividade de 1-FEH. Através da análise desta seqüência de cDNA pode-se estimar, para a 1-FEH Induzida/5°C de *V. herbacea*, o peso molecular de 65,7 kDa e o pI de 5,32 e as prováveis modificações pós-traducionais da proteína.

Abstract

Variations in the inulin contents have been detected in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby during the phenological cycle and in the proximal, median and distal regions of the reserve organs. These variations indicate the occurrence of active inulin synthesis and depolymerization throughout the cycle and a role of reserve compound for this carbohydrate. FEH is the enzyme responsible for inulin depolymerization and its activity has been detected in rhizophores of sprouting plants. FEH activity can also be enhanced by excision of aerial organs and by storage of excised plants at low temperature. The aim of the present work was the cloning of a cDNA encoding for a 1-FEH from plants of *V. herbacea*. Rhizophores used as plant material were collected from plants in the sprouting phase and from plants induced to sprouting and kept at 5 °C due to their high FEH activity. Two distinct FEH sequences were obtained from sprouting plants (1-FEH Natural) and from plants induced to sprouting (1-FEH Induced/5°C) by the PCR and iPCR, using degenerated and specific primers, respectively. The partial sequence 1-FEH Natural showed identity to invertases and FEH sequences of other species, while the complete sequence 1-FEH Induced/5°C showed identity only to FEH sequences. The cDNA of 1-FEH Induced/5°C was successfully expressed in *Pichia pastoris* and the recombinant enzyme showed to be a functional 1-FEH. The estimated molecular mass was predicted to be 65.7 kDa and its predicted pI is 5.32. Some post translational modifications were also estimated for this protein.

INTRODUÇÃO

Altas concentrações de frutanos do tipo inulina são acumuladas em rizóforos de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. Os rizóforos constituem o órgão de propagação vegetativa desta espécie de Asteraceae que é nativa do cerrado, perene e com crescimento sazonal. (Carvalho & Dietrich 1993). Segundo estas autoras, variações nas concentrações de inulina nestes órgãos subterrâneos durante o ciclo fenológico desta planta indicam processos de síntese e despolimerização e um papel de composto de reserva para este carboidrato.

Os frutanos são polímeros de frutose sintetizados a partir da sacarose. Os frutanos do tipo inulina, encontrados em espécies de Asteraceae, são baseados no trissacarídeo 1-cestose e apresentam unidades de frutose unidas por ligações do tipo β (2,1). Os frutanos do tipo levano, encontrados predominantemente em espécies de Poaceae e Liliaceae e também sintetizados por bactérias, são baseados no trissacarídeo 6-cestose e apresentam unidades de frutose unidos por ligações do tipo β (2,6) (Pollock *et al.* 1996).

A enzima frutano exohidrolase (FEH) é responsável pela despolimerização dos frutanos, segundo o modelo clássico proposto por Edelman & Jefford (1968), hidrolisando de forma exolítica a unidade de frutose terminal da cadeia de frutano. Esta enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose. Os principais produtos da FEH são a frutose e a sacarose (Edelman & Jefford 1964). Dependendo do tipo de ligação entre os resíduos de frutose que é hidrolisada, pode-se distinguir a 1-frutano exohidrolase (1-FEH, EC 3.2.1.153), enzima que hidrolisa ligações β (2,1) da 6-frutano exohidrolase (6-FEH, EC 3.2.1.154), enzima que hidrolisa ligações β (2,6) (Marx *et al.*, 1997).

A FEH encontra-se ativa em rizóforos de *V. herbacea* especialmente na fase de brotação (Ribeiro Sobrinho *et al.* 1996). O aumento da atividade da FEH nos órgãos subterrâneos de reserva foi relacionado à brotação também em outras espécies de Asteraceae, acumuladoras de frutanos como *Taraxacum officinale* (Web.) Wigg (Rutherford & Deacon 1974), *Cichorium intybus* L. (Van den Ende & Van Laere 1996) e *Helianthus tuberosus* L. (Marx *et al.* 1997), Entretanto, a atividade de FEH em *V. herbacea* apresenta aumento significativo quando as plantas são submetidas à excisão da parte aérea para indução da brotação (Asega & Carvalho 2004) e em seguida, submetidas à baixa temperatura (Portes 2005). O efeito da desfolhação no aumento da

atividade da FEH foi avaliado também em *Polymnia sonchifolia* Poep & Endl (Fukai *et al.* 1997), em *C. intybus* (De Roover *et al.* 1999) e em *Viguiera discolor* Baker (Degasperi *et al.* 2003). O efeito promotor do frio na atividade da FEH em *V. herbacea* detectado por Portes (2005), também foi detectado em plantas de *C. intybus* por Van Den Ende & Van Laere (1996).

Em *V. herbacea*, a mobilização dos frutanos supre a demanda energética da planta durante o restabelecimento da parte aérea (Asega & Carvalho 2004) especialmente na região proximal dos rizóforos, onde se dá o desenvolvimento das gemas axilares que dão origem aos ramos aéreos (Portes & Carvalho 2006).

Experimentos de purificação da FEH de *V. herbacea* possibilitaram o isolamento de quatro frações com atividade de 1-FEH em rizóforos armazenados no frio, após a indução de brotação por excisão dos ramos aéreos (Asega 2003), e de diversas frações com atividade de 1-FEH em rizóforos de plantas em brotação natural (capítulo II). Foi evidenciada a diferença existente entre o extrato enzimático de plantas em fase natural de brotação e de plantas em brotação induzida, demonstrada pelo comportamento diferente das diversas frações isoladas durante as etapas de purificação, e a ocorrência de isoformas de 1-FEH ativas diferentes nas duas condições de brotação. Estes resultados sugeriram que a mobilização de frutanos em *V. herbacea* ocorre por um conjunto de proteínas que apresentam a mesma atividade hidrolítica, porém com diferentes propriedades física e química. Entretanto em nenhuma das condições acima descritas foi obtida a homogeneidade eletroforética necessária para o sequenciamento da proteína.

Assim, a clonagem do gene da FEH foi uma estratégia experimental utilizada no presente trabalho para ampliar o conhecimento sobre esta enzima e sobre o seu papel na mobilização de frutanos em *V. herbacea*. A clonagem dos genes de FEHs de diversas espécies possibilitou o estudo da função desta enzima no metabolismo de frutanos de plantas submetidas à desfolhação, baixas temperaturas, na manutenção do perfil de frutanos característicos da espécie e em sinalização. Dentre os genes clonados encontram-se o gene da 1-FEH I (Van den Ende *et al.* 2000), 1-FEH IIa e 1-FEH IIb de *C. intibys* (Van den Ende *et al.* 2001); 1-FEH w1 e 1-FEHw2 de *Triticum aestivum* L. (Van den Ende *et al.* 2003a); 6-FEH de *Beta vulgaris* L. (Van den Ende *et al.* 2003b), 6-KEHw1 e 6-KEH w2 de *T. aestivum* (Van den Ende *et al.* 2005a), 6-FEH (AtcwINV3) e 6&1-FEH (AtcwINV6) de *Arabidopsis thaliana* L. (De Coninck *et al.* 2005), 6&1-

FEHw1 (Kawakami *et al.* 2005) e 6-FEH (Van Riet *et al.* 2006) de *T. aestivum*. Além das seqüências da 1-FEH de *Campanula rapunculoides* L. (Le Roy *et al.* dados não publicados), da 1-FEH w3 de *T. aestivum* (Van Riet *et al.* dados não publicados) e da 1-FEH de *Hordeum vulgare* L. (Nagaraj *et al.* dados não publicados), disponíveis no GenBank.

A presença de isoformas de FEHs já foi documentada para diversas espécies. Entretanto, apenas com o advento da tecnologia do DNA recombinante foi possível aprofundar o conhecimento sobre o papel que estas isoformas desempenham no metabolismo de frutanos. Em *C. intybus*, por exemplo, a enzima expressa em plantas armazenadas no frio é a 1-FEH I, à qual foi sugerido um papel de proteção às plantas contra os danos causados pelo congelamento (Van den Ende *et al.* 2001). Este aumento de atividade da 1-FEH I, induzido pela baixa temperatura, resulta no aumento de hexoses e frutanos de baixo GP, que atuam no aumento da pressão osmótica, promovendo a tolerância ao frio.

Esses autores verificaram que em plantas de *C. intybus* desfoliadas, entretanto, a 1-FEH expressa é a 1-FEH II e sugeriram que esta enzima pode ser induzida em outras fases fenológicas além da fase de brotação, durante a qual a demanda energética da planta aumenta (Van den Ende *et al.* 2001). A análise da região promotora da 1-FEH IIa, uma isoforma da 1-FEH II, mostrou que este gene é altamente expresso também em raízes armazenadas no frio, o que indica o efeito promotor do frio na expressão deste gene e que esta indução deve ter um papel importante na tolerância ao frio em plantas acumuladoras de frutanos (Michiels *et al.* 2004).

O estudo das 1-FEHs em caule de trigo (*T. aestivum*) realizado por Van den Ende *et al.* (2003a) indicou a ocorrência de uma isoforma (1-FEH w2) ativa na fase de biossíntese de frutanos que controla o comprimento das cadeias ramificadas, impedindo seu alongamento. Os autores sugeriram o papel desta 1-FEH na determinação do grau de polimerização final dos frutanos mistos e ramificados, característicos desta espécie.

Duas isoformas de 6-cestosidases (6-KEH) também foram clonadas, purificadas e caracterizadas em trigo (*T. aestivum*) por Van den Ende *et al.* (2005a). Os autores propuseram que estas 6-KEHs presentes no fluído apoplástico, juntamente com outras FEHs, atuariam controlando a concentração de frutanos presentes no apoplasto e contribuindo para o aumento da tolerância ao congelamento. Outra FEH relacionada com a tolerância ao congelamento foi caracterizada em trigo por Kawakami *et al.*

(2005). Esta enzima foi denominada 6&1FEH w1 por esta degradar ambas ligações β (2,1) e β (2,6), mas preferencialmente ligações do tipo β (2,6), e pelo fato da 1&6cestotetraose ser um excelente substrato para a enzima. Ainda em trigo, uma 6-FEH foi purificada, clonada e caracterizada por Van Riet *et al.* (2006), sendo este o primeiro relato da presença de uma 6-FEH em plantas acumuladoras de frutanos.

A detecção da atividade de 6-FEHs em algumas plantas não acumuladoras de frutanos levou à hipótese de que esta enzima estaria atuando no processo de defesa em plantas. Esta hipótese foi sugerida após a purificação, caracterização e clonagem de uma 6-FEH a partir de raízes de *B. vulgaris* por Van den Ende *et al.* (2003b). Os autores sugeriram que a atividade elevada de 6-FEH, presente nesta planta, previne o acúmulo de frutanos do tipo levano, sintetizados por bactérias fitopatogênicas, como *Pseudomonas* e *Erwinia*. O levano, sintetizado por bactérias, tem um papel importante durante a fase inicial de infecção, constituindo uma camada capaz de separar a bactéria dos polímeros da parede celular, uma maneira de prevenir o reconhecimento do patógeno pela planta.

A hipótese da atuação da 6-FEH nos processos de defesa e de sinalização foi recentemente reforçada pelos estudos de Van den Ende *et al.* (2005) em trigo e De Coninck *et al.* (2005) em *A. thaliana*. No primeiro caso, os autores detectaram a presença de 6-KEHs no fluído apoplástico e no segundo, foi verificado que as AtcwINV3 e AtcwINV6 não são invertases, mas sim FEHs verdadeiras com diferentes especificidades pelo substrato, sendo a AtcwINV3 uma 6-FEH e AtcwINV6 uma 6&1-FEH, que degrada ambas ligações β (2,1) e β (2,6). Os autores verificaram que extratos enzimáticos de folhas submetidas ao estresse por excisão e iluminação contínua quando incubados com sacarose, produziram trissacarídeos da série de frutanos (De Coninck *et al.* 2005). Esses resultados sugeriram que a presença das FEHs estaria relacionada com os processos de i) degradação destes trissacarídeos, removendo o sinal de estresse, ii) degradação de frutano exógeno, prevenindo a infecção microbiana; e iii) desintoxicação, prevenindo o acúmulo de frutanos mesmo após a infecção microbiana ocorrer. Os efeitos tóxicos do levano foram verificados quando os genes de levansucrases, enzimas que sintetizam os levanos em bactérias, foram expressos em plantas não acumuladoras de frutanos que apresentaram atrofia, branqueamento das folhas, necrose, massa e número de tubérculos reduzidos, descoloração do córtex do tubérculo, redução no acúmulo de amido e aglutinação dos cloroplastos (Cairns 2003).

Com base nos resultados de purificação de 1-FEH obtidos de plantas de *V. herbacea* em fase de brotação natural e de plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos, e armazenadas em baixa temperatura, os quais sugeriram a ocorrência de isoformas desta enzima, o presente trabalho teve como objetivo a clonagem de seqüências de cDNA de 1-FEHs nas duas condições de brotação mencionadas para verificar a ocorrência de um conjunto de proteínas responsáveis pela mobilização de frutanos em *V. herbacea*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Northern blotting

Foram utilizados rizóforos e folhas de plantas de *Vernonia herbacea* (Vell) Rusby (SP 169567) em fase vegetativa coletadas no mês de fevereiro, rizóforos de plantas em fase vegetativa induzidas à brotação (denominadas Induzidas) e rizóforos de plantas em fase vegetativa induzidas à brotação e armazenados a 5 °C por sete dias (denominadas Induzidas/5 °C). Para a indução à brotação, as plantas foram submetidas à excisão dos ramos aéreos e mantidas por 20 dias nos canteiros da Seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica sob condições ambientais naturais. Após este período, os rizóforos das plantas foram coletados, lavados e parte dos rizóforos foi armazenada a 5 °C por sete dias. Os rizóforos foram separados em regiões proximal, mediana e distal, para se verificar a ocorrência de distribuição espacial diferencial de expressão da 1-FEH ao longo do eixo de crescimento dos rizóforos. Após lavagem, folhas e rizóforos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 °C até a realização das análises.

Extração de DNA

Foram utilizadas folhas de plantas de *V. herbacea* coletadas no mês de agosto de 2006 dos canteiros da Seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica. As

folhas foram lavadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até a realização das análises.

Clonagem de 1-FEHs de rizóforos de *Vernonia herbacea*

Para a clonagem do gene que codifica a 1-FEH foi utilizada a região proximal dos rizóforos de plantas em fase de brotação natural coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu na data de amostragem de maior atividade de 1-FEH para o período (09 de setembro), como mostrado no capítulo IV. Foi utilizada também a região proximal dos rizóforos de plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5°C por sete dias, condições que intensificam a atividade de 1-FEH. Para tanto, plantas na fase vegetativa, cultivadas nos canteiros da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica sob condições ambientais naturais, foram induzidas à brotação por excisão dos ramos aéreos e mantidas no canteiro por 20 dias. Este tempo foi determinado segundo resultado obtido por Asega & Carvalho (2004) que mostra que o aumento da atividade da 1-FEH ocorre aproximadamente 21 dias após a excisão dos ramos aéreos em plantas submetidas a este tratamento, quando as plantas encontram-se em brotação. Após este período, os rizóforos destas plantas foram coletados, lavados e armazenados a 5°C por sete dias. Em seguida, os rizóforos foram lavados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C até a extração de RNA.

Extração de RNA total para a realização do *Northern blotting*

Os RNAs totais foram extraídos separadamente das regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos e de folhas de *V. herbacea*. As amostras congeladas (1,0 g de tecido) foram homogeneizadas em 10 mL de *Trizol*[®] (Invitrogen) utilizando-se almofariz e pistilo. O homogeneizado foi agitado em vórtex por 5 min e centrifugado por 30 min a 1.000 *g* a $2-8^{\circ}\text{C}$ para eliminação dos polissacarídeos. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de *Trizol*[®], sendo a mistura mantida em temperatura ambiente por 3-5 min. Após centrifugação por 10 min a 1.000 *g* a $2-8^{\circ}\text{C}$, houve a separação de duas fases. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para novo tubo, sendo adicionado para cada 1 mL de amostra, 0,3 mL de isopropanol – para a precipitação do RNA – e 0,3 mL de citrato de sódio 1,5 M – para manter a solubilidade dos polissacarídeos. Após incubação por 10 min a temperatura ambiente, o material foi submetido à centrifugação por 10 min a 12.000 *g* a $2-8^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70 % (v/v). Após

centrifugação por 10 min a 12.000 *g* a 2-8 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em tampão TE pH 8,0. Ao precipitado foram adicionados 3 volumes de etanol e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M. O precipitado obtido após centrifugação por 15 min a 12.000 *g* foi seco ao ar e ressuspensionado em TE pH 8,0.

Extração de RNA total para a síntese de cDNA

Os RNAs totais dos rizóforos foram extraídos utilizando-se o *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) com a finalidade de otimizar o procedimento.

Extração do DNA

O DNA foi extraído de folhas utilizando-se o método de CTAB modificado por Michiels *et al* (2003). As folhas (1,0 g de tecido) foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para 15 mL de tampão de extração pré-aquecido a 60 °C, contendo Tris 100 mM, pH 8, cloreto de sódio 1,4 M, EDTA 20 mM pH 8, 0,2 % β -mercaptoetanol (v/v), 2 % de PVP (p/v) e 2 % de CTAB (p/v). Após incubação a 60 °C por 1 hora, foram adicionados 15 mL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) e esta foi agitada em vórtex e centrifugada por 5 min a 2.500 *g*. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e esta etapa foi repetida por mais duas vezes. A fase aquosa foi misturada por inversão com 2/3 do seu volume de isopropanol e incubada a 25 °C por 17 horas para precipitação dos ácidos nucleicos. Após centrifugação por 15 min a 5.000 *g*, o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 15 mL de solução de lavagem, contendo acetato de amônio 10 mM e etanol 70 % (v/v). A incubação por pelo menos 15 min em temperatura ambiente foi seguida de centrifugação a 2.500 *g* por 6 min. Esta etapa foi repetida mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco foi ressuspensionado em tampão TE e incubado a 37 °C com RNase A para uma concentração final de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 30 min. Após esta incubação, foi adicionado um volume da mistura fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v), agitado em vórtex e centrifugado por 5 min a 2.500 *g*. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado um volume da mistura clorofórmio : álcool isoamílico (24:1 v/v). Após centrifugação por 5 min a 2.500 *g*, foram adicionados à fase aquosa dois volumes de etanol resfriado e acetato de amônio na concentração final de 2,5 M, que foram agitados em vórtex e incubados no gelo por

alguns minutos. Os ácidos nucléicos foram precipitados por centrifugação a 5.000 *g* por 10 min a 4 °C, lavados com etanol 70 % por duas vezes, secos e ressuspensos em 100 µL de água livre de DNase.

Análise qualitativa e quantitativa de ácidos nucléicos

Os ácidos nucléicos, DNA e RNA isolados foram quantificados espectrofotometricamente pela determinação da absorbância a 260 nm e avaliados quanto à sua pureza pela razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm. A qualidade do RNA foi avaliada pela presença das bandas correspondentes ao RNA ribossomal 25S e 18S e a qualidade do DNA genômico foi avaliada pela presença de uma única banda de alto peso molecular quando estes foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), preparado em tampão 1X TPE pH 8,0 conduzida sob voltagem constante (70 V) e visualizados por meio de coloração com brometo de etídeo (0,01ng µL⁻¹) sobre luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

Digestão do DNA genômico de *V. herbacea*

Foram utilizados 10 µg de DNA extraídos de folhas de *Vernonia herbacea* para cada reação de digestão. Diversas enzimas de restrição foram utilizadas: Eco RI, Dra I, Xba I, Xho I, Sac I, Kpn I e Pst I, que não reconhecem sítios internos à ORF da 1-FEH “Induzida/5 °C” de *Vernonia herbacea* utilizada como sonda, e Bgl II, Hind III e Eco RV, que reconhecem um ou dois sítios internos à ORF. As reações de digestão foram realizadas a 37 °C por 19 horas. Após a verificação da digestão total de uma pequena parte do volume de DNA, foi adicionado EDTA 0,5 M pH 8,0 para a interrupção da reação. O DNA foi precipitado com a adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3,0 M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto e armazenamento a -70 °C por 15 horas. Após centrifugação a 13000 *g* por 30 min, o precipitado foi lavado com etanol 70 % (v/v) e centrifugado novamente por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco e ressuspensado em água deionizada autoclavada.

O DNA digerido (10 µg) foi fracionado em gel de agarose 0,7 % (p/v) preparado em tampão 1X TPE pH 8,0 e brometo de etídeo, conduzido sob voltagem constante (20 V) (Sambrook *et al.*, 1989).

Northern blotting

Foram utilizados os RNAs das regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos de 1) plantas em fase vegetativa, 2) plantas induzidas à brotação, 20 dias após a excisão dos ramos aéreos, 3) plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C por sete dias e 4) folhas de plantas em fase vegetativa. O RNA total (20 µg) foi fracionado em gel de agarose 1,2% contendo formaldeído (2,2 M) e transferido para uma membrana de nylon positivamente carregada (*HybondTMN⁺*, Amersham Biosciences), após desnaturação em solução de hidróxido de sódio 0,05 M e cloreto de sódio 0,01 M e neutralização com Tris HCl 0,1 M pH 7,4. A transferência forçada a vácuo foi feita durante duas horas em tampão 20x SSC (cloreto de sódio 3 M e citrato de sódio 0,3 M), utilizando o *VacuGeneTM XL Vacuum blotting System* (Pharmacia Biotech). O RNA foi permanentemente fixado à membrana por exposição à radiação UV, sendo esta corada com azul de metileno 0,04 % (p/v) em acetato de sódio 0,5 M pH 5,2 para visualização dos rRNAs e dos padrões (RNA markers 0,2 – 10 kB, Sigma). A membrana foi pré-hibridizada e hibridizada com a sonda radioativa de cDNA de *Cichorium intybus* (AJ 295033) preparada a partir de um clone cedido pelo Dr. Win Van den Ende da Universidade Católica de Leuven (Bélgica). A sonda foi produzida pela marcação de fragmento do cDNA da FEH com [³²P] α-dCTP, utilizando *MegaprimeTM DNA labelling Systems* (Amersham) e as condições de hibridização utilizadas foram: 5 x SSC (cloreto de sódio 0,75 M e citrato de sódio 0,075 M), 0,5 % de SDS, 5 x Solução de *Denhardt* e 1 mg mL⁻¹ de espermatozoides de salmão, a 65 °C por uma noite. As membranas foram lavadas duas vezes com solução 2x SSC (cloreto de sódio 0,3 M e citrato de sódio 0,03 M) contendo 0,1 % de SDS por 10 min a temperatura ambiente e uma vez com solução 1x SSC (cloreto de sódio 0,15 M e citrato de sódio 0,015 M) contendo 0,1 % de SDS por 20 min a 65 °C. Após lavagem, um filme de auto-radiografia foi posicionado sobre a membrana hibridizada e estes foram mantidos na ausência de luz no interior de um cassete. O tempo de exposição foi de 5 dias a -70 °C (Sambrook *et al.* 1989). Após a exposição, o filme foi revelado manualmente em câmara escura por meio da seguinte sequência de lavagens: 4 min em solução reveladora (Kodak), 1 min em água destilada, 4 min em solução fixadora (Kodak), seguida de lavagem em água corrente.

Comparação das seqüências de aminoácidos das FEHs de outras espécies

Os primeiros oligonucleotídeos utilizados para amplificar o cDNA da 1-FEH de *Vernonia herbacea*, apresentados abaixo, foram desenhados com base nas regiões de consenso observadas nos alinhamentos entre as seqüências disponíveis de FEH, obtidos com o programa Clustal W (figura 1):

P1 S 5'-AACTGGATGAA(C/T)GA(T/C)CC(A/T)AA(C/T)GG(A/T)CCAATG-3'

P7 R 5'-GG/C G(A/T)A(A/G)AA(G/A)TC(A/T)GG(A/G)CA(C/T)TCCCA -3'

Na figura 1 são apresentadas as seqüências utilizadas para a construção dos oligonucleotídeos degenerados, sendo que os trechos de consenso selecionados estão destacados em negrito.

w2	DSPSDDLEKGWAGLHTIPRTIWLADGDKQLLQWPVEEIESLRTNEISHQGIELNKGDLFE
w1	DSPSDDLEKGWAGLHTIPRTIWLADNGKQLLQWPVEEIESLRTNEISHQGIELNKGDLFE
w3	DSPSDDLAKGWAGLHTIPRTIWLADGDKQLLQWPVEEIESLRTNEINHQGIELNKGDLFE
hvu1	DSPSDDLAKGWAGLHTIPRTIWLADGDKQLLQWPVEEIESLRTNEINHQGIELNKGDLFE
bvu1	SI0ADDIKKGWSGVOAIPRTVVLDKSGKOLVOWPLAEVDMLRENDVELPSOVTKGGSLVE

ciI	DSESDAVKKGWSGLQSFPRSIWLSNNRKQLVQWPVDEILKLRTKQVNITNRELAAGELLK
ciIIa	DSQADDIEKGWAGLQSFPRALWIDRNGKQLIQWPVEEIEELRQNVNLQKNLKPQSVLE
ciIIb	DAPEDDIEKGWAGLQSFPRALWIDRSGKQLIQWPVEEIEELRQNEVNLQKNLKPQSVLE . * : ***:*.::*:*.:: : . ***:***: * : ** :.. : * :..:
w2	IKEVDAFQADVEIDFELASIDDADPFDPDWLLDPEKHCGEAGASVPGGIGPFGLVILASD
w1	IKEVDAFQADVEIGFELASIDDADPFDPDWLLDPEKHCGEAGASVPGGIGPFGLVILASD
w3	IKEVDAFQADVEIGFELASIDDADPFDPDWLLDPEKHCGEAGASVPGGIGPFGLVILASD
hvu1	IKEVDAFQADVEIDFELASIDEAEPFDPDWLLDPEKHCGEAGASVPGGIGPFGLVILASD
bvu1	ISQITASQADVEISFKIPESNYVEELD-STCTNPQILCSQKGASIKGRFGPFGLTLASM
ciI	IPSITASQADVEVSFSLTNLTEIELID-SEVVDPQLLCAQKNVISGKFGPFGMLILASK
ciIIa	IHGIAASQADVTISFKLEGLKEAEVLD-TTLVDPQALCNERGASSRGALGPFGLLAMASK
ciIIb	IHGITASQADVTISFKLEELKDAEVLD-TTSVDPQVLCNERGASSRGAIGPFGLLAMASK * : * *** :*.:: : :* : :*: * : ..* * :*****: :**
w2	NMDEHTEVYFRVYKSQE -KYMVLMCSDLRRSSLRPDLEKPAYGGFFFDLEKERKISLRT
w1	NMDEHTEVYFRVYKSQE -KYMVLMCSDLRRSSLRPDLEKPAYGGFFFDLEKERKISLRT
w3	NMDEHTEVYFRVYKSQE -KYMVLMCSDLRRSSLRPDLEKPAYGGFFFDLEKERKISLRT
hvu1	NMDEHTEVYFRVYKSQE -KYMVLMCSDLRRSSLRPGLEKPAYGGFFFDLAKERKISLRT
bvu1	GLEEYTAFFFRIFKGP -KYVVLMCSDQTRSSLNPTTDKLSFGIFVDVDPINE-DLSLRI
ciI	NLTQTAFFFRVFKGP -KFLVLMCSQSRSSIAQEVDKSIYGAFLDLPLHE- KIPLRS
ciIIa	DLKEQSAIFFRVFNQQLGRYSVLMCSDLRSTVRSNIDTTSYGAFVDIDPRSE- EISLRN
ciIIb	DLKEQSAIFFRVFNQQLGRYSVLMCSDLRSTVRSNIDTTSYGAFVDIDPKSE- EISLRN .. * : :*.::.. : :***** **:: :. :* *..* * ..**
w2	LIDRSVESFSGGGGRVCITSRVYPAVLADVGRAHIYAFNNGSATVRVPQLSAWTMRKAQV
w1	LIDRSVESFSGGGGRVCITSRVYPAVLADVGRAHIYAFNNGSATVRVPQLSAWTMRKAQV
w3	LIDRSVESFSGGGGRVCITSRVYPAVLADVGSAGHIYAFNNGSATVRVPQLSAWTMRKAQV
hvu1	LIDRSVESFSGGGGRVCITSRVYPAVLAVGRAHIYAFNNGNAMVRVPQLSAWTMRKAQV
bvu1	LIDHSIVESFSAGKGCITARVYPTMAIND-KAKLYVFVNNGTEDVKITKLSAWSMKKAQI
ciI	LIDHSIVESFSGGEGIACITSRVYPKLAINE-QAELYVFVNNGTQSVTMSTLNAWSMKRAQI
ciIIa	LIDHSIIESFSGAGGKTCITSRIYPKFVNNE-EAHLFVFVNNGTQNVKISEMSAWSMKNAKF
ciIIb	LIDHSIIESFSGAGGKTCITSRIYQFVNNE-EAHLFAFNNGTQNVKISKMSAWSMKNAAF ***.* :***. * ***:***. : * :..:***. * :. :.***:..*
w2	NVEKGWSAI-----
w1	NVEKGWSAI-----
w3	NVEKGWSAI-----
hvu1	NVEKGWSAI-----
bvu1	NLSTDNTSNMSYNSNKVEKEEF
ciI	VPIG-----
ciIIa	VVDQSVKSAA-----
ciIIb	VVDQNVKSAA-----

Figura 1. Alinhamento das seqüências de aminoácidos que constituem algumas das seqüências de FEHs utilizadas para o planejamento de oligonucleotídeos: três de *T. aestivum*, denominadas w1 (AJ 516025), w2 (AJ 508387) e w3(AJ 564996), três de *C. intybus*, denominadas ciI (AJ 242538), ciIIa (AJ 295033) e ciIIb (AJ 295034), uma de *H. vulgare* (hvu1) (AJ 605333) e uma de *B. vulgaris* (bvul) (AJ 508534). Os asteriscos indicam resíduos idênticos em todas as seqüências, dois pontos indicam substituições conservadas e um ponto indica substituições semiconservadas. Em negrito estão destacados os trechos das seqüências utilizadas para a construção dos oligonucleotídeos degenerados.

Estratégia de clonagem do cDNA da 1-FEH obtido de rizóforos de plantas induzidas à brotação.

Amplificação do cDNA

A primeira fita de DNA complementar (cDNA) foi obtida através da reação catalisada pela *Super Script II RNase H Reverse Transcriptase* (RT) (Invitrogen), utilizando RNA total da região proximal de rizóforos de plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos e armazenadas à 5 °C e o oligonucleotídeo poli-dT (12-18 nucleotídeos) como iniciador. A sequência do gene da FEH foi obtida a partir da amplificação do cDNA por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos degenerados sintetizados com base nas regiões conservadas de outras sequências já conhecidas de FEHs. As condições utilizadas para a PCR foram: 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 60 °C por 30s, e de extensão a 72 °C por 2 min, seguidos de extensão final a 72 °C por 7 min. As reações consistiram de 0,5 mM de oligonucleotídeos, 7,5 mM de magnésio, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µL da reação de cDNA descrito acima diluído 10 vezes e 2,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) em 25 µL de volume de reação. O tamanho do produto da reação da PCR esperado era de aproximadamente 600 pb.

A sequência completa do cDNA da 1-FEH foi obtida pela aplicação da técnica de *Inverse Polymerase Chain Reaction* (iPCR) (Sambrook & Russell, 2001) com pequenas modificações. A partir da primeira fita do cDNA, foi sintetizada a segunda fita de cDNA utilizando-se DNA polimerase I (Promega) e RNase H. O cDNA dupla-fita foi circularizado por ligação das extremidades utilizando T4 DNA ligase, produzindo um cDNA dupla-fita circular que foi utilizado como molde para a PCR.

Para a amplificação do fragmento foram desenhados oligonucleotídeos (R1-5'-CGAAAGTAGCGGCATACGGATTG-3' e S1-5'TCAAGTTCAAGACCTCGCCTGG-3') baseados na sequência de 600 pb amplificada com a combinação dos oligonucleotídeos P1 e P7, denominada "Induzida/5 °C". Após vários testes, as melhores condições de amplificação pela PCR foram as seguintes: 60 °C de temperatura de pareamento, 0,5 mM de oligonucleotídeos, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µL de cDNA molde diluído 1000 vezes e 2,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). O tamanho do produto da reação da iPCR esperado era de aproximadamente 1.800 pb.

Estratégia de clonagem do cDNA da 1-FEH obtido de rizóforos de plantas em fase de brotação natural.

Amplificação do cDNA

A primeira fita de cDNA foi obtida através da reação catalisada pela *Super Script II RNase H RT* (Invitrogen), utilizando RNA total da região proximal de rizóforos de plantas em fase natural de brotação no ponto de maior atividade de 1-FEH (como mostrado no capítulo IV) e oligonucleotídeo poli-dT (12-18 nucleotídeos) como iniciador. A sequência do gene da FEH foi obtida a partir da amplificação do cDNA, utilizando-se os oligonucleotídeos P1 e P7 e as condições da PCR já descritas.

A sequência parcial foi obtida pela técnica de iPCR (Sambrook & Russell, 2001), como descrito no item anterior. Para a amplificação do fragmento foram utilizados oligonucleotídeos (NatR1-5'- GTTGTGTTGGAAGAAGAGATGG -3' e NatS1- 5'- CTCTGAAAACCGCCAAGTC-3') baseados na sequência de 600 pb amplificada com a combinação dos oligonucleotídeos P1 e P7, denominada "Natural". Após vários testes, as melhores condições de amplificação pela PCR foram as seguintes: 60 °C de temperatura de pareamento, 0,5 mM de oligonucleotídeos, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µL da reação de cDNA descrito acima diluído 1000 vezes e 2,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen). O tamanho do produto da reação da iPCR esperado era de aproximadamente 1.800 pb.

Clonagem e transformação

Os fragmentos obtidos pela PCR com oligonucleotídeos degenerados e aqueles obtidos pela iPCR foram purificados por *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), ligados ao vetor pGEM-T (*pGEM-T Easy Vector*, Promega) e as reações de ligação foram utilizadas para transformação de células competentes de *Escherichia coli* (linhagem TOP 10 F', Invitrogen ou XL1Blue MRF', Stratagene) via transformação química, de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Os transformantes foram selecionados em placas de cultura com meio LB/agar suplementadas com 0,5 mM de IPTG, 80 µg mL⁻¹ de X-Gal e 100 µg mL⁻¹ de ampicilina utilizada como agente de seleção. Os transformantes foram visualizados após um período de incubação de 16 horas a 37 °C.

Análise por PCR das colônias transformantes

A análise foi realizada por meio de PCR, utilizando-se um inóculo de cada colônia resistente ao meio seletivo, juntamente com os oligonucleotídeos M13R(5'CAGGAAACAGCTATGAC3') e M13F (5'GTAAAACGACGGCCAGT3').

As condições utilizadas para a PCR foram: 94 °C por 5min, seguido de 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 58 °C por 30s e de extensão a 72 °C por 2 min, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 min e 4 °C por 5 min. As reações consistiram de mistura de 0,5 mM de oligonucleotídeos, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 3,0 μL de inóculo e 2 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) em 20 μL de volume de reação. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas visualizadas por meio de coloração com brometo de etídeo ($0,01ng \mu L^{-1}$) sob luz ultravioleta (Sambrook *et al.*, 1989).

Extração de DNA plasmidial

Para confirmar a autenticidade desses clones recombinantes, extraiu-se o DNA plasmidial das colônias transformadas utilizando-se o Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega), conforme as recomendações do fabricante. As colônias transformadas foram utilizadas como inóculo em 5 mL de meio LB suplementado com $100 \mu g mL^{-1}$ de ampicilina sendo mantido em agitador orbital a 200 rpm, a 37 °C por 16 horas. Após centrifugação a 10.000g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano foi utilizado para a extração de DNA plasmidial.

Seqüenciamento e análise das seqüências

O DNA plasmidial das colônias transformadas foi seqüenciado utilizando-se o *Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences) e os oligonucleotídeos M13R e M13F, em sistema *ALFwin Express Sequencer* (Pharmacia Biotech). Para a obtenção das seqüências completas, um novo seqüenciamento foi realizado, utilizando oligonucleotídeos específicos desenhados com base nas seqüências denominadas “1-FEH Induzida/ 5 °C” e “1-FEH Natural:

1-FEH Induzida/5°C:

iPCRS1 5'-GATACGGGAACCTTTTATGCCTC-3'

iPCRS2 5'-ATGATGCGAAGAACAGGAGG-3'

iPCRR1 5'-GTGGACCAGAACAAGAAGAC-3'

iPCRR2 5'-TGGAGGTTGGAAATGGTAGC-3'

1-FEH Natural:

iPCRNatS 5'- GCGTTTCCTTACCAATCCTCCG - 3'

Após o seqüenciamento, os fragmentos tiveram suas identidades confirmadas por comparação com outras seqüências através do programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). O peso molecular e o pI da 1-FEH Induzida/5 °C foram estimados pelo programa *Identification And characterization (pI/MW)* (Gasteiger *et al.*, 2005) e a ocorrência de peptídeo sinal e prováveis sítios de processamento foram avaliados utilizando-se os Programas Predotar e Signal P (Small *et al.*, 2004). Os prováveis sítios de glicosilação, fosforilação e miriostilação foram estimados através do programa Prosite (Hulo *et al.*, 2006). Os mapas de restrição foram definidos pelo programa DS GENE 1.1 (*Software for nucleic acid and protein sequence analysis*, Accelrys).

Expressão heteróloga da 1-FEH “Induzida/5 °C” de *Vernonia herbacea* em *Pichia pastoris*

Clonagem em vetor pPICZαA e transformação em *E.coli*

A seqüência clonada em vetor pPICZαA (Invitrogen) foi obtida a partir da amplificação do cDNA por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos sintetizados com base na provável seqüência aminoterminal da 1-FEH Induzida/5 °C, inferida através do alinhamento das seqüências de aminoácidos de FEHs de outras dicotiledôneas. Os oligonucleotídeos foram construídos contendo adaptadores que consistiram dos sítios de restrição das enzimas NotI e EcoRI, indicados em negrito nos oligonucleotídeos:

VHFEHR 5'-AGAGAG**CGGCGC**CTTGCTTTTCGACATAAATTACCC-3'

VHFEHS 5'AGAG**GAATT**CCAGATTATTGAACAACCGTATCG-3'

As condições utilizadas para a PCR foram: 94 °C por 5min, seguido de 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 60 °C por 30s e de extensão a 68 °C por 2 min, seguidos de extensão final a 68 °C por 10 min e 4 °C por 5 min. As reações consistiram de 0,5 mM de oligonucleotídeos, 1 mM de magnésio, 0,3 mM de dNTPs, 1 µL de cDNA molde e 2,5 unidades de *Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen) em 20 µL de volume de reação. O tamanho do produto da reação da PCR esperado era de aproximadamente 1.600 pb.

Inicialmente, o fragmento foi clonado em um vetor TOPO XL para garantir as extremidades coesivas, contendo os adaptadores, necessárias para a posterior clonagem direcionado em vetor pPICZαA. Desta forma, para permitir a clonagem do fragmento no vetor TOPO XL, o fragmento amplificado teve a adição de adenina nas suas extremidades. A reação consistiu de 5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 1 mM de dATP, 1,3 µg do fragmento amplificado na PCR descrita acima em 10 µl de volume de reação e incubação a 70 °C por 30 min, seguidos de 4 °C por 5 min. O fragmento foi ligado ao vetor TOPO XL e transformado em *E.coli* (TOP 10, *TOPO XL PCR cloning kit*, Invitrogen) via transformação química. Os transformantes foram selecionados em placas de cultura com meio LB/agar suplementadas com 50 µg mL⁻¹ de canamicina, utilizada como agente de seleção. As colônias crescidas em meio LB/agar suplementado com canamicina foram submetidas à PCR utilizando os oligonucleotídeos M13R e M13F para a verificação da presença do inserto e, desta forma, selecionar as colônias positivamente transformadas.

O DNA plasmidial do transformante positivo selecionado foi obtido utilizando-se o *Fast Plasmid Kit* (Eppendorf), seqüenciado para confirmação do fragmento da 1-FEH de *V. herbacea* e digerido com *NotI* e *EcoRI* (Roche).

O fragmento de interesse foi separado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) contendo brometo de etídeo (0,1 ng µL⁻¹) preparado em tampão 1x TAE e conduzido sob voltagem constante (100 V). Em seguida o fragmento foi recortado do gel e purificado utilizando o protocolo de extração *Qiaquick Gel* da *QIA Quick Nucleotide Removal Kit* (Qiagen).

O vetor pPICZαA, inicialmente transformado em *E. coli*, foi obtido utilizando-se o *Fast Plasmid Kit* (Eppendorf), sendo em seguida digerido com *NotI* e *EcoRI* (Roche) e purificado utilizando-se o protocolo de purificação de PCR do *QIA Quick Nucleotide*

Removal Kit (Qiagen). Após a purificação, o vetor foi desfosforilado por uma fosfatase alcalina (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Promega).

O fragmento foi ligado ao vetor pPICZ α A na proporção 2:1, utilizando *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) e a mistura de ligação foi utilizada para transformação química de *E. coli* competentes (*One Shot Cells TOP 10*, Invitrogen), conforme recomendações dos fabricantes. Os transformantes foram selecionados em placas de cultura com meio 2xYT /agar suplementado com 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de zeocina como agente de seleção.

Preparação do vetor pPICZ α A contendo o gene de interesse

As colônias crescidas em meio 2x YT/agar suplementado com 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de zeocina foram submetidas à PCR utilizando-se os oligonucleotídeos 5'AOX (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') e 3'AOX (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') para a verificação das colônias positivamente transformadas.

Foram selecionados três transformantes positivos que foram preparados para posterior transformação em células de *Pichia pastoris*. Os plasmídeos foram obtidos utilizando-se o *Quantum Preptm Plasmid Midiprep Kit* (Bio Rad).

Os plasmídeos foram linearizados com a enzima de restrição SacI (Roche) e purificados utilizando-se o *QIAquick Nucleotide Removal Kit* e precipitação com etanol sendo, em seguida, ressuspendidos em água deionizada autoclavada.

Preparação das células de *Pichia pastoris*

Foram utilizadas as células de *Pichia pastoris* da cepa X-33, que é o genótipo selvagem usado para seleção com zeocina e na produção em larga escala. O preparo da pré-cultura de células consistiu de meio YPD e células X-33, incubados a 29 °C com agitação de 200 rpm por 24 horas.

A partir desta pré-cultura foram preparados volumes maiores contendo meio YPD sem zeocina e alíquota da pré-cultura, consistindo na cultura de célula propriamente dita

que foi incubada a 29 °C por 15 horas. A densidade ótica em 600 nm das culturas foi determinada, sendo escolhida a cultura que apresentou valor entre 1,3 – 1,5.

A cultura de células foi resfriada em gelo por 10 min, transferida para tubos de centrifuga previamente resfriados e submetida à centrifugação a 1.500 *g* por 5 min a 4 °C. O precipitado foi lavado três vezes com água previamente autoclavada e resfriada, e novamente centrifugado por 1.500 *g* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 10 mL de sorbitol 1 M previamente autoclavado e resfriado; em seguida a mistura foi centrifugada a 1.000 *g* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de sorbitol 1 M.

Transformação de *Pichia pastoris* e crescimento em placas

As células de *P. pastoris* X-33 (100 µL) foram transformadas com 20 µg de plasmídeo linearizado por eletroporação (*Bio Rad Gene Pulser*) empregando-se as seguintes condições: 1500 V, 200 µs e 25 µFaradays. Imediatamente após a eletroporação adicionou-se 1 mL de sorbitol e o volume total foi transferido para novo tubo, o qual foi submetido à incubação a 30 °C sem agitação, por uma hora. Após este período adicionou-se meio YPD e incubou-se novamente a 30 °C, agora com agitação de 200 rpm, por uma hora.

Os transformantes foram selecionados em placas de cultura com meio YPDS/agar suplementadas com 100 e 500 µg mL⁻¹ de zeocina utilizada como agente de seleção. As colônias crescidas em meio YPDS/agar foram submetidas à PCR utilizando-se os oligonucleotídeos 5'AOX e 3'AOX para a verificação das colônias positivamente transformadas.

Crescimento de células transformadas e indução da expressão

Três transformantes positivos foram selecionados e inoculados em 80 mL de meio BMGY seguido de incubação a 30 °C com agitação por 17 horas para gerar biomassa. As células foram centrifugadas a 1000 *g* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 20 mL de meio BMMY e incubado a

30 °C com agitação por 4 dias para indução da expressão. A cada 24 horas foi adicionado metanol a uma concentração final de 2 % para manutenção das condições de indução.

Purificação e ensaio da proteína recombinante

As células foram centrifugadas a 1.045 *g* por 10 min a 4 °C. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado um volume de tampão MES 50 mM pH 5,5 e sulfato de amônio a 80 % de saturação, seguido de repouso por 30 min. A proteína precipitada foi coletada por centrifugação a 20.000 *g* por 30 min. O precipitado, ressuspenso em tampão acetato 50 mM pH 5,0, foi centrifugado por um minuto e mantido a 5 °C até a realização dos ensaios enzimáticos. Toda a manipulação do material durante a extração foi realizada a 5 °C. Azida de sódio foi adicionada aos tampões para prevenir o crescimento microbiano.

Para a realização dos ensaios o extrato enzimático foi diluído 10 vezes. A atividade enzimática foi determinada a partir da incubação do substrato com o extrato enzimático na proporção de 1:1 (v/v). Para a análise da atividade da FEH, os substratos utilizados foram inulina de *Cichorium intybus* 50 mg mL⁻¹ e 1-cestose 10 mM preparadas em tampão acetato 50 mM, pH 5. O extrato enzimático foi incubado com sacarose 10 mM preparada em tampão acetato 50 mM, pH 5, para detectar eventual atividade de invertase. Durante as incubações, realizadas a 30 °C, foram retiradas alíquotas nos tempos zero, 1, 2 e 20 horas. Em seguida, as alíquotas das misturas de incubação foram submetidas à fervura por 5 min para interrupção da reação, diluídas em água e submetidas à análise dos produtos formados em HPAEC/PAD.

Análise da atividade enzimática

A atividade da enzima recombinante foi determinada pela quantidade de frutose liberada na mistura de incubação, através da quantificação por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo DX-400, coluna Carbo Pac PA100, utilizando os eluentes: eluente A (90 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 90 mM de hidróxido de sódio) com a programação: 0-6 min, 20 mM. Os potenciais aplicados ao PAD para E1 (480ms), E2 (180 ms) e E3 (360 ms) foram 0,05, 0,75 e -0,15, respectivamente. O fluxo aplicado foi de 1 mL min⁻¹.

Análise da proteína recombinante purificada

A análise da proteína recombinante, após purificação com acetona, foi efetuada através de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), empregando-se um sistema descontínuo, baseado no método descrito por Laemmli (1970) e utilizando géis com 10 % de poliacrilamida (p/v) em tampão Tris HCl 1,875 M pH 8,8, glicina 0,192 M, contendo 0,1% de SDS (p/v). Foram utilizados géis (9X6 cm) de 0,75 mm de espessura, montados em cuba vertical de eletroforese modelo Mini-Protean (Bio Rad). Como marcador de massa molecular foi utilizado *Page Ruler Unstained Protein Ladder* (Fermentas, 10 a 200 kDa). O gel foi corado com solução contendo 0,05 % de Coomassie Blue, 10 % de etanol e 5 % de ácido acético.

RESULTADOS

Protocolo para estudo da expressão dos genes que codificam a 1-FEH

Extração de RNA

O método utilizado para a extração de RNA proporcionou um rendimento médio de 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tecido e RNA de boa qualidade como mostra a figura 1, na qual podem ser observadas duas bandas discretas correspondentes aos RNAs ribossomais, 25S e 18S. Como 98 % a 99 % do RNA total correspondem ao RNA ribossomal (rRNA), a integridade de uma amostra de RNA pode ser determinada pela integridade do rRNA (Sambrook et al 1989). O RNA extraído de rizóforos de plantas induzidas à brotação, quando analisado por eletroforese em gel de agarose, mostrou-se íntegro e com grau de pureza satisfatório para a realização do trabalho.

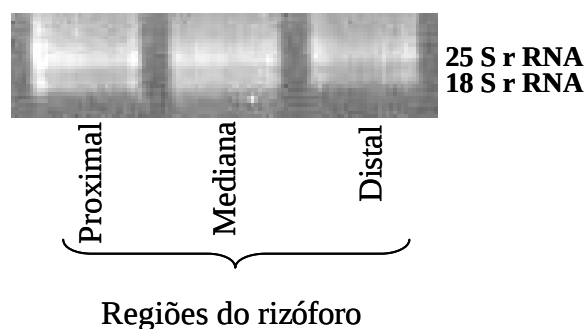


Figura 1. Visualização sob luz ultravioleta dos RNAs total extraídos das regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação, separados por eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídeo. As duas bandas indicadas correspondem às subunidades 25S e 18S do RNA ribossomal (rRNA).

Análise da expressão

Através da técnica de *Northern blotting* foi possível identificar e obter informações sobre a abundância e o padrão de distribuição de transcritos relacionados à 1-FEH nos rizóforos de *V. herbacea*.

Como apresentado na figura 2, a presença dos transcritos relacionados à 1-FEH foi detectada na região proximal de rizóforos de plantas induzidas à brotação (Induzidas) e nas regiões próximal, mediana e distal de rizóforos de plantas induzidas à brotação, seguida de armazenamento a 5 °C (Induzidas/5°C). O armazenamento a 5 °C intensificou a indução da expressão de transcritos relacionados à 1-FEH e esta resposta foi verificada pelo aumento da intensidade do sinal de hibridização na região proximal e pelo aparecimento do sinal nas regiões mediana e distal dos rizóforos submetidos a este tratamento. Por outro lado, nenhum sinal foi observado para as folhas e nem para as três regiões do rizóforo de plantas na fase vegetativa.

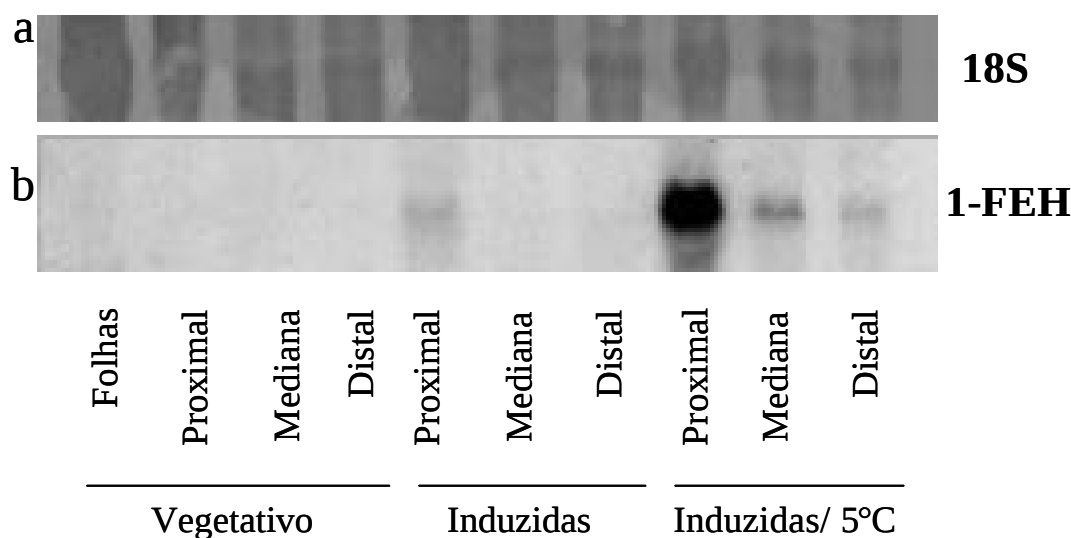


Figura 2. Análise da expressão de transcritos relacionados à 1-FEH, por *Northern blotting*, em folhas e rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase vegetativa, em plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos e em plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C. O RNA total (20 µg) foi isolado dos tecidos indicados e a membrana foi corada com a) azul de metileno 0,04 % em acetato de sódio 0,5 M pH 5.2 para visualização do RNA ribossomal 18S e b) hibridizada com a sonda da 1-FEH IIa de *Cichorium intybus*. A exposição para a auto-radiografia foi de 5 dias a -70 °C.

Estratégia de clonagem de cDNAs de 1-FEHs obtidos de rizóforos de plantas em brotação

Amplificação dos cDNAs de 1-FEH

A partir do resultado obtido no experimento anterior (figura 2) no qual foi utilizada uma sonda de 1-FEH IIa de *C. intybus* (Asteraceae), foi possível apontar a região do rizóforo com maior abundância do transcrito relacionado à 1-FEH. A alta expressão de 1-FEH foi verificada especialmente na região proximal de rizóforos de plantas Induzidas/5 °C. Assim, para a síntese do cDNA, utilizou-se o RNA extraído desta região do rizóforo de plantas submetidas a este tratamento, conforme descrito anteriormente (Induzidas/5 °C).

Para a clonagem da 1-FEH de plantas em fase de brotação natural utilizou-se o cDNA sintetizado a partir do RNA extraído da região proximal de rizóforos de plantas em fase de brotação natural na data de amostragem em que as plantas apresentaram a atividade mais elevada de 1-FEH no período estudado (09 setembro), como mostrado no capítulo IV.

Dentre todas as combinações de oligonucleotídeos sintetizados baseados nas regiões de consenso entre as seqüências de FEHs disponíveis testadas, somente a combinação P1 e P7 amplificou um produto com tamanho esperado, de aproximadamente 600 pb. Após otimização da temperatura de pareamento, para diminuir o nível de amplificação não-específica, foi selecionada a temperatura de 60 °C para a realização das demais PCR. Além disso, a quantidade de primeira fita de cDNA foi diluída 10 vezes e a concentração de magnésio foi aumentada de 1,5 mM para 7,5 mM.

Após clonagem e seqüenciamento, os produtos obtidos pela PCR tiveram a sua identidade confirmada com base no resultado obtido com o Programa BLAST (Altschul et al., 1990) (tabela 1). A seqüência de nucleotídeos obtida a partir dos rizóforos de plantas em fase de brotação natural foi denominada 1-FEH Natural e a seqüência obtida de rizóforos de plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos e armazenamento a 5 °C foi denominada 1-FEH Induzida/5 °C.

Tabela 1. Resultado da comparação das seqüências parciais de nucleotídeos de 1-FEH Induzida/5 °C e 1-FEH Natural de *Vernonia herbacea*, obtidas pela PCR, com as seqüências de nucleotídeos de diversas espécies disponíveis no GenBank. *E-value* indica o grau de validade do alinhamento.

Seqüência de nucleotídeo de <i>Vernonia herbacea</i>	Nº acesso	Tipo	Organismo	Score	E-value
1-FEH Natural	Y 11124	invertase	<i>Cichorium intybus</i>	405	2,00E-110
	AJ 509808	1-FEH	<i>Campanula rapunculoides</i>	346	1,00E-92
	AJ 295033	1-FEHIIa	<i>Cichorium intybus</i>	325	1,00E-86
	Y 11176	frutuosidade	<i>Cichorium intybus</i>	324	3,00E-86
	AJ 295034	1-FEHIIb	<i>Cichorium intybus</i>	319	7,00E-85
	AJ 242538	1-FEH I	<i>Cichorium intybus</i>	239	5,00E-77
1-FEH Induzida/5 °C	AJ 295033	1-FEHIIa	<i>Cichorium intybus</i>	451	1,00E-124
	Y 11176	frutuosidade	<i>Cichorium intybus</i>	450	3,00E-124
	AJ 295034	1-FEHIIb	<i>Cichorium intybus</i>	439	7,00E-121
	AJ 509808	1-FEH	<i>Campanula rapunculoides</i>	339	1,00E-90
	Y 11124	invertase	<i>Cichorium intybus</i>	300	4,00E-79
	AJ 242538	1-FEH I	<i>Cichorium intybus</i>	227	4,00E-71

O *E-value* (*expectation value*), mostrado na tabela 1, é um número resultado de cálculos estatísticos que indica o grau de validade de um alinhamento. Quanto menor o valor, mais significativo é o alinhamento. O Programa Blast calculou os valores do alinhamento colocando-os em ordem decrescente de significância. O *Score* é a pontuação que uma determinada seqüência recebe dependendo do grau de correspondência encontrada no banco de dados.

As seqüências mostraram alta pontuação, com baixo valor de expectativa, que reflete a alta similaridade com as 1-FEHs de *C. intybus* e de *C. rapunculoides*. Entretanto, quando comparadas entre si, as seqüências de aminoácidos deduzidas a partir das seqüências de nucleotídeos de 1-FEH Natural e 1-FEH Induzida/5 °C mostraram ser produtos distintos, quando alinhadas pelo programa Clustal W (figura 3).

Figura 3. Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas a partir das seqüências de nucleotídeos da 1-FEH Natural e da 1-FEH Induzida/5 °C de *Vernonia herbacea* (Clustal W). Os asteriscos indicam resíduos idênticos, dois pontos indicam substituições conservadas e um ponto indica substituições semiconservadas.

Baseando-se nas seqüências parciais de 1-FEHs de *V. herbacea* obtidas pela PCR foram desenhados oligonucleotídeos para a reação de iPCR, na qual utilizou-se cDNA dupla-fita e circular. Com o intuito de diminuir o nível de amplificação não-específica foram realizados testes de gradiente de temperatura de pareamento, concentração de magnésio e diluição do cDNA dupla-fita circular utilizada como molde. Somente a combinação R1 e S1 para 1-FEH Induzida/5 °C e a combinação NatR1 e NatS1 para a 1-FEH Natural amplificaram produtos de tamanho esperado de aproximadamente 1.800 pb (figura 4), utilizando-se o cDNA molde diluído 1.000 vezes e a concentração de magnésio de 1,5 mM.

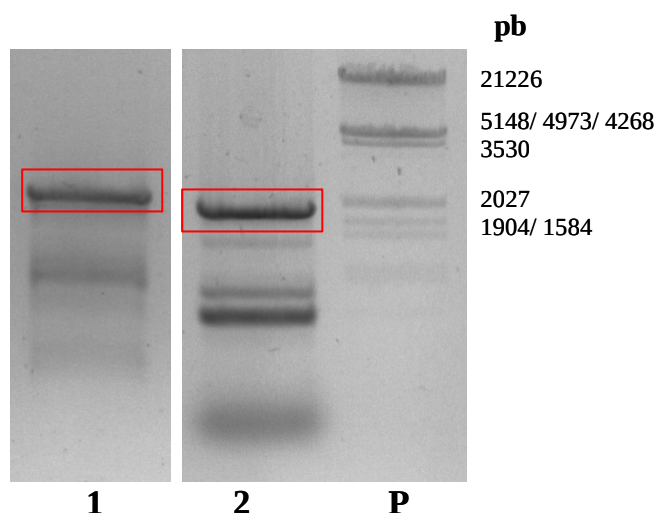


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da iPCR. Os fragmentos obtidos foram visualizados por incorporação com brometo de etídeo. Amplificações por PCR de diluição do cDNA dupla-fita circular molde utilizando-se as combinações dos oligonucleotídeos NatR1/ NatS1 para a 1-FEH Natural (1) e R1/S1 para a 1-FEH Induzida/5 °C (2) nas reações. O padrão molecular de DNA do fago λ digerido com a enzima de restrição Hind III e EcoRI está indicado em P. Os números da direita referem-se aos tamanhos (pb) dos fragmentos que compõem o padrão utilizado e as caixas vermelhas destacam os produtos selecionados.

Após clonagem e seqüenciamento, os produtos obtidos pela iPCR tiveram a sua identidade confirmada pelo Programa BLAST. Foram obtidas a seqüência completa do cDNA da 1-FEH Induzida/ 5 °C, incluindo as regiões não traduzidas, e a seqüência parcial da 1-FEH Natural.

O cDNA da 1-FEH Induzida/5 °C apresentou 49 pares de bases na região 5'UTR, 1.749 pares de bases compreendendo a ORF e 276 pares de bases na região 3' UTR, incluindo a cauda poli A, apresentando um total de 2.074 pares de bases (figura 5). O cDNA da 1-FEH Natural apresentou 1.597 pares de bases na ORF, 162 pares de bases na região 3' UTR, incluindo a cauda poli A, apresentando um total de 1.759 pares de bases (figura 6). A região 5' UTR da 1-FEH Natural não foi obtida até o presente. As seqüências deduzidas de aminoácidos da 1-FEH Induzida/5 °C e da seqüência parcial da 1-FEH Natural alinham-se com outras seqüências de 1-FEHs de dicotiledôneas descritas na literatura (figura 7).

5' UTR
 cccattctcccacgcaaccttaactcatcgatatcaaacaccaacatc

ORF
 atgaataaacctcttctcttcttcttattatgtcttctgttctggtccacgggcct **60**
 20 M N K P L S S F L T L C L L V L V H G P
 ggtcatttcgacgcgacccgtcagaaccttaagacataatttcacttccaactcagatt **120**
 40 G H F D A T R Q N L K D I I S L P T Q I
 attgaacaaccgtatcgactggctaccatttccaacctccaagcaactggatgaatgat **180**
 60 I E Q P Y R T G Y H F Q P P S N W M N D
 cccaatggaccaatgttatacaacggagtgatcatttcttccaatacaatccgtat **240**
 80 P N G P M L Y N G V Y H F F Y Q Y N P Y
 gccgctacttctggtgacgcatcggtgtgggcatgccgtatcatacagacctcgtcaac **300**
 100 A A T F G D V I V W G H A V S Y D L V N
 tggatccatctcgacccggccatttaccacccacgaagccgacgcaaaagctgctgg **360**
 120 W I H L D P A I Y P T H E A D A K S C W
 tccggatccgacacatcctcccgaaacattccggccatgctatacaccggcagcgat **420**
 140 S G S A T I L P G N I P A M L Y T G S D
 tcacactcccgtaagttcaagacctcgctggcccaaaacgctccgaccccttctt **480**
 160 S H S R Q V Q D L A W P K N R S D P F L
 cgagagtgggtcaaatacaccggcaaccctctcataaccgcacggagggtcgaacgat **540**
 180 R E W V K Y T G N P L I T A P E G V N D
 gactgtttccgtgacccgacgacgacctggcaggcccgacggcgtctggcggatcgtc **600**
 200 D C F R D P S T A W Q G P D G V W R I V
 gtcggagccgacgagacaataacggcatggccttctgtatcagagtactgatttcgta **660**
 220 V G A D R D N N G M A F L Y Q S T D F V
 aactggaaagatacgaacagcctttgtcgtcgagacctaaccggaacttgggagtcg **720**
 240 N W K R Y E Q P L S S A D L T G T W E C
 cgggacgtttatccggtgccgttgacagcaccaacggacttgacagtcggatatacggc **780**
 260 P D V Y P V P L N S T N G L D T S V Y G
 ggaamggtgaagcatgtgatgaaagcaggattcggaggcagtgattggtataccatcggg **840**
 280 G X V K H V M K A G F G G H D W Y T I G
 acttatactcctgatcgtgagaatttctgccacaaatgaggttgaccggaagtactat **900**
 300 T Y T P D R E N F L P Q N E V D R K Y Y
 ggacctgaggtacgatacgggaacttttatgcctcgaaatcatttttcgatgatcggaag **960**
 320 G P E V R Y G N F Y A S K S F F D D A K
 aacaggaggggtttgtgggttgattcctgaatctgattctcaagaagacgatataccag **1020**
 340 N R R V L W G W I P E S D S Q E D D I Q
 aaaggatgggagggtcttcagtcgttcccgaggcgctttggatcgacagaagtgaggatg **1080**
 360 K G W A G L Q S F P R A L W I D R S G M
 cagctaattcaatggcgggtggatgagattgaaaagcttcggctaataagtaacacctc **1140**
 380 Q L I Q W P V D E I E K L R L N E V N L
 caaaacaaaaccttaaacctggctctgtccttgaaatccagggcattactgcttctcag **1200**
 400 Q N K N L K P G S V L E I Q G I T A S Q
 gcggtatttacaatctcgttcaaattagagaacttgaaagaagccgaggtattggatagc **1260**
 420 A D V T I S F K L E N L K E A E V L D T
 agtttgaccgaccacaagcgctttgtaacgaaagggtgcataagccagggtgtgttc **1320**
 440 S L T D P Q A L C N E R G A S S Q G V F
 gggccttttgggtgttgccatggcatgaaagacttaaaagaacaaacccgcatcttc **1380**
 460 G P F G L L A M A S K D L K E Q T A I F
 ttctcggtgttccaaaacaaacggctgttactctgtgctcatgtgtagcgtatcttagc **1440**
 480 F R V F Q N Q N G R Y S V L M C S D L S
 aggtcaacgggtcaaggaatcgcacacaagaattttggtgcatttgttgacataaat **1500**
 500 R S T V K S N I D T T S F G A F V D I N
 cctcgatacaacgagatctcactcagaaacttgattgaccactcgattattgagagcttt **1560**
 520 P R Y N E I S L R N L I D H S I I E S F
 ggagctgaaggcaagcatgtatcacgagtcgggtttaccccaatttgtgaactatgaa **1620**
 540 G A E G K T C I T S R V Y P K F V N Y E
 gaggctcatctttacgcttttaacaacgggtactcaaacggtcaagatttcacgaatgagt **1680**
 560 E A H L Y A F N N G T Q S V K I S R M S
 gcttggagcatgaagagtcggaatttattatagatcagaccgtaagagtgcgactatg **1740**
 580 A W S M K S A E F I I D Q T V K S A T M
 gagaagtaa **1749**
 582 E K -

3' UTR
 atcggatgtgtaattattaatagggttaatttatgtcgaaaagcaagtaaatggaagcat
 tggagccaggagagttgatttggtagctctttggtagaagggtcattctttatagcttc
 attccttgtaaaaaatttgaagttgtgccattttattttatatttttgcattataa
 gatgtaacaaatgctgcaaaagcagatgatgccgttgtaacaaattattgtttcattaat
 atagttgcaattatttgagtaatacaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 5. Seqüência de nucleotídeos e seqüência deduzida de aminoácidos do cDNA da 1-FEH Induzida/5 °C clonado de *Vernonia herbacea*. A seqüência encontra-se numerada na direção 5'-3', a partir do sítio de início da tradução. Números da esquerda indicam o total de aminoácidos e os da direita indicam o total de nucleotídeos apresentados em cada linha. As abreviaturas 5' UTR , ORF e 3' UTR, indicam região 5' não-traduzida, quadro de leitura e região 3' não-traduzida, respectivamente. A seqüência foi depositada no EMBL/ EBI sob o número de acesso AM 231149 e será liberada para acesso público após a sua publicação.

ORF

```

tggagatgagtacaagtcttattttctccataatattttctcgtctttactgtttccatgt 61
 20  G D E Y K S Y F L H N I S R S L L F P C
ccgatccgacctactacgccgaatcttattttctcgcgcgggaacaacaaccttac 121
 40  P I R P Y Y A G I S Y S S P P E Q Q P Y
cggacggcggtttcacttccagccttcccaaaactggatgaatgatcctaattggaccaatg 181
 60  R T A F H F Q P S Q N W M N D P N G P M
tactacaatggagtataccatctcttcttccaacacaacccatttgggccacttttctct 241
 80  Y Y N G V Y H L F F Q H N P F G P L F S
aaccaaatctactgggcacactctgtatcgcgcgacctgatcaactggatcccttttagac 301
100  N Q I Y W A H S V S R D L I N W I P L D
ctcgccatttctccaccgaacccttgcacatcaacagctgctggtccggatccgccaca 361
120  L A I S P T E P F D I N S C W S G S A T
atcctaccggaaacaaacccgttatattatacaccggaatcgactctgaaaaccgcaa 421
140  I L P G N K P V I L Y T G I D S E N R Q
gtccagaatatagccgtcccaagaacttatcgaccatattcttagagaatgggtcaag 481
160  V Q N I A V P K N L S D P Y L R E W V K
tacaccggcaatccggtcataaacctaccgacgggattgaaccggacgacttcagagac 541
180  Y T G N P V I N L P D G I E P D D F R D
cgcaccaccgctgtgcagaagacggaaaatggagaatactcgtcgggaagtcagaaa 601
200  P T T A W L A E D G K W R I L V G S Q K
gataagaccggaattgcgttttcttaccatccctccgactttgttaactggactcgatac 661
220  D K T G I A F L Y Q S S D F V N W T R Y
gattcccccttccataagggttgcgggaaccggaatatgggaatgccagacttttttct 721
240  D S P L H K V A G T G I W E C P D F F P
gtgaggggtgacagcacaaatggggttgatactcggtcataaacccgaaacaaagcat 781
260  V R V D S T N G V D T S V I N P K T K H
gtgttgaagggtgggattatgattatgggagagactactacatgatcggaattacagt 841
280  V L K V G L Y D Y G R D Y Y M I G N Y S
cgggagaagaaactacgttctcctcaaacgaattaacgctcggaaactctgaggtacgat 901
300  P E K E N Y V P Q N E L T L G T L R Y D
tacgggaagtactatgcttccaagtcgttcttcgacgacccggtgaaaaaccgaaggatc 961
320  Y G K Y Y A S K S F F D D P V K N R R I
ttgatgggttgggtgaacgagtcggaattcagtagcagatgatcctaaggatgggtcc 1021
340  L M A W V N E S D S V A D D I A K G W S
gggcttcactcggttccacggagtttggcttgaccaaaccagaagcagcttgtaaa 1081
360  G L H S F P R S I W L D Q N Q K Q L V Q
tggccgattgaggaatcgaatcggttacacgaaaatgaggttcgttttcgaaataaacgg 1141
380  W P I E E I E S L H E N E V R F R N K R
ctcgaagggtgatcggttacaaaaagtttcaggcataaccgcattctcaggctgatgtgaag 1201
400  L E G G S L Q K V S G I T A S Q A D V K
gtttcgttcaagtcgctaatttagaattagccgaagaactcgacccgagttggatcgat 1261
420  V S F K L A N L E L A E E L D P S W I D
ccgacgcttatctgcagcgaaggaatgcataacaaagggaattcgggcccgtttkg 1321
440  P Q L I C S E K D A S N K G K F G P F X
gtgttagtttttcttccaaagacttgatcgaaacaaactgcaatcttctttagggtttac 1381
460  V L V F A S K D L I E Q T A I F F R V Y
cagaagaacggacgttacactgtgctaattgtgcagtgatcaagccgggttttcgacaaga 1441
480  Q K N G R Y T V L M C S D Q S R F S T R
aacgggctcgataagactacatacggagcatttgggacatagatcctgaacaagatgaa 1501
500  N G L D K T T Y G A F V D I D P E Q D E
atttactaagaaccttgatagatcactcgatcggttgagagctttggaggaggaggaaag 1561
520  I S L R T L I D H S I V E S F G G G G K
acctgcattacggccagagttgtaacgcccgcctaa 1597
531  T C I T A R V V T P A -

```

3'UTR

```

acctgaaccactgaaataattccatgtcatcccccaagatccacctcatcaattagatcg
ggatataaaactaataatcatgtcaaaattatcaattttacgtcacagggtactaacca
gatcataatcgattcatacatggatatttgaaaaaaaaaa

```

Figura 6. Sequência de nucleotídeos e sequência deduzida de aminoácidos do cDNA da 1-FEH Natural clonado de *Vernonia herbacea*. A sequência encontra-se numerada na direção 5'-3'. Números da esquerda indicam o total de aminoácidos e os da direita indicam o total de nucleotídeos apresentados em cada linha. As abreviaturas ORF e 3' UTR, indicam quadro de leitura e região 3' não-traduzida, respectivamente.

CiIIa	MKKS---	LSSFIVLCFLVILETGRVKATSRNLNDVIMLANQQIEQPYRTGYHFQPPSNW
CiIIb	MKKS---	LSSFIALCFLVIVLETGRVKATSRDLNDVILLANQQIQPYRTGYHFQPPSNW
VhInd	MNKP---	LSSFLTCLLLVHGPGHFDATRONLKDIIISLTQIIIEQPYRTGYHFQPPSNW
Camp	MKKSFI	ISILLALCYSLLLVHHGFVDAADADSSVHLSLPS---DQPYRTGYHFQPPQNW
VhNat	-----	GDEYKSYFLHNISRSLLPFCPIRPYYAGISYSSPPEQQPYRTAFHFQPSQNW
CiI	-----	MCSERRVKEILGIWLSLCLVWVQNGVGHVSSSPTTEESQPYRTGFHFQPKNW
		: :
CiIIa	MNDPNGM	LYQGVYHFFYQYNPYAATFGDVIIGHAVSYDLVNWIIHLDPAIYPTQEADSK
CiIIb	MNDPNGM	LYQGVYHFFYQYNPYAATFGDVIIGHAVSYDLVNWIIHLDPAIYPTQEADSK
VhInd	MNDPNGM	LYQGVYHFFYQYNPYAATFGDVIIGHAVSYDLVNWIIHLDPAIYPTHEADAK
Camp	MNDPNGM	YKGVYHFFYQYNPNGLFGDVIIGHAVSYDLVNWIIHLDPAIYPTDPADIN
VhNat	MNDPNGM	YKGVYHFFYQYNPNGLFQSNQIYWAHSVSRDLINWIPLDLAISPTPEFDIN
CiI	INDPNGM	YKGVYHFFYQYNPYGLWGN-ISWGHISISYDLVNWIIHLDPAIYPTPEFDIN
		:***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :*****
CiIIa	SCWSGSAT	ILPGNIPAMLYTGSDSKSRQVQDLAWPKNLSDPFLREWVKHPKNLITPPEG
CiIIb	SCWSGSAT	ILPGNIPAMLYTGSDSKSRQVQDLAWPKNLSDPFLREWVKHPKNLITPPEG
VhInd	SCWSGSAT	ILPGNIPAMLYTGSDSKSRQVQDLAWPKNLSDPFLREWVKHPKNLITPPEG
Camp	SCFSGSAT	ILPGYKPVMLYTGDLTEKRVQNLAVPKNLSDPFLREWVKHPKNLITPPEG
VhNat	SCWSGSAT	ILPGNIPVILYTGDISNRQVQNLAVPKNLSDPFLREWVKHPKNLITPPEG
CiI	GCLSGSAT	ILPGPRILYTGQDVNNSQVQNLAVPKNLSDPFLREWVKHPKNLITPPEG
		:* ***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :*****
CiIIa	VKDDCFRDP	STAWLPGDPGVWRIVVGGDRDNGMAFLYQSTDFVNMKRYDQPLSSADATGT
CiIIb	VKDDCFRDP	STAWLPGDPGVWRIVVGGDRDNGMSLLYQSTDFVNMKRYDQPLSSAIATGT
VhInd	VNDCCFRDP	STAWLPGDPGVWRIVVGGDRDNGMAFLYQSTDFVNMKRYDQPLSSADLTGT
Camp	VKADDFRDP	STAWLPGDGKWRVLVSGSKNDLGVAAYLYQSKDFVWERFDYPLMSMETST
VhNat	IEPDDFRDP	PTTALAEADGKWRILVSGSKNDKTGIAFLYQSSDFVNMTRYDPLHKVAGTGI
CiI	IKAGQFRDP	STAWLPGDGKWRIVIGSEIDGHGTALLYRSTNGTKWIRSKPLHFSKGTGM
		: : . ***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :*****
CiIIa	WECPDFY	VPVPLNSTNGLDTS-VYGGSVRHVMKAGFE--GHDWYITGYTSPDRENLFPQNG
CiIIb	WECPDFY	VPVPLNSTNGLDTS-VYGGSVRHVMKAGFE--GHDWYITGYTSPDRENLFPQNG
VhInd	WECPDY	VPVPLNSTNGLDTS-VYGGXVHVMKAGFE--GHDWYITGYTSPDRENLFPQNE
Camp	WECPDF	FPVSVSSTNGLDTSVINPGVHKVVKVGFN--GIDWYITGTL--ERDNYVPE--
VhNat	WECPDF	FPVRVDSSTNGLDTS-VINPKTKHVLKGLYDGRDYIMIGNYSPEKENYVPQNE
CiI	WECPDFY	PTNGDKGLDTS-VQGNNTLHVLKVSFN--SREYVIGTYDPIKDKFSVVTN
		:***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :*****
CiIIa	LSLTGST	LDLRYDYGQFYASKSFDD-AKNRRVLWAWPETDSQADDIEKGWAGLQSFPR
CiIIb	LSLTGST	LDLRYNYGQFYASKSFDD-AKNRRVLWAWPETDAPEDDIEKGWAGLQSFPR
VhInd	VDRKY	YGPVPR--YGNFYASKSFDD-AKNRRVLWAWPETDSQADDIEKGWAGLQSFPR
Camp	--GLK	GNLSLDMRYDYGQFYASKSFYDN-AKQRRVLWAWPETDSQADDIEKGWAGLQSFPR
VhNat	LT	LTGT---LRYDYGQFYASKSFDDPVKNRRILMAWVNESDSVADDIAKGWAGLQSFPR
CiI	-DFM	SNTQFYDYGQFYASKSFYDS-VNQRVILWAWPETDSQADDIEKGWAGLQSFPR
		: : . ***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :*****
CiIIa	ALWIDR	NGKQLIQWPVEEIEELRQNVNLQNKNLKPGSVLEIGHIASQADVTISFKLEG
CiIIb	ALWIDR	NGKQLIQWPVEEIEELRQNEVNLQNKNLKPGSVLEIGHITASQADVTISFKLEE
VhInd	ALWIDR	SGMQLIQWPVEEIEELRLNEVNLQNKNLKPGSVLEIGHITASQADVTISFKLEN
Camp	SVMLDR	NGKQLVQWPVEEIEELRENEVKFSNKELEGGSLFEVEGITASQADVTISFKLSN
VhNat	SIWLDQ	NKQLVQWPVEEIEELHENEVFRNRKLEGGSLQKVSGITASQADVKVSKFLAN
CiI	SIWLSN	RKQLVQWPVEEIEELRLRTKQVNIITNRELAAGELLKIPSITASQADVEVSFSLTN
		:***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :*****
CiIIa	LKEAEV	LDLTLVDPQALCNERGASSRGALGPFGLLAMASKDLKEQSAIFFRVFQNLGRY
CiIIb	LKDAEV	LDLTLVDPQALCNERGASSRGALGPFGLLAMASKDLKEQSAIFFRVFQNLGRY
VhInd	LKEAEV	LDLTLVDPQALCNERGASSRGALGPFGLLAMASKDLKEQSAIFFRVFQNLGRY
Camp	LEEAE	LDPSWTDPLLCSEMGVSSKGYGPFGLLALASDDLTEQTAIFFRVFSSH--GKY
VhNat	LEAEEL	DPWIDPLLCSEKASNKGYGPFGLLVFASKDLIEQTAIFFRVYQKN--GRY
CiI	LTEIEL	IDSEVDPQLLCAQNVISGKFGPFGLILASKNLTEQTAIFFRVFKGP--NKF
		:* * : :***** :***** :***** :***** :***** :***** :*****
CiIIa	SVLMCS	DLRSRSTVRSNIDTTSYGAFVDIDPRSEISLRNLIDHSIIESFGAGGKTCITSR
CiIIb	SVLMCS	DLRSRSTVRSNIDTTSYGAFVDIDPKSEISLRNLIDHSIIESFGAGGKTCITSR
VhInd	SVLMCS	DLRSRSTVRSNIDTTSYGAFVDINPRYNEISLRNLIDHSIIESFGAGGKTCITSR
Camp	VLMCS	DQRRSSISNNVEKTTYGTVDIDPKHEISLRNLIDHSIIESFGAGGKTCITSR
VhNat	TVLMCS	DQSRFSRSTRNGLDKTTYGAFVDIDPEQDEISLRNLIDHSIIESFGAGGKTCITSR
CiI	LVLMS	DQSRSSIAQEVDSIYGAFLDLPLHEKIPLRSLIDHSIIESFGAGGKTCITSR
		:***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :***** :*****
CiIIa	IYPKFV	NNEEAHLFVFNNGTQNVKISEMSAWSMKNKAFVVDQSVKSAA---
CiIIb	IYPQFV	NNEEAHLFVFNNGTQNVKISMSAWSMKNKAFVVDQSVKSAA---
VhInd	VYPKFV	NNEEAHLFVFNNGTQNVKISMSAWSMKNKAFVVDQSVKSATMEK
Camp	VYPLA	INKDAHLTFYNGSESVMISELNAWSMKNKAFVVDQSVKSAA---
VhNat	WT	TPA-----
CiI	VYPLA	INEQAELFVFNNGTQSVTMSTLNWSMKNKAFVVDQSVKSAA---
		: :

Figura 7. Alinhamento obtido pelo programa Clustal W das seqüências deduzidas de aminoácidos das seqüências de FEHs de *C. intybus* (CiI, AJ 242538; CiIIa, AJ 295033 e CiIIb, AJ 295034) de *C. rapunculoides* (Camp) e de *V. herbacea* com as seqüências 1-FEH Natural, denominada VhNat e da 1-FEH Induzida/5 °C, denominada VhInd (AM 231149). Os asteriscos indicam resíduos idênticos, dois pontos indicam substituições conservadas e um ponto indica substituições semi-conservadas.

Análise das seqüências

A seqüência do cDNA da 1-FEH Induzida/5 °C teve sua identidade confirmada com base no resultado obtido pelo programa BLAST, pois revelou 84 % de identidade com a 1-FEH IIa de *C. intybus*, 82 % de identidade com a 1-FEH IIb de *C. intybus*, 62 % de identidade com a 1-FEH de *C. rapunculoides*, 54 % de identidade com a 1-FEH I de *C. intybus* e 51 % de identidade com a 6-FEH de *B. vulgaris*.

A figura 8 apresenta a seqüência completa de aminoácidos deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos do cDNA de 1-FEH Induzida/5 °C e indica o peptídeo sinal, o sítio de processamento e os sítios de glicosilação.

O provável peptídeo sinal da 1-FEH Induzida/5 °C foi determinado através do programa *Signal P* (Small et al., 2004) que mostrou que a probabilidade da região destacada na figura 8 ser o peptídeo sinal é de 99 %. O programa *Predotar* (Small et al., 2004) revelou que a probabilidade desta enzima ser uma proteína secretada é de 97 %. Desta forma, foi possível estimar qual seria a seqüência da proteína madura e estimar o peso molecular de 65,764 kDa e o ponto isoelétrico (pI) de 5,32 para a 1-FEH Induzida/5 °C de *V. herbacea* pelo Programa *Identification and characterization (pI/MW)* (Gasteiger et al., 2005).

Em muitos casos, as funções das proteínas são moduladas em nível de modificação pós-traducional como glicosilação, metilação, fosforilação, acetilação e acilação (Lam, 1997). Analisando-se a seqüência da 1-FEH Induzida/5 °C no programa Prosite (Hulo et al., 2006) foi possível identificar 11 sítios de fosforilação por caseína quinase II (TfgD, TgsD, TapE, SsaD, SffD, SqeD, SvIE, SqaD, SltD, SniD, SiiE), 7 sítios de fosforilação por proteína quinase C (SfK, TvK, SlR, TsR, SvK, SlK, TvK), 4 sítios de N-miristiolação (GNipAM, GLdtSV, GNfyAS, GItaSQ) e 3 sítios de N-glicosilação (indicados na figura 8). Esta análise também confirmou que a enzima pertence à família Glicosil Hidrolase (GH) 32.

A análise da seqüência do cDNA de 1-FEH Natural por meio do Programa BLAST revelou 78% de identidade com a invertase de *C. intybus*, 66% de identidade com a1-FEH de *C. rapunculoides*, 62% e 61% de identidade com as 1-FEH IIa e 1-FEH IIb de *C. intybus*, respectivamente e 57% de identidade com a 1-FEH I de *C. intybus*. A figura 9 mostra a seqüência deduzida de aminoácidos de 1-FEH Natural com sítios de glicosilação e as regiões cruciais para a atividade da 1-FEH indicados. Não foi possível

avaliar a ocorrência de peptídeo sinal nesta sequência, devido à ausência da região de início de tradução, não obtida até o presente momento.

Analisando-se a sequência da 1-FEH Natural no programa Prosite (Hulo et al., 2006) foi possível identificar 13 sítios de fosforilação por caseína quinase II (SppE, SptE, TgiD, SqkD, TryD, SffD, SvaD, SlhE, SqaD, SwiD, SckD, TliD, SivE), 8 sítios de fosforilação por proteína quinase C (SqK, TlR, SfK, ScK, SnK, StR, SlR, TaR), 1 sítio de fosforilação por tirosina quinase (RnglDKHY) e 4 sítios de N-glicosilação (indicados na figura 9). Esta análise confirmou que esta enzima também pertence à família Glicosil Hidrolase (GH) 32.

↓

```

MNKPLSSFLTLCLLVLVHGPGHFDATRQNLKDIISLPTQIIEQPYRTGYHFQPPSNWMNDPNGPMLYNGV 73
YHFFYQYNPYAATFGDVIVWGHAVSYDLVNWIHLDPAIYPTHEADAKSCWSGSATILPGNIPAMLYTGSD 146
SHSRQVQDLAWPKNRSDPFLREWVKYTGNP LITAPEGVNDDCFRDPSTAWQGPDGWVRIVVGADRDNNGM 219
AFlyQSTDFVNWKRYEQPLSSADLTGTWECPDVYPVPLNSTNGLDTSVYGGXVKHVMKAGFGGHDWYTIG 292
TYTPDRENFLPQNEVDRKYYGPEVRYGNFYASKSFFDDAKNRRVLWGWIPESDSQEDDIQKGWAGLQSF 364
RALWIDRSGMQLIQWPVDEIEKLRLNEVNLQKNLKP GSVLEIQGITASQADVTISFKLENLKEAEVLDT 438
SLTDPQALCNERGASSQGVFGPFGLLAMASKDLKEQTAIFFRVFQNGRYSVLMCSDLRSTVKSNI DT 511
TSFGAFVDINPRYNEISLRNLIDHSIIESFGAEGKTCITSRVYPKFVNYYEEAHL YAFNNGTQSVKISRMS 582
AWSMKSAEFIIDQTVKSATMEK

```

Figura 8. Sequência deduzida de aminoácidos do cDNA de 1-FEH Induzida/5 °C de *V. herbacea*. O suposto peptídeo sinal está indicado em vermelho e os sítios de glicosilação estão indicados em azul. A seta indica o sítio de processamento do peptídeo sinal. As sequências cruciais para a atividade enzimática estão indicadas em verde. Os números à direita indicam o total de aminoácidos apresentados em cada linha.

```

GDEYKSYFLHNISRSLLFPCPIRPYYAGISYSSPPEQQPYRTAFHFQPSQNWMNDPNGPMYNGVYHLFFQHN 73
PFGPLFSNQIYWAHSVSRDLINWIPLDLAISPTPEFDINSCWSGSATILPGNKPVI LYTGIDSEN RQVQNI AV 146
PKNLSDPYLREWVKYTGNPVINLPDGI EPDDFRDPTTAWLAEDGKWRI LVGSQKDKTGIAFLYQSSDFVNWTR 219
YDSPLHKVAGTGIWECPDVFPVRVDSTNGVDTSVINPKTKHVLKVGLYDYGRDYIMIGNYSPEKENYVPQNEL 292
TLGTLRYDYGKYYASKSFFDDPVKNRRILMAWVNESDSVADDIAKGW SGLHSFPRSIWLDQNQKQLVQWPIEE 364
IESLHENEVRFRNKRLEGGSLQK VSGITASQADV KVSFKLANLELAEELDPSWIDPQLICSEKDASNKGKFGP 438
FGLLVFASKDLIEQTAIFFRVYQKNGRYTVLMCSDQSRFSTRNGLDKTTYGAFVDIDPEQDEISLRTLIDHSI 511
VESFGGGGKTCITARVVTPA 531

```

Figura 9. Sequência deduzida de aminoácidos a partir do cDNA de 1-FEH Natural de *V. herbacea*. Os sítios de glicosilação estão indicados em azul e as sequências cruciais para a atividade enzimática estão indicadas em verde. Os números à direita indicam o total dos aminoácidos apresentados em cada linha.

As seqüências da 1-FEH Induzida/5 °C e da 1-FEH Natural de *V. herbacea* apresentaram as três regiões cruciais para a atividade enzimática NDPNG, FRDP e WECPDF, o suposto sítio ativo, segundo Van den Ende *et al.* (2003b).

Expressão heteróloga da 1-FEH Induzida/5 °C de *Vernonia herbacea* em *Pichia pastoris*

O cDNA isolado de plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos seguido de armazenamento a 5 °C (Induzida/5 °C) foi clonado e expresso em sistema heterólogo utilizando *Pichia pastoris* como hospedeiro de expressão. A atividade de 1-FEH foi confirmada após incubação com diferentes substratos.

A sequência funcional compreendeu a provável região da proteína madura da 1-FEH, deduzida por comparação com outras FEHs descritas, e foi amplificada por reações de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos contendo adaptadores que foram desenhados baseando-se na sequência da 1-FEH Induzida/5 °C. A inserção do fragmento da 1-FEH Induzida/5 °C no vetor TOPO XL teve como objetivo obter um plasmídeo contendo o gene de interesse com as extremidades suscetíveis à digestão por enzimas de restrição e, assim, garantir que o fragmento apresentasse as extremidades coesivas necessárias para a ligação no vetor de expressão. Após a ligação, transformação e seleção, as colônias foram submetidas à reação de PCR para verificação da presença do inserto. Como ilustrado na figura 10, uma única colônia de *E.coli* apresentou a inserção do fragmento de aproximadamente 1.800 pb.

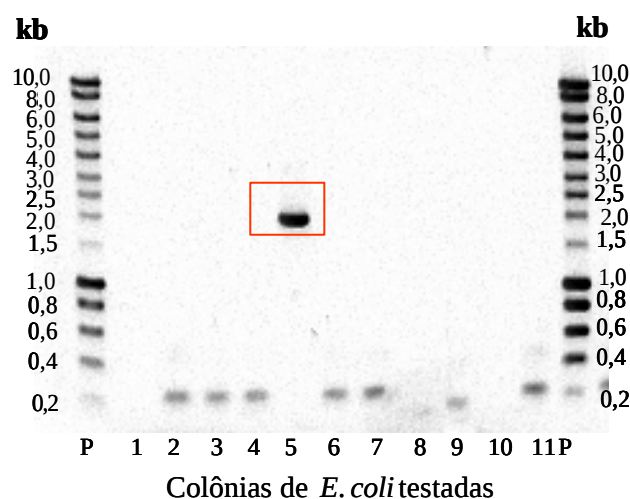


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose das reações de PCR das colônias de *E. coli* transformadas com a construção TOPOXL: cDNA da 1-FEH Induzida/5 °C. A caixa vermelha destaca a banda correspondente ao produto de PCR. Os números da direita e esquerda referem-se aos tamanhos (kb) dos fragmentos que compõe o padrão utilizado, apresentado em P (*Smart Ladder* 0,2 - 10 Kb, Eurogentec).

O plasmídeo deste transformante foi isolado e digerido com as enzimas EcoRI e NotI, como ilustra a figura 11. O fragmento de aproximadamente 1.800 bp foi recortado e purificado do gel para posterior ligação ao vetor de expressão.

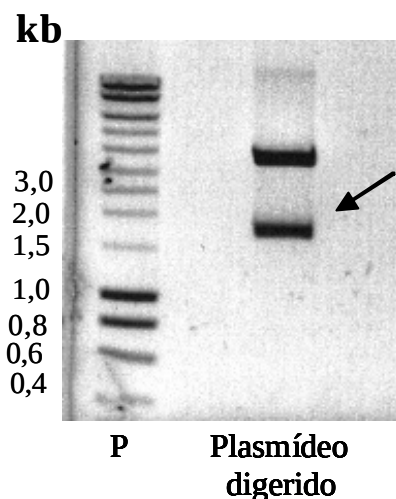


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose da reação de digestão do plasmídeo contendo a sequência da 1-FEH de *Vernonia herbacea* com as enzimas de restrição EcoRI e NotI. A seta indica o produto que foi recortado e purificado. Os números da esquerda referem-se aos tamanhos (kb) das bandas que compõem o padrão utilizado, apresentado em P (*Smart Ladder* 0,2 - 10 Kb, Eurogentec).

O vetor pPICZ α A também foi tratado com as enzimas mencionadas acima para obtenção das extremidades coesivas necessárias para a reação de ligação. Após a obtenção do fragmento e do vetor de expressão, ambos digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e NotI, o fragmento foi ligado ao vetor pPICZ α A. Foram realizadas três reações de ligações, A, B e C e a mistura de ligação foi transformada em células competentes de *E. coli*.

As colônias crescidas em meio 2xYT/água suplementado com zeocina foram submetidas à reação de polimerase em cadeia utilizando os oligonucleotídeos 5'AOX e 3'AOX para a verificação das colônias positivamente transformadas. Foram selecionados três transformantes positivos A7, B6 e C9 que foram preparados para a transformação em células de *Pichia*.

Os transformantes foram selecionados em placas de cultura com meio YPDS/água suplementadas com zeocina, utilizada como agente de seleção, como ilustra

a figura 12a. Oito colônias de cada reação de ligação foram crescidas em meio YPDS/ágar (figura 12b) e apenas quatro destas foram submetidas à reação de polimerase em cadeia (PCR das colônias, figura 13) utilizando os oligonucleotídeos 5'AOX e 3'AOX para verificação das colônias positivamente transformadas.

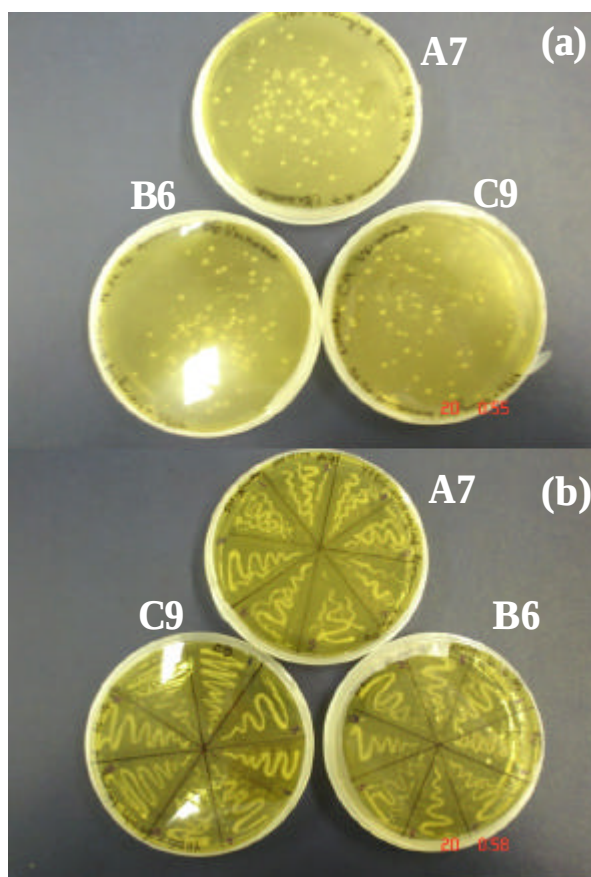


Figura 12. (a) Transformantes A7, B6 e C9 de *Pichia pastoris* selecionados em placas de cultura com meio YPDS/ágar suplementadas com zeocina. (b) Oito colônias selecionadas de cada reação de ligação.

Das quatro colônias selecionadas dos transformantes positivos A7, B6 e C9, apenas a colônia A7(1) apresentou, por amplificação, a banda correspondente ao tamanho esperado, indicado pela seta vermelha na figura 13. Entretanto, como nem sempre o gene inserido pode ser verificado através da técnica empregada, escolheu-se além deste transformante A7(1), dois outros, B6(2) e C9 (4), para iniciar a indução da expressão da proteína.

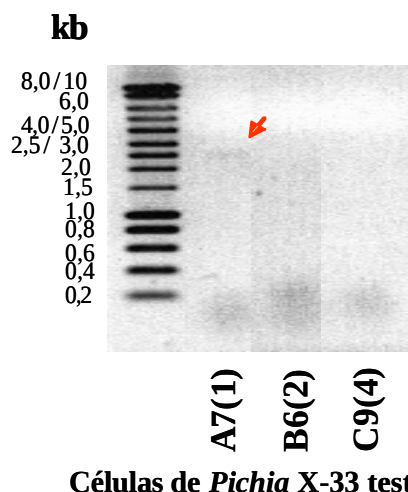


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose das reações de PCR das células de *Pichia* transformadas com a construção pPICZ α A: cDNA da 1-FEH Induzida/5 °C. A seta vermelha destaca a banda correspondente ao fragmento inserido no genoma da levedura. Os números da esquerda referem-se aos tamanhos (kb) dos fragmentos que compõe o padrão utilizado, apresentado em P (*Smart Ladder* 0,2 - 10 Kb, Eurogentec).

Após a indução da expressão e purificação, a proteína recombinante foi incubada com diferentes substratos para se avaliar a atividade enzimática.

A incubação da proteína recombinante obtida dos três transformantes A, B e C com inulina (figura 14) e com 1-cestose (figura 15) resultou na liberação de frutose e frutose e sacarose, respectivamente, após 20 horas, confirmando a atividade de 1-FEH do cDNA clonado.

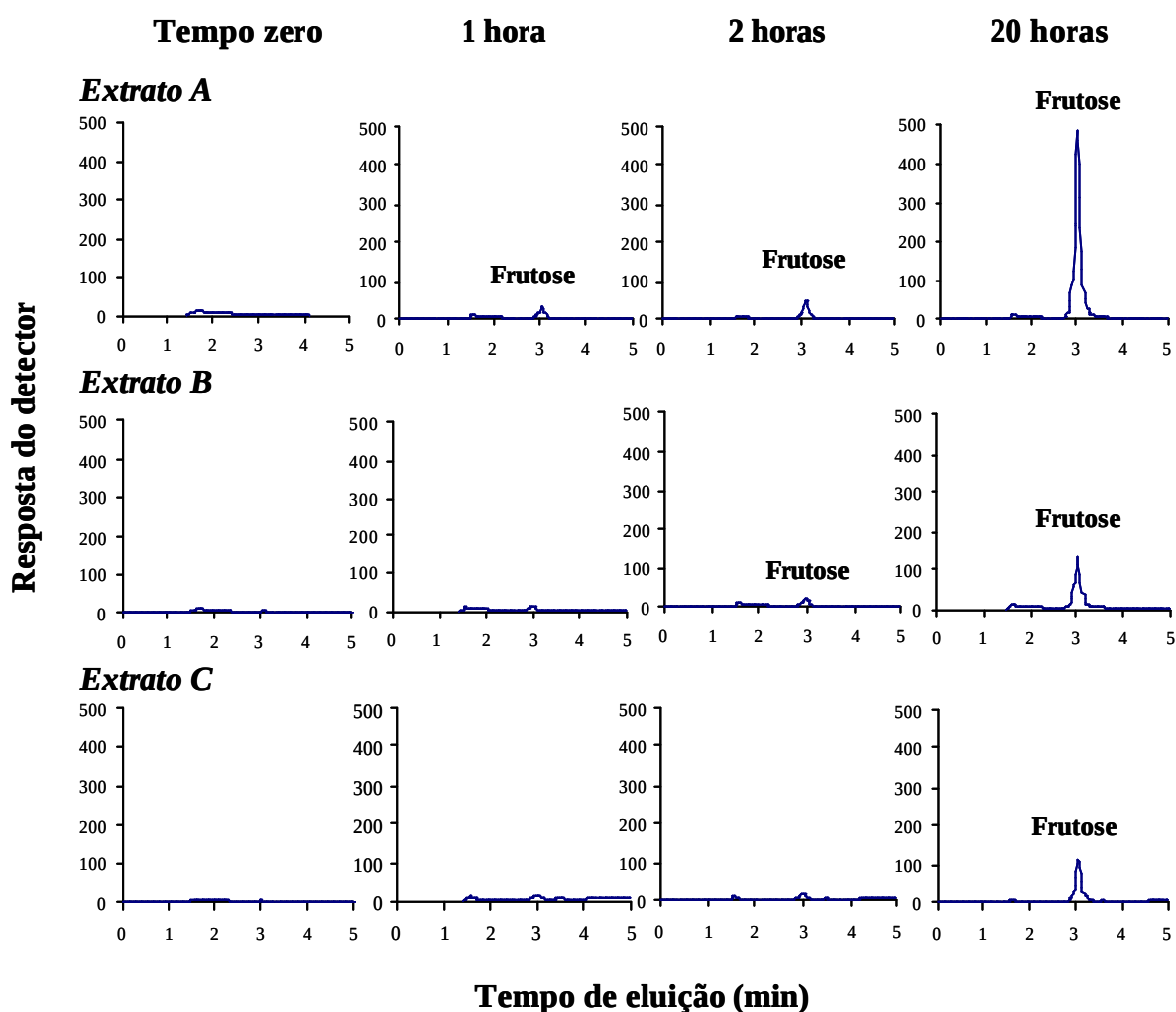


Figura 14. Hidrólise *in vitro* de inulina pela ação da proteína recombinante 1-FEH Induzida/5 °C de *Vernonia herbacea* purificada dos transformantes A, B e C. O cDNA de 1-FEH Induzida/5°C foi expresso em *Pichia pastoris*. A proteína recombinante foi incubada com inulina de *Cichorium intybus* (50 mg mL⁻¹) a 30°C. Os produtos formados durante a incubação foram analisados por HPAEC/PAD em diferentes intervalos de tempos, 1, 2 e 20 horas.

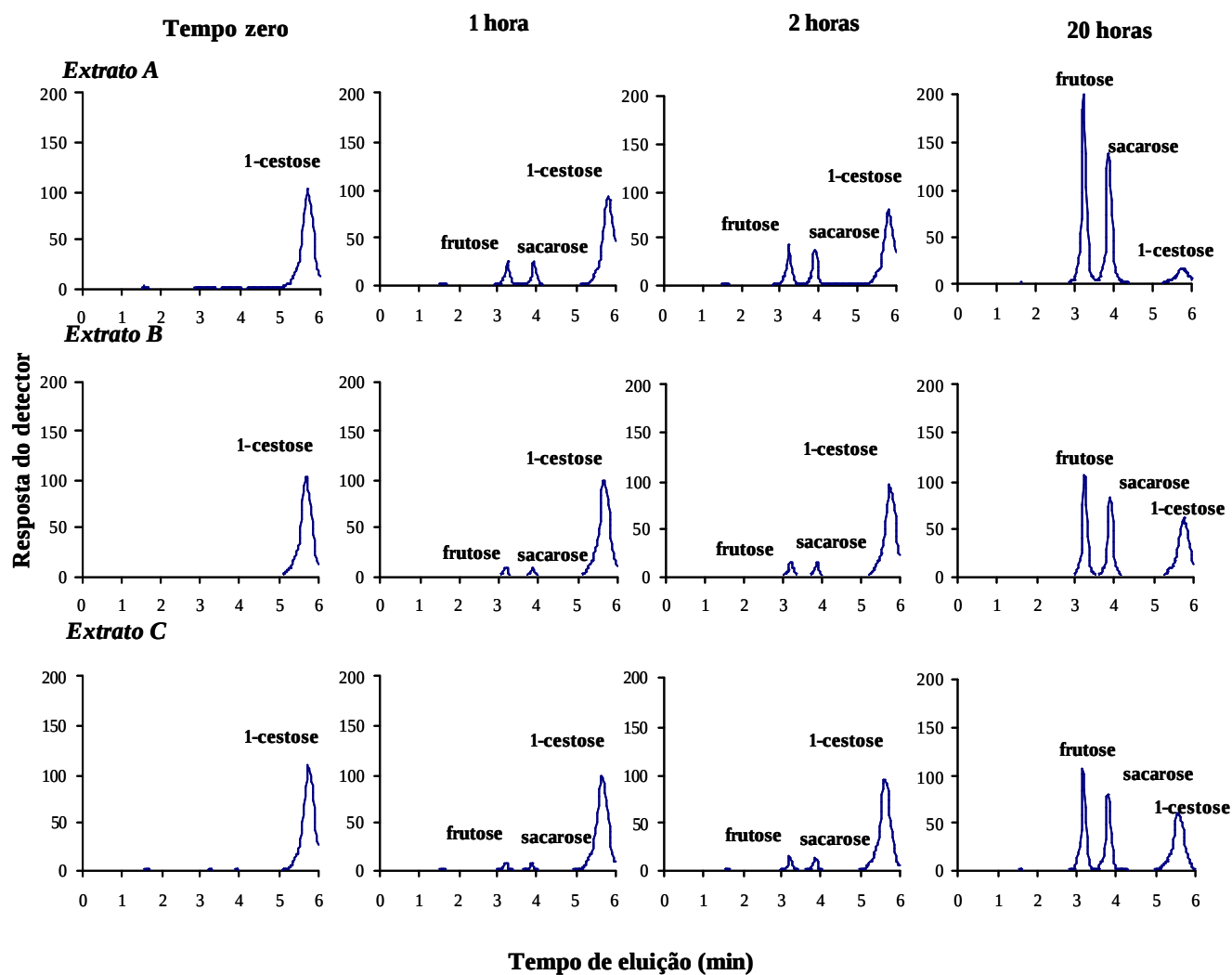


Figura 15. Hidrólise *in vitro* de 1-cestose pela ação da proteína recombinante 1-FEH Induzida/5 °C de *Vernonia herbacea* purificada dos transformantes A, B e C. O cDNA de 1-FEH Induzida/5°C foi expresso em *Pichia pastoris*. A proteína recombinante foi incubada com 1-cestose (10 mM) a 30°C. Os produtos formados durante a incubação foram analisados por HPAEC/PAD em diferentes intervalos de tempos, 1, 2 e 20 horas.

Na incubação da proteína recombinante com sacarose (figura 16) não houve formação de produto em nenhum dos transformantes analisados, confirmando que a proteína expressa é realmente uma 1-frutano exohidrolase e não uma β -frutofuranosidase ou invertase.

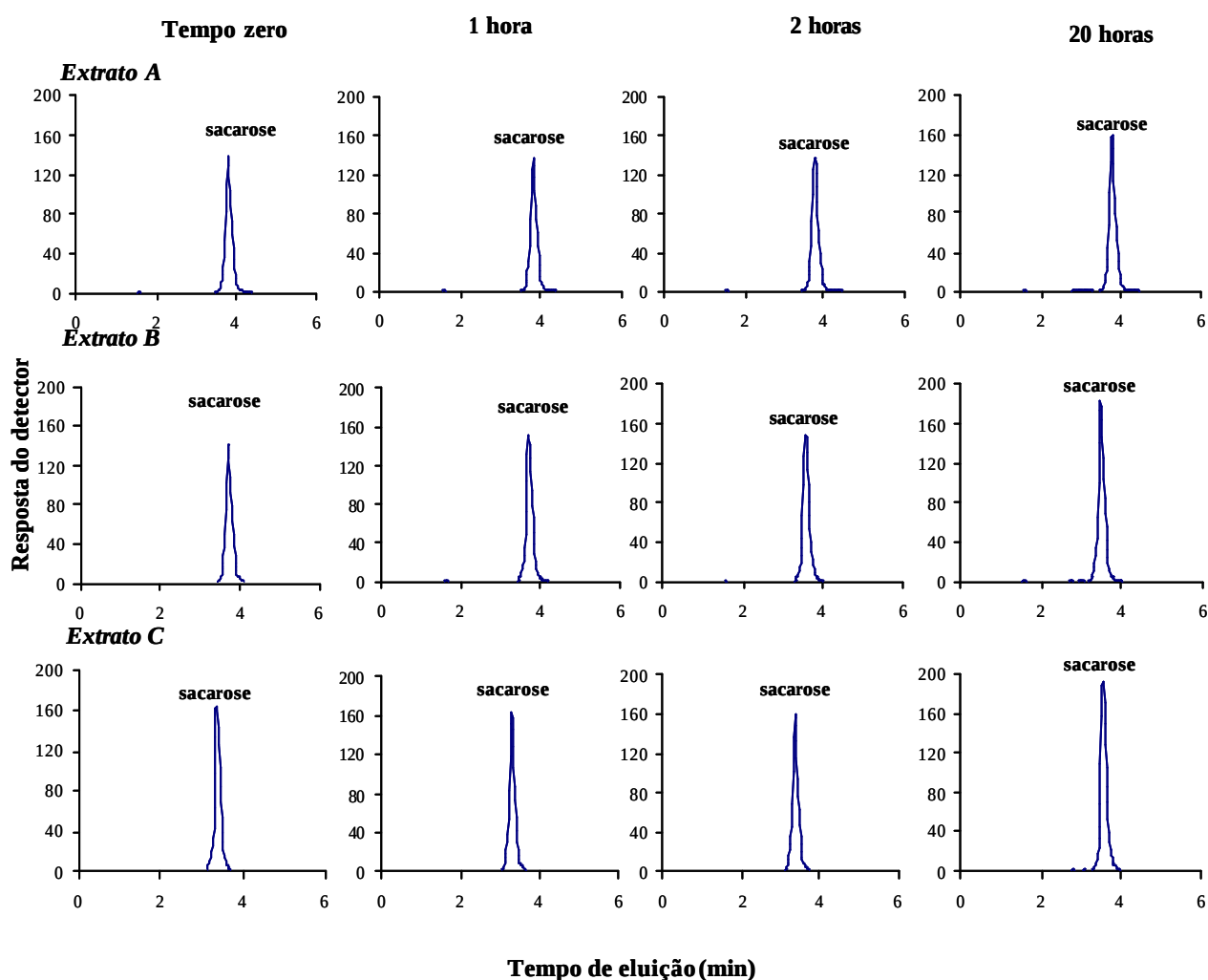


Figura 16. Análise por HPAEC/PAD da mistura de incubação da proteína recombinante 1-FEH Induzida/5°C de *Vernonia herbacea* com sacarose (10 mM) a 30°C. O cDNA de 1-FEH Induzida/5°C foi expresso em *Pichia pastoris* e a proteína recombinante foi purificada dos transformantes A, B e C. As misturas de incubação foram analisadas em diferentes intervalos de tempos, 1, 2 e 20 horas.

Os extratos protéicos foram analisados em SDS-PAGE, sendo observada no gel uma banda fracamente corada com *Coomasie Blue* indicada pela seta na figura 17.

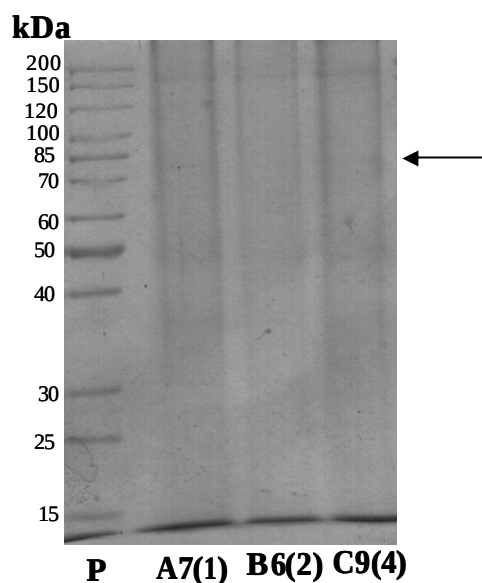


Figura 17. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da proteína recombinante, 1-FEH Induzida/5 °C de *Vernonia herbacea*. O gel foi corado com solução de *Coomasie Blue*. Os marcadores de massa molecular (kDa) são apresentados em P (*Page Ruler Unstained Protein Ladder*, Fermentas). A seta indica a posição da banda fracamente corada com massa molecular semelhante às de 1-FEHs descritas na literatura.

Extração de DNA

O método de CTAB utilizado, modificado por Michiels (2003), foi eficiente para a extração do DNA genômico de plantas de *Vernonia herbacea*. De acordo com a figura 18, o DNA extraído foi visualizado no gel como uma única banda de alto peso molecular, o que sugere pouca fragmentação mecânica durante as etapas de extração e purificação. Além disso, o DNA extraído foi suscetível à digestão com enzimas de restrição, demonstrando a pureza da amostra (figura 19).

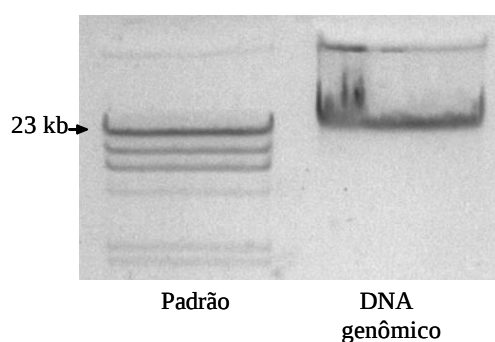


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico extraído de folhas de *Vernonia herbacea*. Os fragmentos foram visualizados por incorporação com brometo de etídeo. O número da esquerda refere-se ao tamanho do fragmento que compõe o padrão utilizado (DNA do fago λ digerido com a enzima de restrição Hind III).

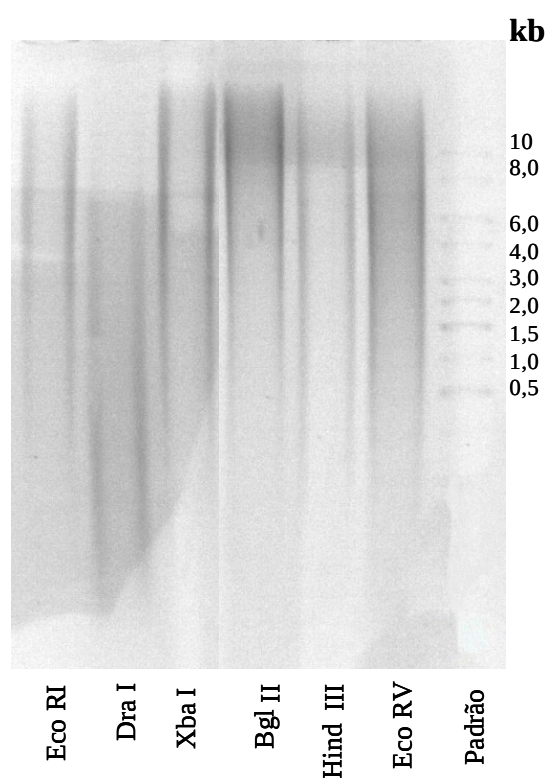


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose das digestões do DNA genômico de *Vernonia herbacea* com as enzimas de restrição. Os fragmentos obtidos foram visualizados por incorporação de brometo de etídeo. Os numerais à direita referem-se aos tamanhos (Kb) dos fragmentos que compõe o padrão utilizado (*DNA Ladder* 1Kb, 0,5 – 10 Kb, Sigma).

DISCUSSÃO

A análise da expressão dos transcritos de 1-FEH por *Northern blotting* (figura 2) revelou que a região proximal do rizóforo é o tecido abundante em transcritos de 1-FEH em plantas Induzidas e especialmente em plantas Induzidas/ 5°C. O frio, portanto, intensificou a indução da expressão de transcritos de 1-FEH. A abundância do transcrito na região proximal indica a alta expressão de FEH e coincide com atividade elevada desta enzima na região proximal do rizóforo, como relatado por Portes & Carvalho (2006). Os resultados indicam também a ocorrência de um acúmulo diferencial deste transcrito nas regiões proximal, mediana e distal do rizóforo e demonstra o papel que esta enzima desempenha na mobilização de frutanos durante o restabelecimento dos ramos aéreos, originados principalmente das gemas localizadas na região proximal.

A estratégia de clonagem adotada neste estudo possibilitou o isolamento de dois cDNA distintos, referentes à 1-FEH Induzida/5°C e a 1-FEH Natural. A análise das seqüências realizada por meio de programas de bioinformática mostrou que as duas seqüências apresentam modificações pós-traducionais, como por exemplo, o processamento de seqüências sinal, adição de certos tipos de lipídeos e açúcares (glicosilação) e de grupos fosfatos (fosforilação).

A maioria das proteínas em plantas é traduzida no citosol e então transportada para as várias organelas. Em função das inúmeras proteínas existentes em uma célula, cada qual com seu destino, estas devem ser corretamente sinalizadas, o que permite o correto direcionamento para o seu compartimento subcelular. Esta sinalização é realizada através do peptídeo sinal, representado por uma seqüência de aminoácidos com abundância em resíduos hidrofóbicos, que pode ser reconhecida pelos componentes regulatórios e que não está presente na proteína madura (Lam 1997).

A fosforilação é caracterizada pela formação de uma ligação fosfodiéster de um grupo fosfato ao oxigênio da hidroxila do grupo-R dos resíduos de serina e/ou treonina, enquanto a N-miristiolação é caracterizada pela formação de uma ligação amida entre o grupo carboxil de um ácido graxo e um grupo amina da glicina e a N-glicosilação, pela ligação de um oligossacarídeo ao grupo amino-lateral da asparagina (Lam 1997). A glicosilação de algumas proteínas tem sido implicada na facilitação do transporte destas pelo retículo endoplasmático até o seu destino, bem como na conformação da proteína.

Os graus de N-glicosilação sugeridos para as seqüências 1-FEH Induzida/ 5°C e 1-FEH Natural de *V. herbacea* são semelhantes ao grau de N-glicosilação estimado para as demais seqüências de FEHs conhecidas: 3 sítios em 1-FEH IIa de *C. intybus* (Van den Ende *et al.* 2001), 3 sítios em 1-FEH IIb de *C. intybus* (Van den Ende *et al.* 2001), 4 sítios em 1-FEHw3 de *T. aestivum* (Van Riet *et al.* 2003), 9 sítios em 6-FEH de *B. vulgaris* (Van den Ende *et al.* 2003b) e 10 sítios em 1-FEH I de *C. intybus* (Van den Ende *et al.* 2000).

As seqüências cruciais para a atividade enzimática são: NDPNG, FRDP e WECPDF, o suposto sítio ativo (Van den Ende *et al.* 2003b). Segundo Verhaest *et al.* (2005) que determinaram a estrutura da 1-FEH IIa de *C. intybus* através da técnica de difração de raio X, o sítio ativo desta enzima é composto por aminoácidos que são conservados na família GH 32: Asp 22, Asp 147 e Glu 201, membros das regiões conservadas NDPNG, FRDP e WECPDF. Estes autores esquematizaram a reação da FEH da seguinte forma: um frutano do tipo inulina liga-se ao sítio ativo onde seu oxigênio glicosídico é protonado pela Glu201; subseqüentemente, um ataque nucleofílico é realizado pelo carboxilato da Asp 22 formando um intermediário enzima-frutose ligados covalentemente. Finalmente, este intermediário é hidrolisado liberando a frutose e a enzima.

As seqüências deduzidas de aminoácidos da 1-FEH Induzida/ 5°C e da 1-FEH Natural de *V. herbacea* pertencem à família de enzimas GH 32, uma classificação baseada na similaridade de toda a seqüência de aminoácidos (Henrissat & Davies 1997) e apresentam todas as regiões cruciais para a atividade de 1-FEH, pI baixo e prolina (P) ao invés de valina (V) na região WECPDF (figura 7), o que as aproximam das invertases de parede celular, assim como todas as FEHs descritas (Van den Ende *et al.* 2000, Van den Ende *et al.* 2001, Van den Ende *et al.* 2003a, Van den Ende *et al.* 2003b, Van den Ende *et al.* 2005a, De Coninck *et al.* 2005, Kawakami *et al.* 2005, Van Riet *et al.* 2006). Entretanto, o pI baixo das FEHs contrasta com o pI alto encontrado para invertases de parede celular (Van den Ende *et al.* 2003b). Chalmers *et al.* (2005) argumentam que os peptídeos sinais curtos característicos das FEHs as aproximam das enzimas extracelulares enquanto que o pI baixo estimado para as mesmas, as aproximam das enzimas vacuolares. Segundo Van den Ende *et al.* (2004) o fato de todas as seqüências de FEHs serem altamente relacionadas com invertases de parede celular ao invés de invertases vacuolares, o que seria esperado uma vez que estas enzimas

localizam-se no vacúolo, mostra a fragilidade em se basear somente na informação da sequência para prever a localização de uma proteína.

Especulações a respeito da evolução das FEHs sugerem que estas evoluíram de β -frutofuranosidades extracelulares com pI baixo, encontradas em microorganismos, capazes de degradar sacarose e frutanos, e que a separação da atividade de β -frutofuranosidades em FEH e invertase teria permitido o controle independente das concentrações de sacarose e de frutanos e evitado a interferência entre degradação pela FEH e os processos de carregamento e descarregamento de sacarose (Van den Ende *et al.* 2004). Este perfil polifilético sugere que as FEHs evoluíram mais de uma vez a partir de diferentes invertases extracelulares e que possivelmente apenas um número limitado de mutações determinaram a diferença funcional entre invertase e FEHs (Kawakami *et al.* 2005).

A análise funcional do cDNA da 1-FEH Induzida/5 °C de *V. herbacea* foi realizada utilizando *Pichia pastoris* como hospedeiro de expressão. Esta levedura metilotrófica foi escolhida por ser geneticamente bem caracterizada, apresentar crescimento relativamente rápido, expressar e excretar proteínas a elevados níveis e realizar algumas das modificações pós-traducionais encontradas nas células dos seres superiores, como por exemplo, o processamento de seqüências sinal, formação de pontes dissulfeto, adição de certos tipos de lipídeos e açúcares (glicosilação) e processamento proteolítico, além de não produzir naturalmente invertases e frutossil transferases (Hochstrasser *et al.* 1998).

Esta levedura tem sido bastante utilizada em estudos de caracterização funcional dos genes do metabolismo de frutanos, como, por exemplo, no estudo das isoformas 6-KEHs (Van den Ende *et al.*, 2005), 6&1 FEH (Kawakami *et al.* 2005) e 6-FEH (Van Riet *et al.* 2006) de *T. aestivum*, das frutossil transferases, FEHs e invertases de *Lolium perenne* L. (Chalmers *et al.* 2005), além do estudo da 1-FFT de *V. discolor* (Van den Ende *et al.* 2005b).

Para a realização da análise funcional utilizando células de *P. pastoris*, a região N terminal da seqüência 1-FEH Induzida/5°C foi estimada com base nas seqüências N terminal de outras proteínas maduras de FEH. A seqüência foi eficientemente expressa por esta levedura e a proteína recombinante demonstrou atividade exclusivamente de FEH, produzindo frutose livre quando incubada com inulina (figura 14), frutose e

sacarose quando incubada com 1-cestose (figura 15) e sendo incapaz de hidrolisar a sacarose (figura 16), demonstrando claramente nenhuma atividade de invertase.

A análise da sequência da 1-FEH Natural mostrou que esta apresenta alta identidade com a invertase de *C. intubys* e com FEHs de outras espécies. Entretanto, o fato desta sequência apresentar alta identidade com uma invertase não invalida a possibilidade de esta ser uma FEH verdadeira. Segundo Van Riet *et al.* (2006) e Chalmers *et al.* (2005), os genes do metabolismo de frutanos em plantas compartilham alta similaridade entre as sequências, o que torna difícil inferir prováveis funções celulares baseando-se apenas na sequência de aminoácidos. Assim, uma suposta β -frutofuranosidase pode ser uma FEH verdadeira, uma invertase ou uma β -frutofuranosidase o que reforça a importância de se obter a análise funcional através da expressão heteróloga do gene em estudo.

A clonagem de duas sequências distintas de 1-FEH em *V. herbacea* corrobora os resultados obtidos através da purificação das FEHs e discutidos no capítulo II, no qual foi sugerida a ocorrência de isoformas de FEH que atuariam no processo de brotação de plantas de *V. herbacea*. Estas isoformas poderiam ser produtos de diferentes genes ou produtos da regulação pós-traducional da expressão gênica via *splicing* alternativo (Lorkovic *et al.* 2000) o que deve ser considerado no estudo das FEH em *V. herbacea*.

No presente estudo um cDNA que codifica uma 1-FEH foi isolado, clonado e caracterizado para plantas de *V. herbacea*, sendo o primeiro cDNA de 1-FEH clonado de uma espécie nativa do cerrado. A clonagem deste cDNA de 1-FEH em *V. herbacea* possibilitará estudos de hibridização *in situ*, de expressão gênica em diferentes condições fisiológicas e de regulação da expressão desta enzima que apresenta papel importante na mobilização de reservas garantindo a sobrevivência das plantas durante o ciclo de desenvolvimento anual quando estas atravessam uma fase de seca e frio no inverno, anterior à fase de rebrota dos ramos aéreos na primavera.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J.** (1990) "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Asega, A.F.** (2003). Enzimas do metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo, 98p.
- Asega, A.F. & Carvalho, M.A.M.** (2004). Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 313-319.
- Cairns, A.J.** (2003). Fructan biosynthesis in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 549-567.
- Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.** (1993). Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Chalmers, J., Lidgett, A., Cummings, N., Cao, Y., Forster, J., & Spangenberg, G.** (2005). Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. *Plant Biotechnology Journal* 3: 459-474.
- De Coninck, B., Le Roy, K., Francis, I., Clerens, S., Vergauwen, R., Halliday, A.M., Smith, S.M., Van Laere, A. & Van Den Ende, W.** (2005). Arabidopsis AtcwINV3 and AtcwINV6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant, Cell and Environment* 28: 432-443.
- Degasperi, M.I., Itaya, N.M., Buckeridge, M.S., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (2003). Fructan degradation and hydrolitic activity in tuberous roots of *Viguiera discolor* (Baker) (Asteraceae), a herbaceous species from the cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 11-21.
- De Roover, J.D., Van Laere, A. & Van den Ende, W.** (1999). Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 106: 158-163.
- Edelman, J. & Jefford, T. G.** (1964) The mechanism of fructose polymers in plants. 4. β -fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Biochemical Journal* 93: 148-161.

- Edelman, J. & Jefford, T. G.** (1968) The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* 67: 517-531.
- Fukai, K., Ohno, S., Goto, K., Nanjo, F. & Hara, Y.** (1997). Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science Plant Nutrition* 43: 171-177.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.** (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (ed.). *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press.
- Henrissat, B. & Davies, G.** (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* 7: 637-644.
- Hochstrasser, U., Lüscher, M., De Virgilio, C., Boller, T. & Wiemken, A.** (1998). Expression of a functional 6-fructosyltransferase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Letters* 440: 356-360.
- Hulo N., Bairoch A., Bulliard V., Cerutti L., De Castro E., Langendijk-Genevaux P.S., Pagni M., Sigrist C.J.A.** (2006). The PROSITE database. *Nucleic Acids Research* 34: D227-D230.
- Kawakami, A., Yoshida, M. & Van den Ende, W.** (2005). Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum*) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* 358: 93-101.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lam, E.** (1997). Nucleic acids and proteins. In P.M. Dey and J.B. Harborne (eds.) *Plant Biochemistry*, Academic Press, London, pp. 315-352.
- Lorkovic, Z.J., Wiczorck, K.D.A., Lambermom, M.H. & Fillipowicz, W.** (2000). Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in Plant Science* 5: 160-167.
- Marx, S.P., Nösberger, J. & Frehner, M.** (1997). 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* 135: 267-277.

- Michiels, A., Van den Ende, W., Tucker, M. Van Riet, L. & Van Laere, A.** (2003). Extraction of high genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry* 315: 85-89.
- Michiels, A., Van Laere, A., Van den Ende, W. & Tucker, M.** (2004). Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. *Journal of Experimental Botany* 55: 1325-1333.
- Nagaraj, V.J., Galati, V., Luescher, M. Boller, M. & Wiemken, A.** (2004). Cloning and functional characterization of a cDNA encoding barley soluble acid invertase (HvINV1). *Plant Science* 168: 249-258.
- Pollock, C. J., Cairns, A.J., Sims, I.M. & Housley, T.L.** (1996). Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. In E. Zamski and A.A. Shaffer (eds.). *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source - Sink Relationships*, A.A. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 97-113.
- Portes, M.T.** (2005). Biossíntese e degradação de frutanos em diferentes regiões do rizóforo de *Vernonia herbacea* (Vell). Rusby (Asteraceae). Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 112p.
- Portes, M.T. & Carvalho, M.A.M.** (2006). Spatial distribution of fructans and fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby in different developmental phases. *Plant Science* 170: 624-633.
- Ribeiro Sobrinho, D.S., Buckeridge, M. S. & Carvalho, M.A.M.** (1996). Fructan hydrolase from rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby and its role in fructan mobilization. In Third International Fructan Conference, Utah. Abstracts, Utah, p. 45.
- Rutherford, P.P & Deacon, A.C.** (1974). Seasonal variation in dandelion roots of fructosan composition, metabolism and response to treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Annals of Botany* 38: 251-260.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J. & Russell, D.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., Lurin, C.** (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4: 1581-1590.
- Van den Ende, W. & Van Laere, A.** (1996). Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. *Journal of Plant Physiology* 149: 43-50.
- Van den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J., Verhaest, P. & Van Laere, A.** (2000). 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-FEH I enzyme. *Plant Journal* 24: 447-456.
- Van den Ende, W., Michiels, A., Van Wouterghem, D., Clerens, S., De Roover, J. & Van Laere, A.** (2001). Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEH IIa e 1-FEH IIb). Mass fingerprint of the 1-FEH II enzymes. *Plant Physiology* 126: 1186-1195.
- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Van Riet, L., Van Laere, A., Yoshida, M. & Kawakami, A.** (2003a). Fructan 1-exohydrolases. β -(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiology* 131: 621-631.
- Van den Ende, W., De Coninck, B., Clerens, S., Vergauwen, R. & Van Laere, A.** (2003b). Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants: characterisation, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel 'cell-wall invertase-like' specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris*). *The Plant Journal* 36: 697-710.
- Van den Ende, W., De Coninck, B. & Van Laere, A.** (2004). Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense. *Trends in Plant Science* 9: 523-528.
- Van den Ende, W., Yoshida, M., Clerens, S., Vergauwen, R. & Kawakami, A.** (2005a). Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* 166: 917-932.
- Van den Ende, W., Van Laere, A., Le Roy, K., Vergauwen, R., Boogaerts, D., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., and Carvalho, M.A.M.** (2005b). Molecular cloning

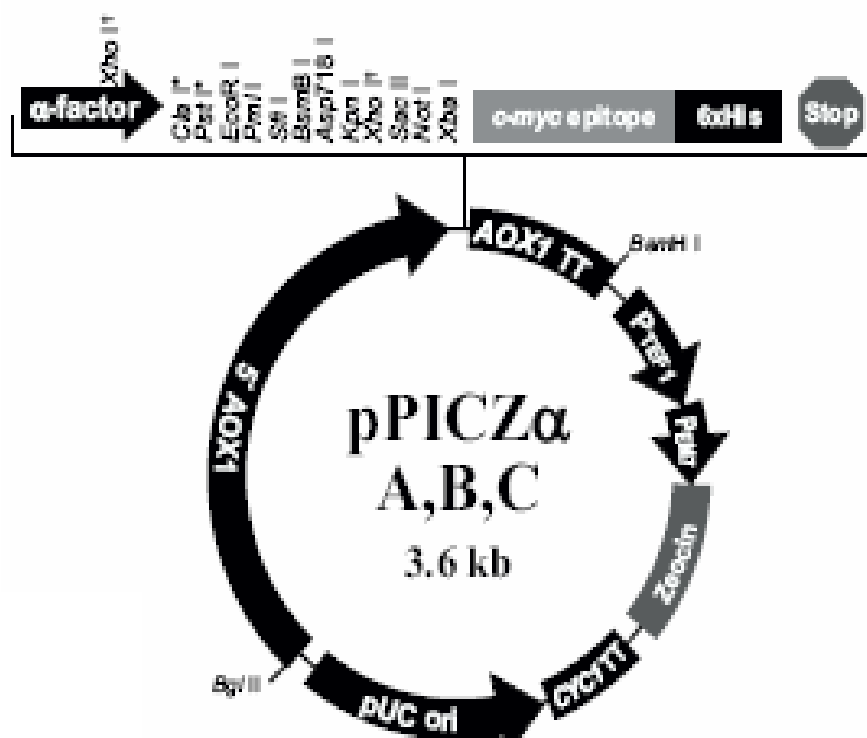
and characterization of a high DP fructan:fructan 1-fructosyl transferase from *Viguiera discolor* (Asteraceae) and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Physiologia Plantarum*, 125: 419-429.

Van Riet, L., Nagaraj, V., Van den Ende, W., Clerens, S., Wiemkem, A. & Van Laere, A. (2006). Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 57: 213 – 223.

Verhaest, M., Van den Ende, W., Le Roy, K., De Ranter, C., Van Laere, A. & Rabijns, A. (2005). X-Ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *The Plant Journal* 41: 400-411.

ANEXO

Mapa do vetor pPICZa A - Invitrogen



- Sítio de clonagem múltiplo com dez sítios de restrição que permite a inserção do fragmento. O fragmento é inserido no interior do gene da álcool oxidase (AOX1). Através desta enzima a levedura é capaz de utilizar o metanol como fonte de carbono.
- 5'AOX1 é a sequência que contém a região promotora fortemente induzida por metanol.
- α factor, ou fator α , é a sequência que sinaliza a secreção da proteína sintetizada para o meio de cultura.
- AOX1 TT é a sequência que sinaliza o término da transcrição do gene AOX1 e a poliadenilação.
- PTEF1, PEM7, Zeocin, CYC1TT são as regiões responsáveis pela resistência ao antibiótico zeocina.
- pUC ori é a sequência que permite a replicação e a manutenção do plasmídeo em *E.coli*.

CAPÍTULO IV

**Mobilização de frutanos durante o
processo de brotação em plantas de
Vernonia herbacea (Vell.) Rusby**

Resumo

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby apresenta rizóforos que acumulam frutanos do tipo inulina como carboidrato de reserva. Estas plantas entram em dormência no final do outono, com senescência dos órgãos aéreos e rebrotam na primavera. Em seguida ocorre a floração e um período de crescimento vegetativo no verão. O conteúdo e a composição de frutanos variam durante o ciclo fenológico destas plantas, assim como as atividades das enzimas envolvidas no seu metabolismo. Durante a brotação na primavera, ocorre a despolimerização dos frutanos pela FEH. A atividade da FEH pode também ser induzida em rizóforos de plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Induzidas) e em plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5°C (Induzidas/5 °C). O objetivo deste trabalho foi o estudo da mobilização de frutanos durante o processo de brotação. Para tanto, a atividade e a expressão gênica da FEH e o conteúdo e a composição de frutanos foram analisados em plantas em fase de brotação natural e em plantas induzidas à brotação (Induzidas). Foi avaliado também o efeito da baixa temperatura em plantas induzidas pela excisão dos ramos aéreos (Induzidas/5°C). A atividade da FEH, os conteúdos de proteína e frutanos foram calculados por colorimetria, a composição dos frutanos por HPAEC/PAD e a análise da expressão gênica por *Northern blotting*. As variações no conteúdo e na composição de frutanos, na atividade e na expressão gênica de FEH foram detectadas na região proximal dos rizóforos de plantas em fase de brotação natural. A baixa temperatura promoveu o acúmulo de frutanos de baixo GP e intensificou a atividade e a expressão gênica da FEH em plantas induzidas à brotação. Os resultados sugerem que no processo de brotação natural ocorre uma 1-FEH que hidrolisa fruto-polissacarídeos e –oligossacarídeos indistintamente enquanto no processo de brotação induzida ocorre uma outra 1-FEH com atividade e expressão gênica intensificadas pelo frio que, preferencialmente, hidrolisa fruto-polissacarídeos para fornecer energia para o restabelecimento dos órgãos aéreos em plantas Induzidas e para a manutenção dos níveis de fruto-oligossacarídeos em plantas Induzidas/5 °C.

Abstract

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby presents rhizophores which accumulate inulin-type fructans as reserve carbohydrates. Plants of this species enter dormancy at the end of autumn, with senescence and abscission of the aerial organs, and sprout again in spring; flowering occurs subsequently, followed by a period of vegetative growth in the summer. Fructan concentration and composition as well as activity of fructan metabolizing enzymes vary during the phenological cycle of the plants. Fructan depolymerization occurs during sprouting, in spring, by FEH activity. FEH activity is also enhanced in plants induced to sprouting by excision of aerial organs (Induced) and in plants induced to sprouting and stored at 5°C (Induced/5°C). The aim of the present work was to study fructan mobilization during the sprouting process by analyzing FEH activity and gene expression as well as fructan contents and composition in rhizophores of plants during natural and induced sprouting (Induced). The effect of low temperature in plants induced to sprouting (Induced/5°C) was also investigated. FEH activity, protein and fructan contents were determined by colorimetric analyzes, fructan composition was analyzed by HPAEC/PAD and gene expression was analyzed by *Northern blotting*. Variations in fructan contents and composition and in FEH activity and gene expression were clearly detected during sprouting in the proximal region of the rhizophores, near the axillary buds that give rise to the new shoots. Low temperature promoted the accumulation of low DP fructans and enhanced FEH gene expression and activity. Results indicate the occurrence of one 1-FEH hydrolyzing both fructo-oligo and -polysaccharides, indistinctly, in naturally sprouting plants, and another 1-FEH with activity and expression enhanced by low temperature, that hydrolyzes preferably fructo-polysaccharides to supply energy for the reestablishment of the aerial organs in Induced plants and for the maintenance of the fructo-oligosaccharide levels in Induced/5°C plants.

INTRODUÇÃO

Os frutanos são reconhecidos como uma classe de carboidratos vegetais há aproximadamente 200 anos e, depois do amido e da sacarose, são os de maior ocorrência entre as plantas (Hendry & Wallace 1993).

Diferente do amido, o frutano é solúvel em água e localizado no vacúolo celular (Frehner *et al.* 1984), embora a sua presença e a da enzima FEH, responsável pela degradação dos frutanos, tenham sido detectadas também no fluido apoplástico (Livingston & Henson 1998, Van den Ende *et al.* 2005). Vários autores sugerem que a presença de altas concentrações de frutanos e de outros açúcares solúveis pode contribuir para a diminuição do potencial osmótico das células e, por conseguinte, promover a tolerância à seca e ao congelamento (Pontis & Del Campillo 1985).

Entre as angiospermas esses polímeros são encontrados em monocotiledôneas (Gramineae) e em dicotiledôneas (Asteraceae), ocorrendo em cerca de 15% da flora contemporânea, especialmente em plantas de ordens mais evoluídas (Hendry 1993). A maioria das espécies ricas em frutanos encontra-se fora da região tropical, sendo mais abundantes em áreas onde o crescimento das plantas é sazonal (Hendry & Wallace 1993). Estes autores sugeriram que a ocorrência de quantidades apreciáveis em plantas consideradas evoluídas indica que os frutanos não constituem apenas mais uma diversificação biológica, mas também um significado evolutivo para o seu aparecimento.

Os frutanos são polímeros de frutose, sintetizados a partir da adição de unidades de frutose à sacarose. Os frutanos do tipo levano, mais comumente encontrados entre as espécies de Poaceae, são polímeros baseados no trissacarídeo 6-cestose que apresentam ligações β (2,6) entre as unidades de frutose, e os frutanos do tipo inulina, encontrados em espécies de Asteraceae, são baseados no trissacarídeo 1-cestose e apresentam unidades de frutose unidos por ligações do tipo β (2,1). Além destes dois tipos de frutanos, existem ainda os frutanos ramificados e de ligações mistas com unidade terminal de glucose, encontrados em Poales e os frutanos baseados na neocestose com ligações β (2,1) ou com ligações β (2,6) (Pollock *et al.* 1996).

A presença de frutanos foi amplamente documentada para a flora subtropical em região restrita do cerrado brasileiro na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (S.P.) (Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1986). Nesta região do cerrado, os frutanos são encontrados nos órgãos subterrâneos espessados de aproximadamente 60%

das espécies nativas de Asteraceae (Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1986, Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993). Dentre estas espécies destacam-se *Viguiera discolor* Baker, que apresenta frutanos do tipo inulina com cadeias longas (GP 170) (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993) e *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby com frutanos do tipo inulina com GP 40, aproximadamente (Carvalho *et al.* 1997).

Os frutanos são sintetizados pela ação de duas enzimas. A primeira enzima é a 1-sacarose: sacarose frutossiltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99) que catalisa irreversivelmente a formação de 1-cestose e a segunda é a 1-frutano: frutano frutossiltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100) que catalisa a transferência reversível de unidades terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora (Edelman & Jefford 1968, Koops & Jonker 1996, Lüscher *et al.* 1996).

Em plantas, a despolimerização das moléculas de frutanos é catalisada pela frutano exohidrolase (FEH, EC 3.2.1.153, 3.2.1.154) e ocorre pela remoção seqüencial das unidades de frutose terminal. Esta enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose. Os produtos finais da FEH são a frutose e a sacarose, sendo a enzima fortemente inibida por esta última (Edelman & Jefford 1964). A atividade da FEH é calculada pela quantidade de frutose liberada a partir de frutanos utilizados como substrato durante a reação. O substrato utilizado para o ensaio da FEH inclui frutanos extraídos da planta da qual o extrato enzimático foi obtido bem como de outras espécies (Simpson & Bonnett 1993). Por hidrólises sucessivas, grandes polímeros são convertidos irreversivelmente a uma mistura de sacarose e frutose. Como os açúcares são translocados nas plantas principalmente sob a forma de sacarose, novamente deve haver outra conversão, desta vez, de frutose para glicose, para formar sacarose que então é translocada para fora da célula (Edelman & Jefford 1968).

V. herbacea é uma espécie perene que apresenta crescimento sazonal e acumula inulina nos órgãos subterrâneos espessados de estrutura caulinar, denominados rizóforos. Os rizóforos são responsáveis pela reprodução vegetativa da espécie, além de atuarem como órgãos de reserva para a planta, acumulando até 90% do seu peso seco em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich 1993).

Variações no conteúdo e na composição dos frutanos foram detectadas durante o ciclo fenológico de *V. herbacea* (Carvalho & Dietrich 1993). Estas variações, verificadas por estes autores, incluem a diminuição do conteúdo de frutanos entre as fases de 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. Além das variações nos teores e na composição de frutanos durante as fases fenológicas, variações no conteúdo destes compostos foram observadas também ao longo do comprimento dos rizóforos, entre as regiões proximal, mediana e distal (Portes & Carvalho 2006).

Estudos preliminares realizados durante o ciclo fenológico mostraram que a FEH de *V. herbacea* apresenta atividade elevada apenas no curto período de brotação das plantas (Ribeiro-Sobrinho *et al.* 1996). Foi verificado também que esta enzima pode ser induzida em plantas na fase vegetativa através da excisão e subsequente rebrota dos ramos aéreos (Asega & Carvalho 2004) e que este aumento na atividade da FEH tanto em plantas em brotação natural quanto em plantas induzidas à brotação foi detectado, especialmente, na região proximal dos rizóforos, onde ocorre o desenvolvimento das gemas que dão origem aos ramos aéreos (Portes & Carvalho 2006). Além disso, a indução da atividade da FEH pela excisão dos ramos aéreos foi intensificada pelo armazenamento a 5°C (Portes 2005).

O aumento na atividade da FEH também foi detectado em plantas de *Cichorium intybus* L., espécie de Asteraceae acumuladora de frutanos, após a desfolhação (De Roover *et al.* 1999) e após o armazenamento no frio (Van Den Ende & Van Laere 1996). Van den Ende *et al.* (2001), dando continuidade a esses estudos, detectaram isoformas de FEH ativas em diferentes condições fisiológicas, a 1-FEH I, induzida pelo frio parece atuar, juntamente com a 1-FFT, para proteger as plantas contra os danos causados pelo congelamento e as isoformas 1-FEH IIa e 1-FEH IIb tem sua atividade aumentada após a desfolhação e podem também ser induzidas em outras fases fenológicas além da fase de brotação quando a demanda energética da planta aumenta.

A análise da região promotora da 1-FEH IIa de *C. intybus* mostrou que este gene é altamente expresso também em raízes armazenadas no frio - o que indica o efeito promotor do frio na expressão do gene da 1-FEH IIa - e que esta indução deve ter um papel importante na tolerância ao frio em plantas acumuladoras de frutanos (Michiels *et al.* 2004).

O envolvimento das FEHs no processo de brotação, natural ou induzido, já foi documentado para outras espécies de Asteraceae como *Taraxacum officinale* (Web.) Wigg (Rutherford & Deacon 1974), *C. intybus* (Van den Ende & Van Laere 1996), *Helianthus tuberosus* L. (Marx *et al.* 1997), *Polymnia sonchifolia* Poep&Endl (Fukai *et al.* 1997), *C. intybus* (De Roover *et al.* 1999) e *V. discolor* (Degasperi *et al.* 2003).

Em Poaceae, também foi detectado o aumento na atividade da FEH em plantas de *Dactylis glomerata* L. (Yamamoto & Mino 1987) e de *Lolium perenne* L. após a retirada das folhas (Marx *et al.* 1997b, Morvan *et al.* 1997, Pavis *et al.* 1998). Estes últimos autores observaram não apenas o aumento da atividade da FEH após a desfolhação, mas também a diminuição em 80% nos níveis de frutanos, demonstrando claramente que o processo de mobilização destes compostos está associado à retirada das folhas nestas plantas.

A rápida utilização de frutanos foi observada durante a brotação de bulbos de *Lycoris radiata* (L'Her) Herb. (Nagamatsu *et al.* 1991), a floração de *Haemerocallis* (Bielecki 1993) e no desenvolvimento de inflorescências de *Phippisia algida* (Sol.) R.Br. (Solhaug & Aeres 1994) e *Campanula rapunculoides* L. (Vergauwen *et al.* 2000), porém a atividade da FEH não foi analisada nestes sistemas.

Estudos de purificação da FEH de *V. herbacea* possibilitaram o isolamento de frações com atividade de 1-FEH em rizóforos de plantas induzidas à brotação e armazenadas no frio (Asega 2003) distintas das frações obtidas de plantas em brotação natural (capítulo II), sendo evidenciada a diferença existente entre o extrato enzimático de plantas em fase natural de brotação e em brotação induzida. Esta diferença foi evidenciada pelo comportamento das proteínas durante as etapas de purificação que demonstram a ocorrência de isoformas de 1-FEH ativas nas duas condições mencionadas. Os resultados obtidos sugerem a presença de um conjunto de proteínas responsáveis pela mobilização de frutanos que apresentam a mesma atividade hidrolítica, porém com diferentes propriedades física e química.

A clonagem de dois cDNAs distintos de FEH de *V. herbacea*, denominados 1-FEH Induzida/5°C e 1-FEH Natural, e a confirmação da autenticidade de uma dessas seqüências pela análise funcional da proteína recombinante (capítulo III) reforça a hipótese de que nesta espécie a mobilização de frutanos durante a brotação ocorre por ação de isoformas de 1-FEHs. A obtenção da seqüência 1-FEH Induzida/5 °C possibilitou o preparo de sondas com vistas ao estudo da expressão gênica da 1-FEH durante o processo de brotação.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o processo de mobilização de frutanos durante a brotação. Para tal, foram analisadas a atividade e a expressão gênica da 1-FEH e a composição de frutanos em plantas de *V. herbacea* durante a fase de brotação natural e brotação induzida pela excisão dos ramos aéreos. O efeito do frio em

plantas induzidas à brotação também foi analisado com vistas a compreender o envolvimento dos frutanos na tolerância das plantas a este fator de estresse ambiental.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram utilizadas plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (SP 169567) cultivadas em viveiro da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (S.P.) em fase de brotação natural e em fase vegetativa, induzidas à brotação.

No primeiro experimento foram utilizadas as plantas em fase de brotação natural foram coletadas em intervalos de 7-10 dias, entre agosto e setembro (tabela 1). Os rizóforos destas plantas foram fragmentados, separados em regiões proximal, mediana e distal, para análise da distribuição espacial de atividade e de expressão da 1-FEH ao longo do eixo de crescimento dos rizóforos.

Tabela 1. Datas de coletas de plantas de *Vernonia herbacea* para o experimento de brotação natural durante o ano de 2004.

Fase fenológica	Datas
Brotação	17 agosto
Brotação	27 agosto
Brotação	09 setembro
Brotação	17 setembro
Brotação	23 setembro

O segundo experimento, de brotação induzida, foi realizado no mês de janeiro de 2005, quando as plantas se encontravam em fase vegetativa. No início do experimento as plantas foram submetidas à excisão dos ramos aéreos. Antes da excisão e a seguir, em intervalos de 3-4 dias num total de 27 dias foram coletadas seis plantas para cada ponto de amostragem. Em vista do resultado obtido no experimento preliminar de *Northern blotting*, apresentado no capítulo III, foi possível apontar o tecido com abundância do transcrito relacionado à FEH. Esta abundância que indica alta expressão de FEH foi verificada na região proximal de rizóforos de plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos e de plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C por sete dias. Desta forma, neste segundo experimento foram utilizadas apenas as

regiões proximais dos rizóforos para análise de atividade e de expressão da 1-FEH. Das seis plantas coletadas em cada ponto de amostragem, três plantas constituíram as três amostras do tratamento denominado Induzidas e as outras três plantas foram armazenadas sob baixa temperatura (5 °C) por sete dias logo após a coleta, constituindo a amostragem do tratamento denominado Induzidas/5 °C.

Das três plantas coletadas em cada dia de amostragem foram separadas amostras de rizóforos para a determinação das atividades de 1-FEH e de invertase, e extrações de RNA e de carboidratos solúveis. Os rizóforos foram lavados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 °C até a realização das análises.

Extração enzimática

Os rizóforos (5g) foram pulverizados em nitrogênio líquido utilizando almofariz e pistilo e homogeneizados em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,5, contendo 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β -mercaptoetanol, 2 mM de EDTA e 10 % de PVPP (p/v), na proporção 1:3 (p/v). O homogeneizado foi mantido em repouso por 30 min e, em seguida, filtrado em nylon duplo. O filtrado foi mantido em repouso por 30 min e, após centrifugação a 12.000 g por 20 min, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 20 % de saturação (p/v), mantendo-se a mistura 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 (p/v), seguido de repouso por uma hora. A proteína precipitada foi coletada por centrifugação a 17.000 g por 20 min. O precipitado, ressuspendido em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,5, foi dessalinizado em colunas de Bio Gel P6-DG (Bio Rad) e congelado em freezer -80 °C até a realização dos ensaios enzimáticos. Toda a manipulação do material durante a extração foi realizada a 5 °C. Azida de sódio foi adicionada nos tampões para prevenir o crescimento microbiano.

Ensaio Enzimático

A atividade enzimática foi determinada a partir da incubação do substrato com o extrato enzimático na proporção de 1:1 (v/v). Para a análise da atividade da 1-FEH, o substrato utilizado foi inulina de *Helianthus tuberosus* L. (frutanos com grau de polimerização médio de 35, Sigma) na concentração final de 50 mg mL⁻¹ preparada em tampão citrato-fosfato 50 mM, pH 4,5. Durante as incubações, realizadas a 30 °C, foram

retiradas alíquotas nos tempos 0, 30 min, 1, 2 e 4 horas. Em seguida, as alíquotas das misturas de incubação foram submetidas à fervura por 5 min para a interrupção da reação. Para a análise da atividade de invertase, o substrato utilizado foi sacarose (Sigma) na concentração final de 100 mM preparada em tampão citrato fosfato 200 mM, pH 5,5. Foram retiradas alíquotas nos tempos 0 e 4 horas de incubação a 30 °C. Em seguida, as alíquotas foram diluídas em água e submetidas à fervura por 5 min para a interrupção da reação. O teor de proteína foi estimado pelo método de Bradford (1976) com o reagente da Bio Rad. BSA (Sigma) (1 mg mL^{-1}) foi utilizada como padrão.

Análise das atividades enzimáticas

A atividade da 1-FEH foi determinada pela quantidade de frutose liberada na mistura de incubação, através da quantificação de açúcar redutor, de acordo com Somogyi (1945), utilizando-se frutose (Sigma) ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) como padrão.

A atividade de invertase foi determinada pela quantidade de frutose liberada na mistura de incubação, através da quantificação por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo DX-300, coluna Carbo Pac PA1, em sistema isocrático de eluição com 100 mM hidróxido de sódio. 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} .

Extração e análise de açúcares solúveis

Amostras de rizóforos (2 g) foram submersas em 15 mL de etanol 80 % (v/v) em ebulição por 5 min para inativação de enzimas e maceradas em gral até homogeneização. Em seguida os homogeneizados foram colocados em banho-maria a 80 °C por 5 min e centrifugados a 700 *g* por 15 min a temperatura ambiente. Os resíduos foram re-extraídos em 15 mL de etanol 80 % a 80 °C por 15 min, centrifugados nas condições acima, e os sobrenadantes das duas extrações foram reunidos. Os resíduos foram submetidos à extração aquosa (15 mL) em banho-maria a 60 °C por 30 min. Após filtração a vácuo em tecido de algodão, os resíduos foram re-extraídos e os filtrados reunidos ao extrato etanólico. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório até o volume de 9 mL e submetidos ao fracionamento dos fruto-oligo e -polissacarídeos por precipitação a frio com três volumes de etanol. A seguir foram centrifugados a 700 *g* por 20 min a 5 °C; os precipitados foram ressuspensos em água e constituíram as

frações de fruto-polissacarídeos e os sobrenadantes, concentrados em evaporador rotatório até eliminação do etanol, constituíram a fração de fruto-oligossacarídeos. Os conteúdos de frutose livre e ligada foram determinados nas duas frações, separadamente, através do método de antrona modificado para quantificação de cetoses (Jermyn, 1956), utilizando-se frutose ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) como padrão. Os conteúdos de açúcares redutores nas frações de fruto-oligossacarídeos foram determinados de acordo com o método de Somogyi (1945), utilizando-se frutose (Sigma) ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) como padrão.

Amostras de fruto-oligossacarídeos e de extrato bruto constituídas de alíquotas equivalentes de cada uma das três replicatas foram submetidas à deionização em colunas de troca iônica ($5 \times 1 \text{ cm}$) contendo resinas nas formas catiônica (Dowex 50 $\times$ 40 $\times$ 200) e aniônica (Dowex 1 $\times$ 8 – 200) (Carvalho & Dietrich 1993). Em seguida foram filtradas em membranas de $0,45 \mu\text{m}$ (Spartan – 3, da Aldrich) e analisadas por HPAEC/PAD.

Os fruto-oligossacarídeos foram analisados por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo ICS 3000 em coluna Carbo Pac PA1 ($2 \times 250\text{mm}$) na concentração de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ em equivalente de frutose. O gradiente foi estabelecido misturando-se o eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM 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 . Os potenciais aplicados ao PAD para 0-0,2s, 0,41-0,60s e 0,61-1s foram 0,05, 0,75 e – 0,15, respectivamente. O fluxo aplicado foi de $0,250 \text{ mL min}^{-1}$.

Os extratos brutos foram analisados por HAEPC/PAD em sistema Dionex modelo DX-300 em coluna Carbo Pac PA100 ($4 \times 250\text{mm}$) na concentração de 4 mg mL^{-1} em equivalente de frutose. O gradiente foi estabelecido misturando-se o eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio) com a seguinte programação: 0 - 4 min, 25 mM ; 4.1 - 20 min, 25 mM a 225 mM ; 20.1 – 35 min, 225 mM a 450 mM ; 35.1 – 36 min, 450 mM a 500 mM ; 36.1 – 41 min, 25 mM . 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} .

Extração e análise qualitativa do RNA

O RNA total dos rizóforos foi isolado utilizando-se *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen). O RNA isolado foi quantificado com base na determinação da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro e avaliado quanto à sua pureza pela razão entre as absorbâncias a 260 e a 280 nm. A qualidade do RNA obtido foi avaliada pela presença das bandas correspondentes ao rRNA 25S e 18S analisada em eletroforese em gel de agarose 1 % (p/v), preparado em tampão 1X TPE pH 8,0 e brometo de etídeo, conduzida sob voltagem constante (70 V) (Sambrook et al 1989).

Preparo da sonda radioativa do cDNA de 1-FEH de *Vernonia herbacea*

A sonda utilizada na análise de *Northern blotting* consistiu do fragmento de aproximadamente 1800 bp amplificado pela PCR e marcado com [³²P] α -dCTP, utilizando-se *Ready-To-Go Labelling Beads* (Amersham Biosciences). Para a amplificação do fragmento foram utilizados o cDNA da região proximal de rizóforos de plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C e oligonucleotídeos sintetizados com base na provável região codificadora da 1-FEH:

FEHS2 5'- CCCACGCAACCTTAAACTCATCG -3'

FEHR2 5'- CTCCATCTAAGTCGCACTCTTTACG – 3'

As condições utilizadas para a PCR foram: 94 °C por 5min, seguido de 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94 °C por 30 s, pareamento a 62 °C por 30s e de extensão a 72 °C por 2 min, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 min e 4 °C por 5 min. As reações consistiram de mistura de 0,5 mM de oligonucleotídeos, 3 mM de magnésio, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μ l de cDNA molde e 2,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) em 20 μ l de volume de reação.

Northern blotting

Foram utilizados os RNAs das regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos de plantas em fase de brotação natural e os RNAs da região proximal dos rizóforos de plantas induzidas à brotação e de plantas induzidas à brotação seguida de armazenamento a 5 °C. O RNA total (15 μ g) foi fracionado em gel de agarose 1,2 % (p/v) contendo formaldeído (2,2 M) e transferido por capilaridade para uma membrana

de nylon positivamente carregada (*HybondTMN⁺*, Amersham Biosciences), em tampão 20x SSC (cloreto de sódio 3 M e citrato de sódio 0,3M) por 17 horas (Sambrook et al 1989). O RNA foi permanentemente fixado à membrana por exposição à radiação UV, sendo esta corada com azul de metileno 0,04% (p/v) em acetato de sódio 0,5 M pH 5,2 para visualização dos rRNA e dos padrões (RNA markers 0,2 – 10 Kb, Sigma). As membranas foram pré-hibridizadas com a solução *PerfecthybTMPlus* (Sigma) por 3 horas a 68 °C e hibridizadas com a sonda radioativa de cDNA de 1-FEH Induzida/5 °C de *Vernonia herbacea*, obtida conforme apresentado no capítulo III, a 68 °C por uma noite. A sonda foi produzida pela marcação de fragmento do cDNA da 1-FEH com [³²P] α -dCTP, utilizando *Ready-To-Go Labelling Beads* (Amersham Biosciences). As membranas foram lavadas duas vezes com solução 2x SSC (cloreto de sódio 0,3 M e citrato de sódio 0,03M) contendo 0,1 % SDS (p/v) por 10 min a temperatura ambiente e uma vez com solução 1x SSC (cloreto de sódio 0,15 M e citrato de sódio 0,015 M) contendo 0,1% SDS por 30 min a 65 °C. Após lavagem, um filme de auto-radiografia foi posicionado sobre cada membrana hibridizada e estes foram mantidos na ausência de luz no interior de um cassete a -70 °C. O tempo de exposição foi de 4 dias (Sambrook et al. 1989) e após esse período, os filmes foram revelados manualmente em câmara escura por meio da seguinte sequência de lavagens: 4 min em solução reveladora (Kodak), 1 min em água destilada, 4 min em solução fixadora (Kodak), seguida de lavagem em água corrente.

RESULTADOS

Mobilização de frutanos em rizóforos de *Vernonia herbacea* durante a fase de brotação natural

Atividade e expressão de 1-FEH

As análises da 1-FEH de rizóforos de plantas em fase de brotação natural permitiram verificar que ocorreram variações na sua atividade e expressão ao longo deste período, conforme mostra a figura 1a.

A atividade da 1-FEH na região proximal, baixa no início da brotação em 17 agosto, apresentou um aumento gradual até o dia 09 de setembro, quando atingiu o valor máximo para a fase analisada. Este aumento coincidiu com o período de crescimento dos ramos aéreos logo após o início da brotação. Em seguida, a atividade da 1-FEH na região proximal diminuiu gradualmente até o dia 23 de setembro. As atividades da 1-FEH nas regiões mediana e distal foram mais baixas do que na região proximal, exceto no início (17 agosto) e final (23 setembro) do período analisado e não apresentaram diferenças quando comparadas entre si.

A análise da expressão gênica da 1-FEH por *Northern blotting* mostrou diferenças nas intensidades dos sinais de hibridização ao longo do período analisado, especialmente na região proximal dos rizóforos (figura 1b). Variações na intensidade do sinal semelhantes aquelas da região proximal não foram detectadas nas regiões mediana e distal que apresentaram um sinal de hibridização fraco. Um forte sinal de hibridização foi detectado na região proximal do rizóforo, especialmente em 09 de setembro, indicando acúmulo de transcrito de 1-FEH nesta data. O forte sinal de hibridização detectado neste dia coincidiu com a atividade elevada de 1-FEH detectada nesta região do rizóforo neste dia.

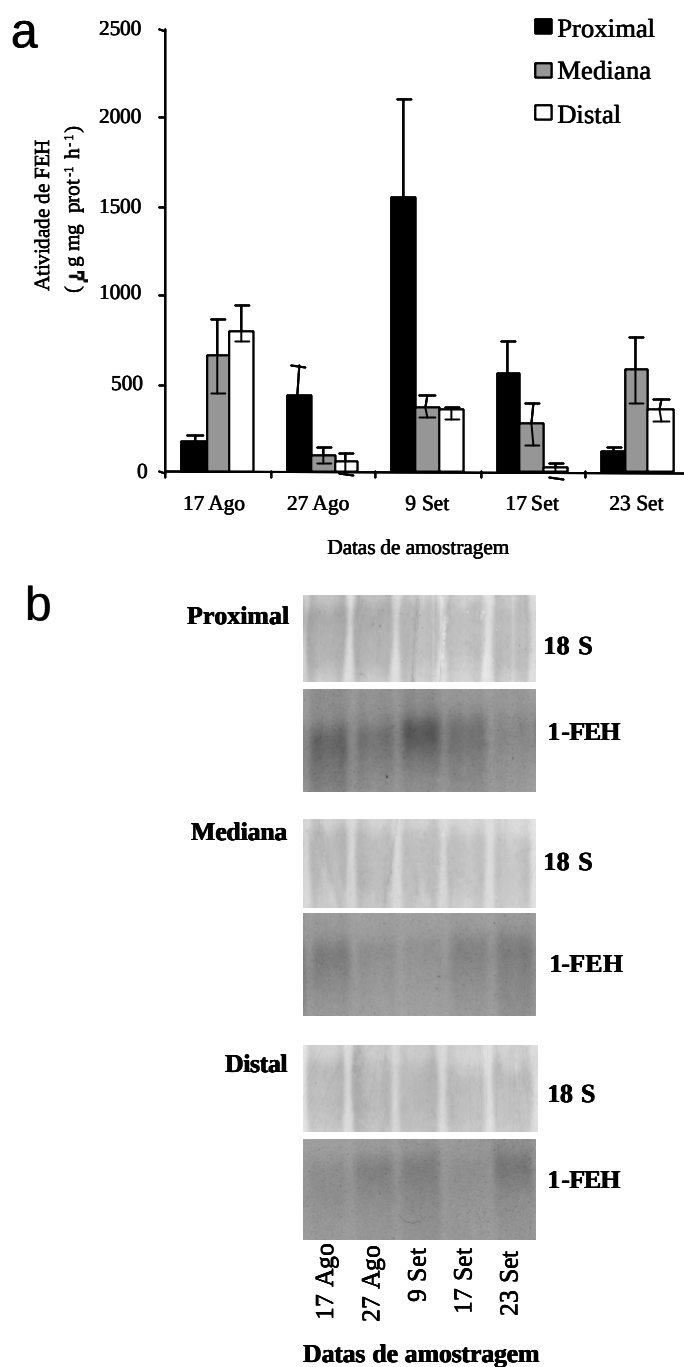


Figura 1 Atividade e expressão gênica da 1-FEH nas regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. a) Atividade enzimática calculada com base na quantidade de açúcar redutor liberado durante os 30 primeiros minutos de incubação. As barras representam o erro padrão (n=3). b) *Northern blotting* da membrana hibridizada com sonda da 1-FEH Induzida/ 5 °C de *Vernonia herbacea*. A exposição para a auto-radiografia foi de quatro dias a -70 °C. O RNA total (15 µg) foi isolado dos tecidos indicados e a membrana foi corada com azul de metileno 0,04 % em acetato de sódio 0,5 M pH 5,2 para visualização do RNA ribossomal 18S.

O conteúdo de proteína na região proximal apresentou variações durante a fase de brotação (figura 2). Houve um aumento gradual até o dia 09 de setembro, seguido de uma diminuição até o final do período analisado, semelhante ao perfil de atividade enzimática e ao padrão de expressão da 1-FEH, exibidos na figura 1a e 1b para a região proximal do rizóforo. Os conteúdos de proteína nas regiões mediana e distal apresentaram variações ao longo do período de análise, porém foram semelhantes entre si.

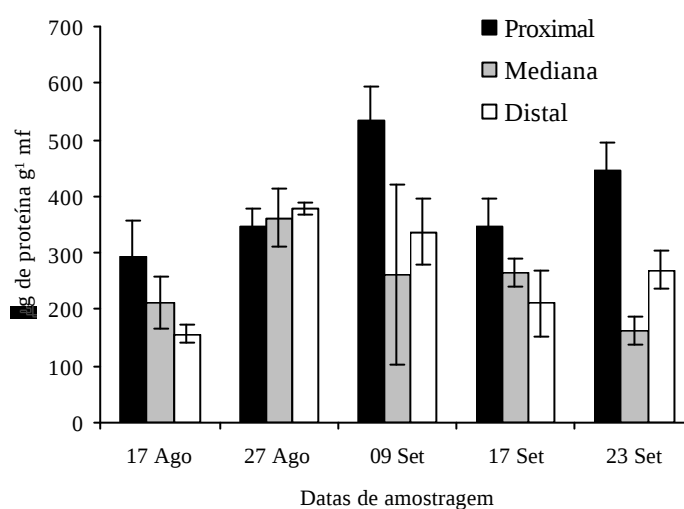


Figura 2. Conteúdo de proteína total nas regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. As barras representam o erro padrão (n=3).

Atividade de invertase

A atividade da invertase apresentou variações tanto entre as três regiões do rizóforo como ao longo do período de brotação das plantas (figura 3). Houve uma diminuição gradual da atividade até o dia 09 de setembro na região proximal. Esta atividade baixa coincidiu com o período de crescimento dos ramos aéreos e com a atividade mais elevada da 1-FEH no período. Em seguida, a atividade aumentou novamente e atingiu valor semelhante ao do início do período. A atividade da invertase na região mediana, inicialmente baixa, apresentou um aumento no dia 17 de setembro, permanecendo elevada até o final do período analisado. Na região distal a atividade apresentou as maiores oscilações incluindo uma diminuição nos dias 27 agosto e 09 de setembro e aumento em 17 de setembro. Observou-se ainda que nos dias 09 e 17 de setembro houve um aumento gradual da atividade da invertase ao longo do eixo de crescimento do rizóforo no sentido distal.

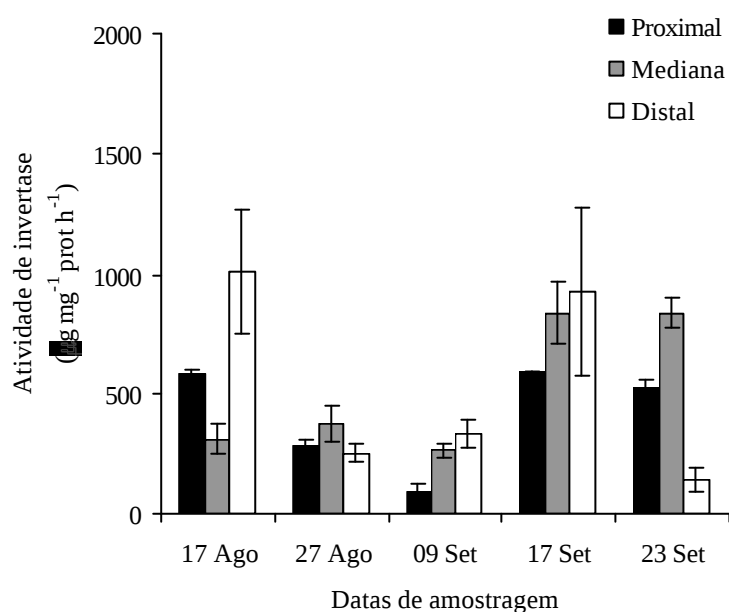


Figura 3. Atividade de invertase nas regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. Atividade calculada com base na quantidade de frutose liberada durante 4 horas de incubação. As barras representam o erro padrão (n=3).

Análise de açúcares solúveis

A análise dos açúcares solúveis em rizóforos de plantas em fase de brotação natural (figura 4) revelou uma diminuição no conteúdo de frutanos totais no dia 09 de setembro na região proximal. Os conteúdos de fruto-oligossacarídeos (figura 4) e de açúcares redutores (figura 5) na região proximal diminuíram gradualmente até o dia 09 de setembro. A diminuição neste ponto de análise coincidiu com a atividade elevada e aumento de transcritos de 1-FEH na região proximal do rizóforo. Em seguida, os açúcares solúveis voltaram a apresentar valores semelhantes aos encontrados no início da brotação. O conteúdo de frutanos totais nas regiões mediana e distal foi, em geral, maior do que na região proximal do rizóforo, enquanto o conteúdo de fruto-oligossacarídeos foi semelhante nas três regiões, exceto nos dias 09 e 23 de setembro, quando a região proximal apresentou valores inferiores ao das demais regiões.

O conteúdo de açúcares redutores na região mediana apresentou uma tendência ao acúmulo durante a fase analisada (figura 5). Na região distal o conteúdo de açúcares redutores foi inferior ao verificado nas demais regiões e praticamente constante durante o período de brotação.

A razão polissacarídeos:oligossacarídeos inferior a 1 foi observada apenas na região proximal do rizóforo em 09 de setembro refletindo a maior proporção de fruto-oligossacarídeos nesta região do rizóforo, neste ponto de análise (figura 6). A razão polissacarídeos:oligossacarídeos superior a 1 detectada nos demais pontos de análise na região proximal e nas regiões mediana e distal durante toda a fase de brotação, indica a predominância de polissacarídeos nestes tecidos. Entretanto, verificou-se uma tendência a valores inferiores na razão polissacarídeos:oligossacarídeos na região proximal quando comparados às regiões mediana e distal.

A análise dos oligossacarídeos por HPAEC/PAD indicou que as variações observadas durante a fase de brotação ocorreram principalmente na região proximal (figura 7). Pode-se observar já no início da brotação (17 agosto) um aumento do pico referente à frutose, quando comparado com o perfil de fruto-oligossacarídeos característico da fase de dormência, que antecede a brotação. Houve um aumento gradual da frutose até o dia 09 de setembro, acompanhado de diminuição na proporção de fruto-oligossacarídeos. O aumento dos monossacarídeos glucose e frutose, e a diminuição na proporção de fruto-oligossacarídeos foram confirmados pela análise dos frutanos totais da região proximal do rizóforo por HPAEC/PAC (figura 8). O aumento

da frutose na fração de oligossacarídeos também foi verificado na região mediana do rizóforo, porém mais discretamente (figura 7), assim como o aumento da proporção de monossacarídeos, incluindo a frutose, entre os frutanos totais (figura 9). Entretanto, a maior proporção de monossacarídeos, em relação aos fruto-oligossacarídeos, foi encontrada na região proximal, especialmente no dia 09 de setembro (figuras 7 e 8). Na região distal dos rizóforos observaram-se apenas pequenas variações na composição de fruto-oligossacarídeos (figura 7) e de frutanos totais (figura 10).

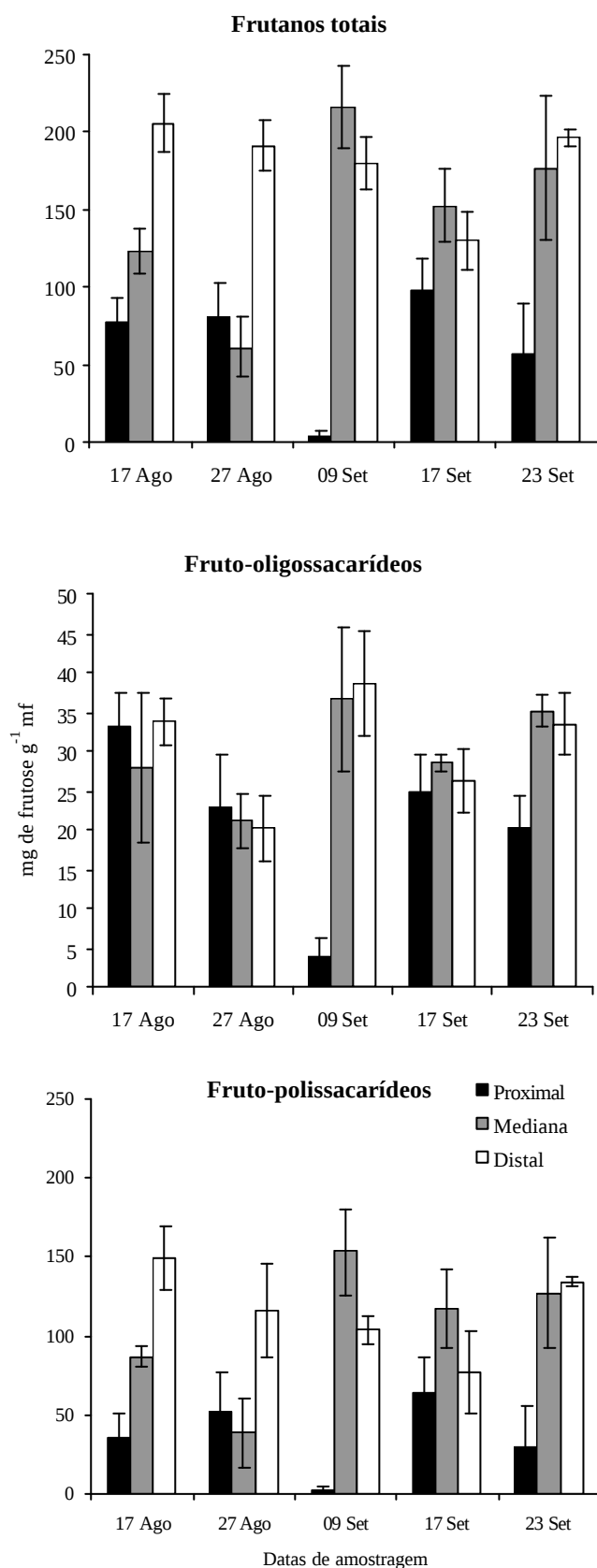


Figura 4 Conteúdo de açúcares solúveis nas regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. As barras representam o erro padrão (n=3).

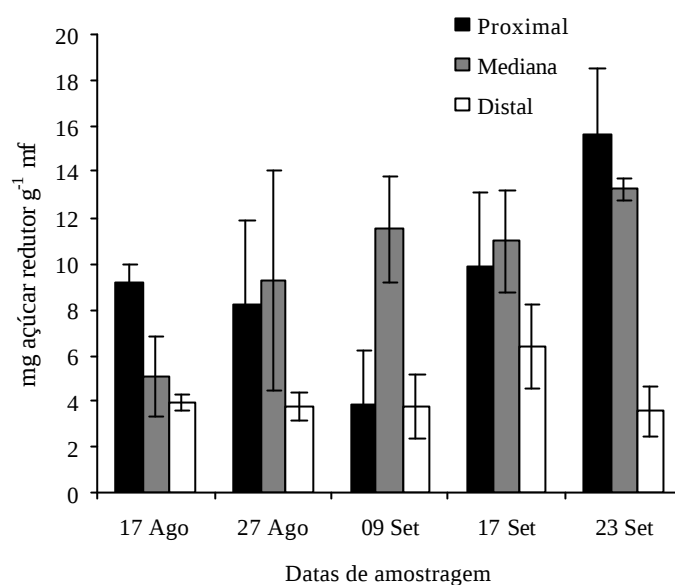


Figura 5. Conteúdo de açúcares redutores nas regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. As barras representam o erro padrão (n=3).

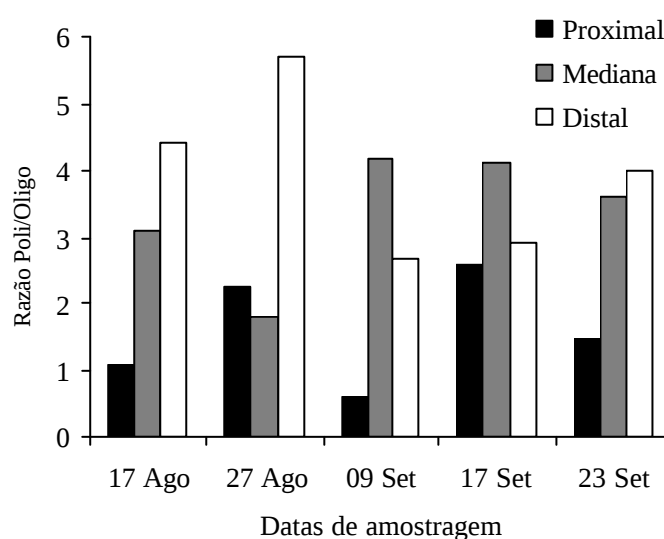


Figura 6. Razão polissacarídeos:oligosacarídeos nas regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural.

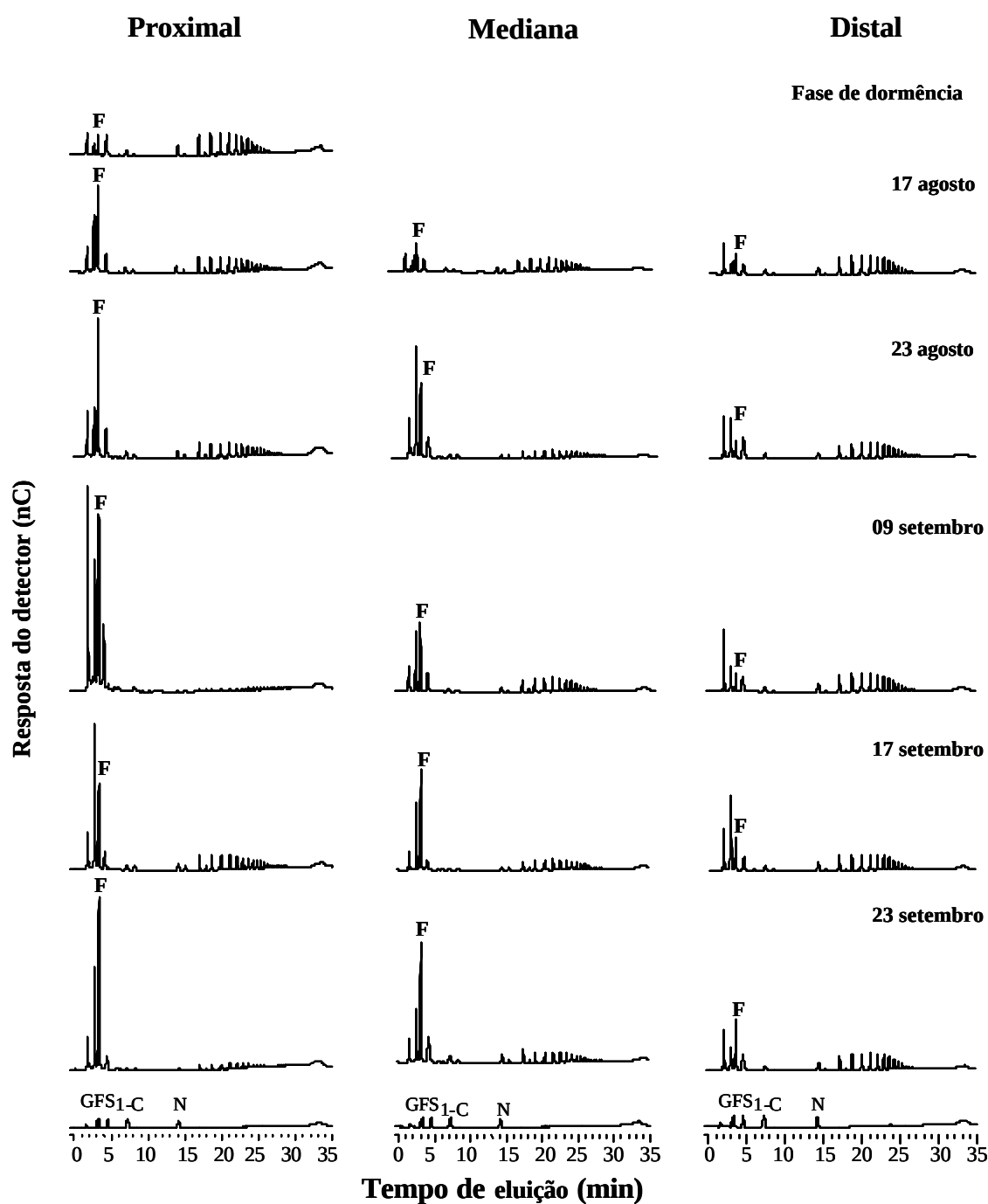


Figura 7. Análise por HPAEC/PAD dos fruto-oligossacarídeos extraídos das regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. G, F, S, 1-C e N correspondem aos padrões glucose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose, respectivamente.

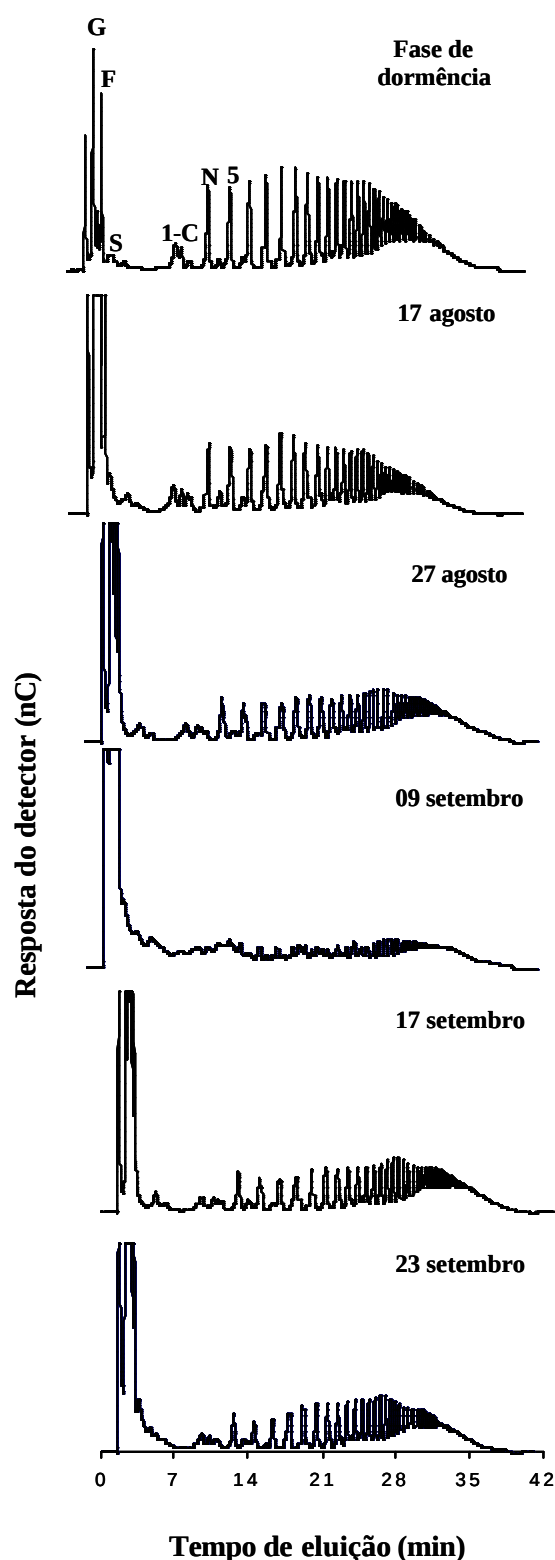


Figura 8. Análise por HPAEC/PAD dos frutanos totais da região proximal dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. G, F, S, 1-C, N e 5 correspondem à glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutano com grau de polimerização 5, respectivamente.

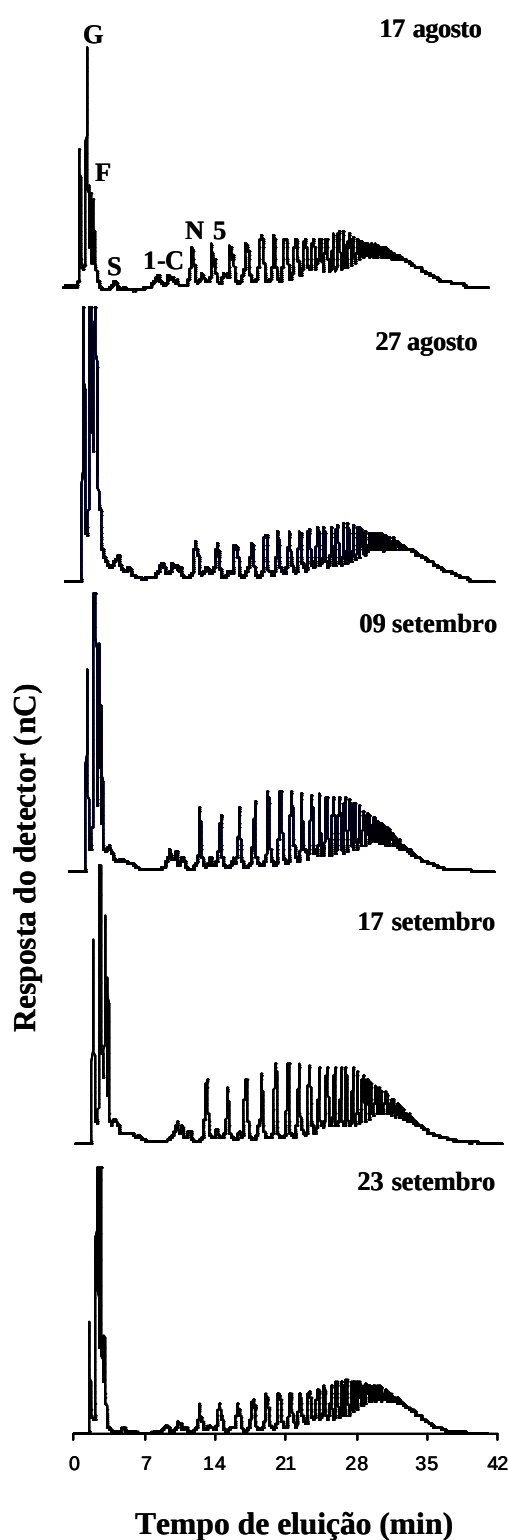


Figura 9. Análise por HPAEC/PAD dos frutanos totais da região mediana dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. G, F, S, 1-C, N e 5 correspondem à glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutano com grau de polimerização 5, respectivamente.

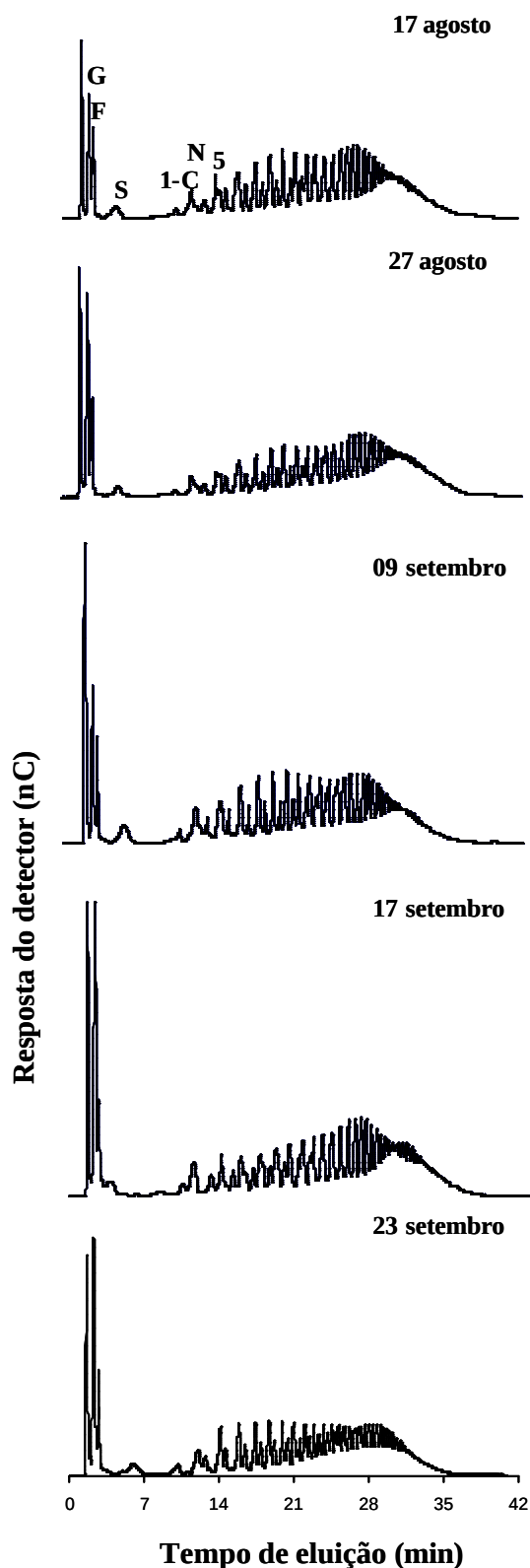


Figura 10. Análise por HPAEC/PAD dos frutanos totais da região distal dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* em fase de brotação natural. G, F, S, 1-C, N e 5 correspondem à glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutano com grau de polimerização 5, respectivamente.

Mobilização de frutanos em rizóforos de *Vernonia herbacea* induzidas à brotaçãoAtividade e expressão de 1-FEH

A análise da atividade e da expressão da 1-FEH realizada na região proximal de rizóforos de plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos e armazenamento a 5 °C revelou variações durante o período, conforme mostra a figura 11.

A atividade da 1-FEH (figura 11a) em plantas Induzidas, baixa nos primeiros dias após a excisão dos ramos aéreos, apresentou um aumento de atividade no 17º dia, seguido de diminuição no 20º dia e um novo aumento aos 27 dias. Em plantas Induzidas/5 °C, a atividade da 1-FEH aumentou já nos primeiros sete dias, atingiu os valores máximos aos 17 e 20 dias e diminuiu em seguida. A atividade da 1-FEH de plantas Induzidas/5 °C foi, em geral, superior à de plantas Induzidas durante o período analisado. Observou-se ainda, que a atividade da 1-FEH manteve-se elevada por um período maior nas plantas Induzidas/5 °C do que nas plantas Induzidas. Em plantas Induzidas/5 °C, a atividade da 1-FEH parece ter sido induzida em duas etapas: a primeira, sete dias após o início do tratamento e a segunda no 17º dia.

A análise da expressão gênica da 1-FEH por *Northern blotting* nos rizóforos de plantas Induzidas e Induzidas/5 °C é apresentada na figura 11b. Em plantas Induzidas, o aumento do transcrito da 1-FEH ocorreu gradualmente atingindo o máximo no 20º dia após a excisão dos ramos aéreos. Em plantas Induzidas/5 °C foram detectadas variações no acúmulo do transcrito de 1-FEH ao longo do período analisado e um sinal de hibridização mais forte do que o verificado nas plantas Induzidas. As variações coincidiram com as variações na atividade da 1-FEH ao longo do período de brotação, sendo o maior acúmulo do transcrito de 1-FEH detectado, especialmente, aos 7, 17 e 20 dias após a excisão dos ramos aéreos.

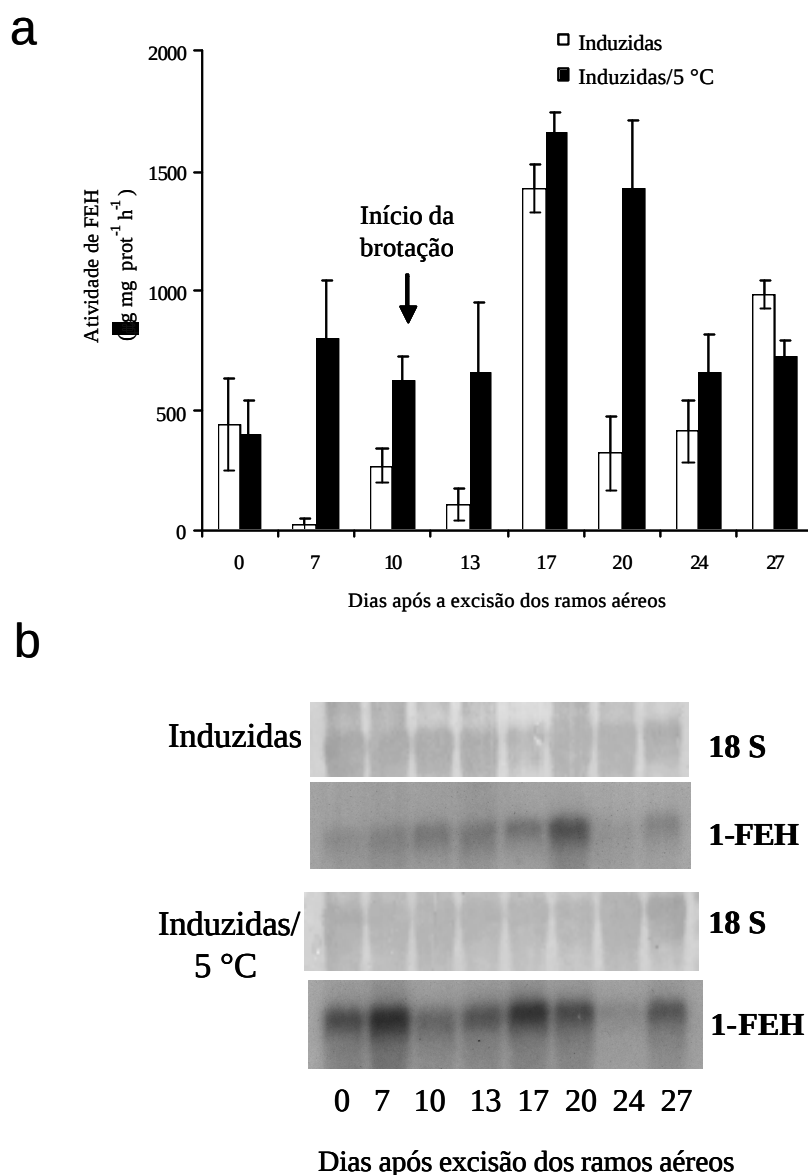


Figura 11. Atividade e expressão de 1-FEH na região proximal de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Induzidas) e de plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C por 7 dias (Induzidas/5 °C). a) Atividade enzimática calculada com base na quantidade de açúcar redutor liberado durante a primeira hora de incubação. As barras representam o erro padrão (n=3). b) *Northern blotting* das membranas hibridizadas com sonda da 1-FEH Induzida/ 5 °C de *Vernonia herbacea*. A exposição para a auto-radiografia foi de quatro dias a -70 °C. O RNA total (15 µg) foi isolado dos tecidos indicados e a membrana foi corada com azul de metileno 0,04 % em acetato de sódio 0,5 M pH 5.2 para visualização do RNA ribossomal 18S.

O acúmulo do transcrito de 1-FEH no 20º dia foi verificado tanto nos tecidos induzidos à brotação (Induzidas), quanto nos tecidos induzidos e armazenados a 5° C (Induzidas/5 °C). Resultado semelhantemente ao resultado obtido no experimento de *Northern blotting* (figura 2) apresentado no capítulo III.

O acúmulo diferencial dos transcritos de 1-FEH observado em plantas Induzidas e Induzidas/5 °C não foi acompanhado de aumento no conteúdo de proteína. A figura 12 mostra que os conteúdos de proteína dos rizóforos de plantas Induzidas e de plantas Induzidas/5 °C foram semelhantes e apresentaram pequenas variações durante o período analisado.

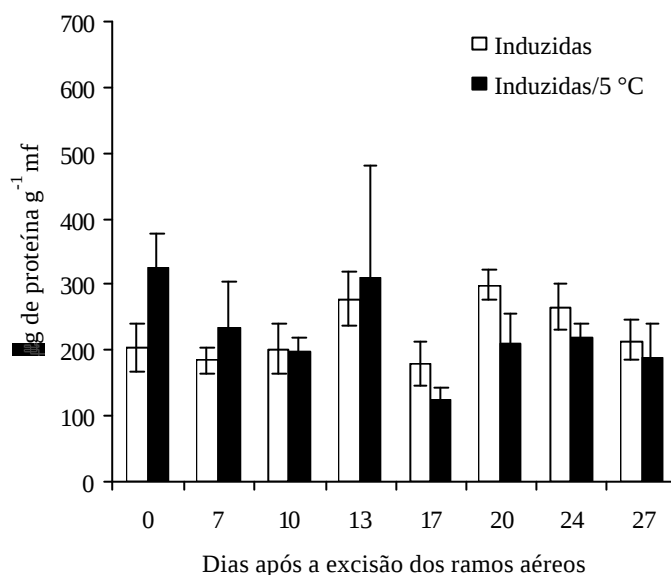


Figura 12. Conteúdo de proteína total em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Induzidas) e de plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C por 7 dias (Induzidas/5 °C). As barras representam o erro padrão (n=3).

Atividade de invertase

A atividade de invertase em rizóforos de plantas Induzidas apresentou pequenas variações durante o período de avaliação (figura 13). Da mesma forma, em plantas Induzidas/5°C, a atividade da invertase também apresentou oscilações. Entretanto, nestas plantas a atividade foi, em geral, inferior à verificada nas plantas Induzidas, com exceção do dia 7, quando esta foi mais elevada nas plantas Induzidas/5 °C. Ao final do período analisado, a atividade da invertase apresentou um aumento em ambos os tratamentos.

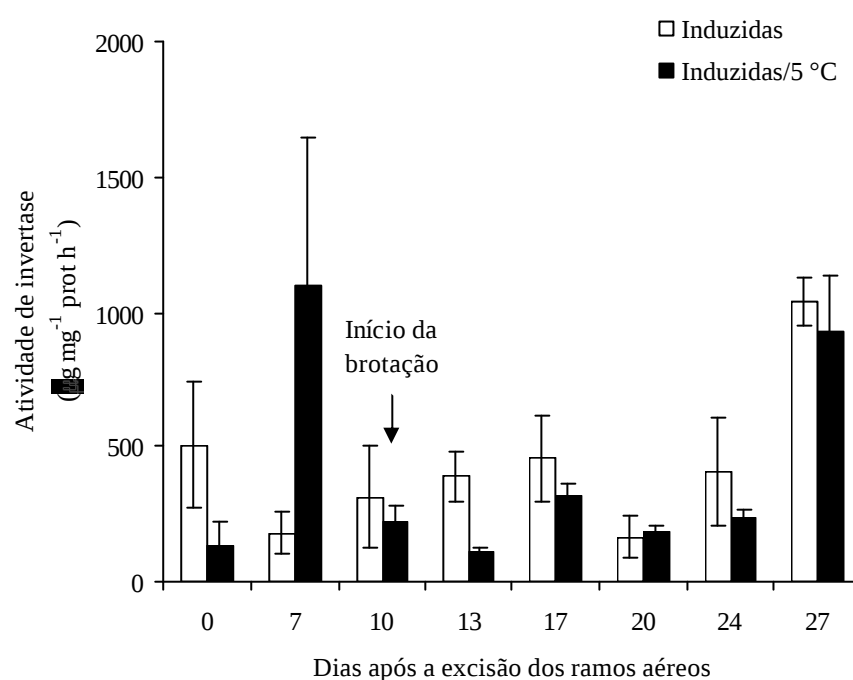


Figura 13. Atividade de invertase em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Induzidas) e de plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C por 7 dias (Induzidas/5 °C). Atividade calculada com base na quantidade de frutose liberada durante 4 horas de incubação. As barras representam o erro padrão (n=3).

Análise de açúcares solúveis

O conteúdo de frutanos totais nos rizóforos de plantas Induzidas e Induzidas /5 °C apresentou uma diminuição após a excisão dos ramos aéreos (figura 14). A tendência à diminuição no conteúdo destes açúcares foi mais acentuada nas plantas Induzidas e ocorreu principalmente devido à diminuição dos fruto-polissacarídeos, uma vez que o conteúdo de fruto-oligossacarídeos apresentou pequena variação ao longo do período analisado.

Em plantas Induzidas, o conteúdo de fruto-oligossacarídeos apresentou uma diminuição gradual até os 17 dias, seguido de um aumento também gradual até o 24º dia e foi inferior ao conteúdo em plantas Induzidas/5 °C. O conteúdo de fruto-oligossacarídeos em plantas Induzidas/5 °C apresentou pequenas variações. Entretanto, as variações no conteúdo de açúcares redutores em plantas Induzidas/5 °C foram mais acentuadas e maiores valores foram detectados nos dias 7, 20 e 27 após a excisão dos ramos aéreos (figura 15). Observou-se também que aos 17 dias, embora as plantas Induzidas tenham apresentado conteúdo de açúcar redutor semelhante ao de plantas Induzidas/5 °C, o conteúdo de fruto-oligossacarídeos foi maior em plantas Induzidas/5 °C neste dia.

A razão polissacarídeos:oligossacarídeos (figura 16) superior a 1 foi observada apenas em plantas Induzidas nos primeiros treze dias após a excisão dos ramos aéreos o que indica para estas plantas uma maior proporção de fruto-polissacarídeos neste período. A partir dos 17 dias após a excisão dos ramos aéreos, esta razão foi inferior a 1, indicando maior concentração de fruto-oligossacarídeos em plantas Induzidas. A diminuição da razão polissacarídeos:oligossacarídeos aos 17 dias coincidiu com a atividade elevada de 1-FEH neste dia.

Em plantas Induzidas/5 °C, a razão polissacarídeos:oligossacarídeos inferior a 1 foi detectada nos 10, 17, 20 e 27 dias após a excisão dos ramos aéreos, especialmente no dia 20 quando esta razão foi de 0,005, indicando a predominância de oligossacarídeos na composição de frutanos totais nessas plantas. Comparando-se as plantas Induzidas/5 °C e as Induzidas, verificou-se que as primeiras apresentaram razão polissacarídeos:oligossacarídeos inferior até os 13 dias após a excisão dos ramos aéreos.

A análise dos fruto-oligossacarídeos de plantas Induzidas por HPAEC/PAD (figura 17) mostrou o aumento gradual do pico referente à frutose até os 17 dias,

seguido de diminuição até os 24 dias e um novo aumento aos 27 dias. Os pontos que apresentaram maior proporção de frutose em relação aos demais membros da série de inulina coincidiram com os dias de maior atividade de 1-FEH (figura 11a). O aumento de monossacarídeos glucose e frutose em relação aos fruto-oligossacarídeos, no dia 17 em plantas Induzidas foi também verificado na amostra de frutanos totais (figura 18). A análise dos fruto-oligossacarídeos de plantas Induzidas/5 °C por HPAEC/PAD (figura 17) mostrou o aumento da frutose aos 7 e 20 dias após a excisão dos ramos aéreos.

Comparando-se o conteúdo e a composição dos frutanos dos dois grupos de plantas, Induzidas e Induzidas/5 °C observou-se uma predominância de fruto-oligossacarídeos em plantas Induzidas/5 °C (figura 14). O conteúdo de monossacarídeos aumentou paralelamente ao aumento da atividade de 1-FEH e foi maior em plantas Induzidas/5 °C desde o início do período experimental (figura 17).

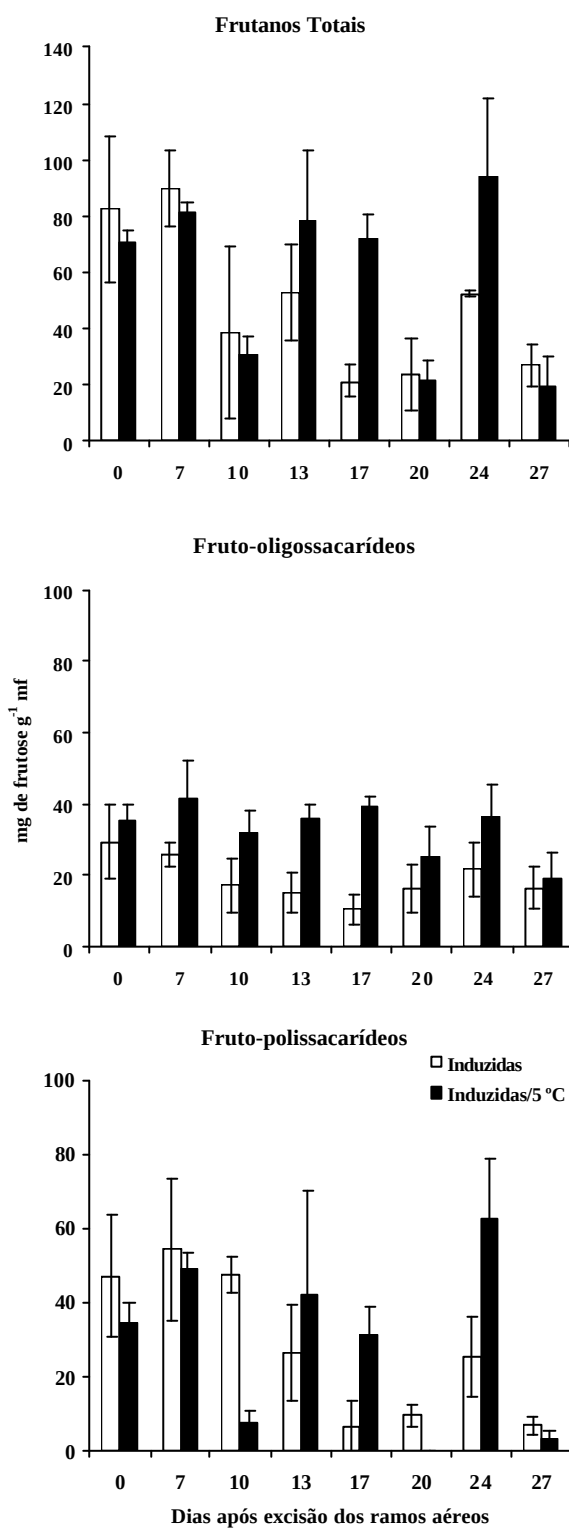


Figura 14. Conteúdo de açúcares solúveis em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Induzidas) e de plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C por 7 dias (Induzidas/5 °C). As barras representam o erro padrão (n=3).

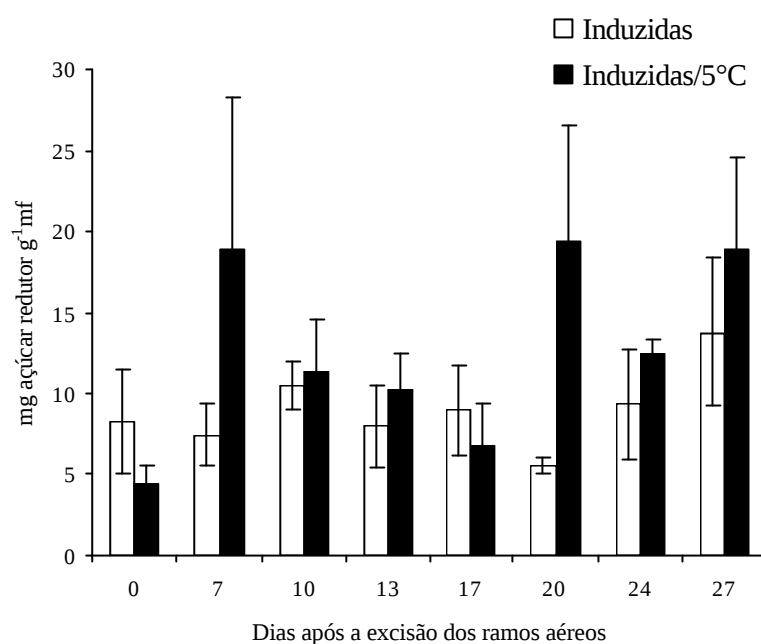


Figura 15. Conteúdo de açúcares redutores em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Induzidas) e de plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C por 7 dias (Induzidas/5 °C). As barras representam erro padrão (n=3).

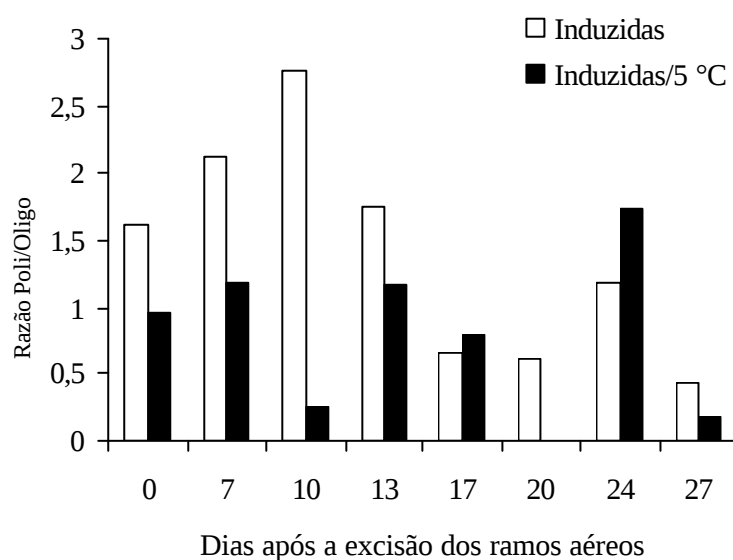


Figura 16. Razão polissacarídeos:oligosacarídeos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Induzidas) e de plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C por 7 dias (Induzidas/5 °C).

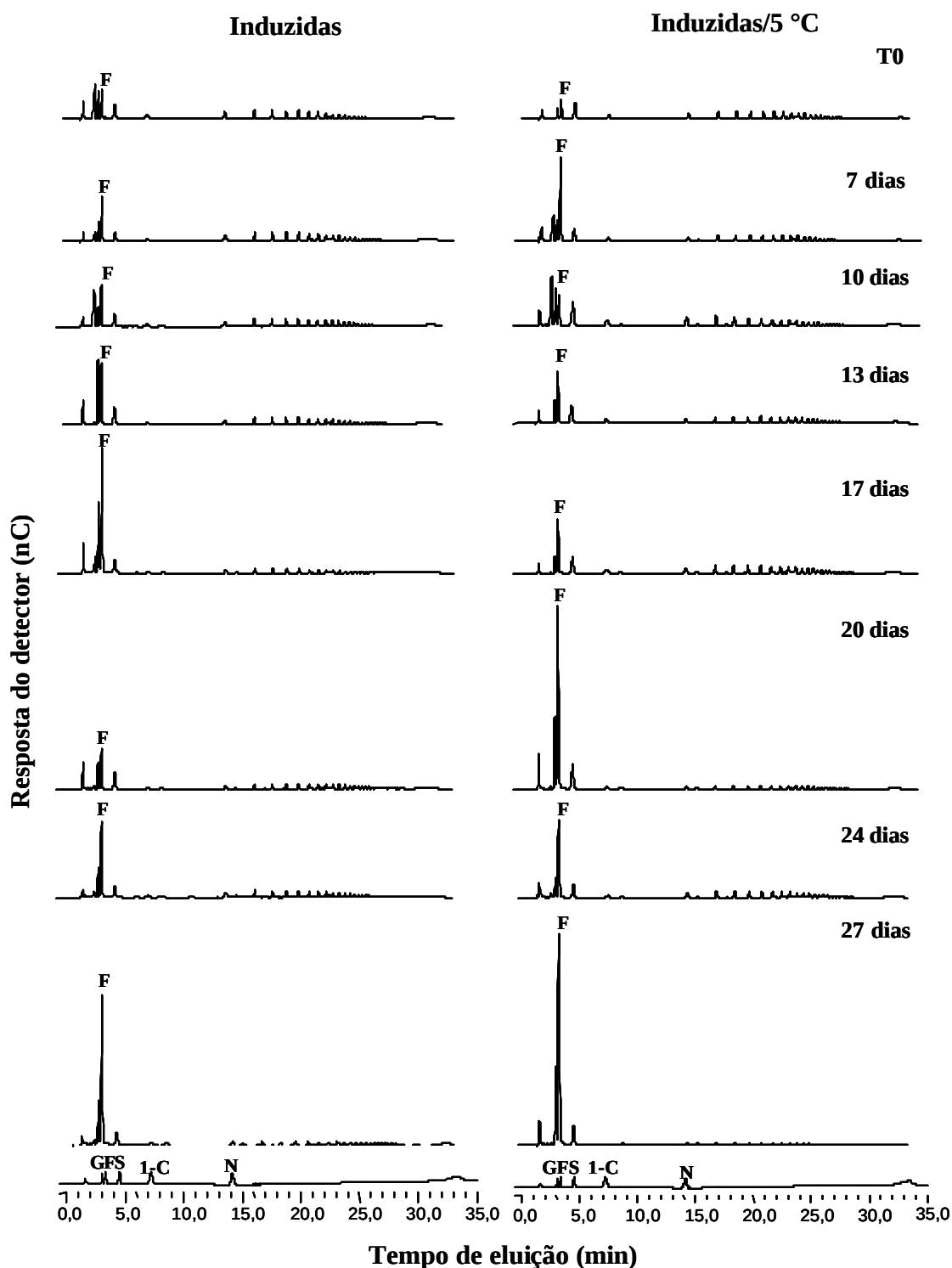


Figura 17. Análise por HPAEC/PAD dos fruto-oligosacarídeos extraídos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Induzidas) e de plantas de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C por 7 dias (Induzidas/5 °C). G, F, S 1-C e N correspondem aos padrões (P) glucose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose, respectivamente.

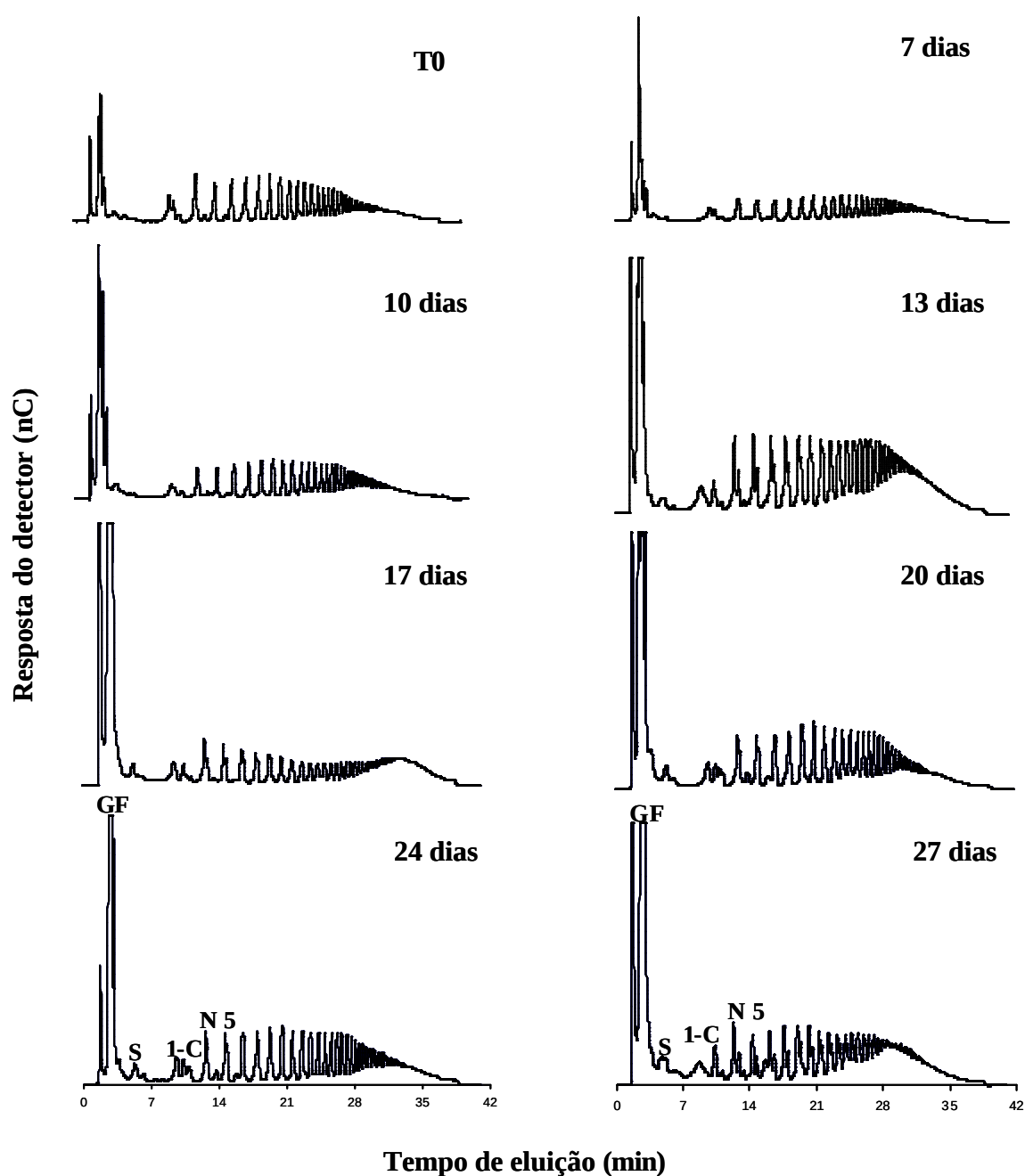


Figura 18. Análise por HPAEC/PAD dos frutanos totais de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Induzidas). G, F, S 1-C, N e 5 correspondem à glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutano com grau de polimerização 5, respectivamente.

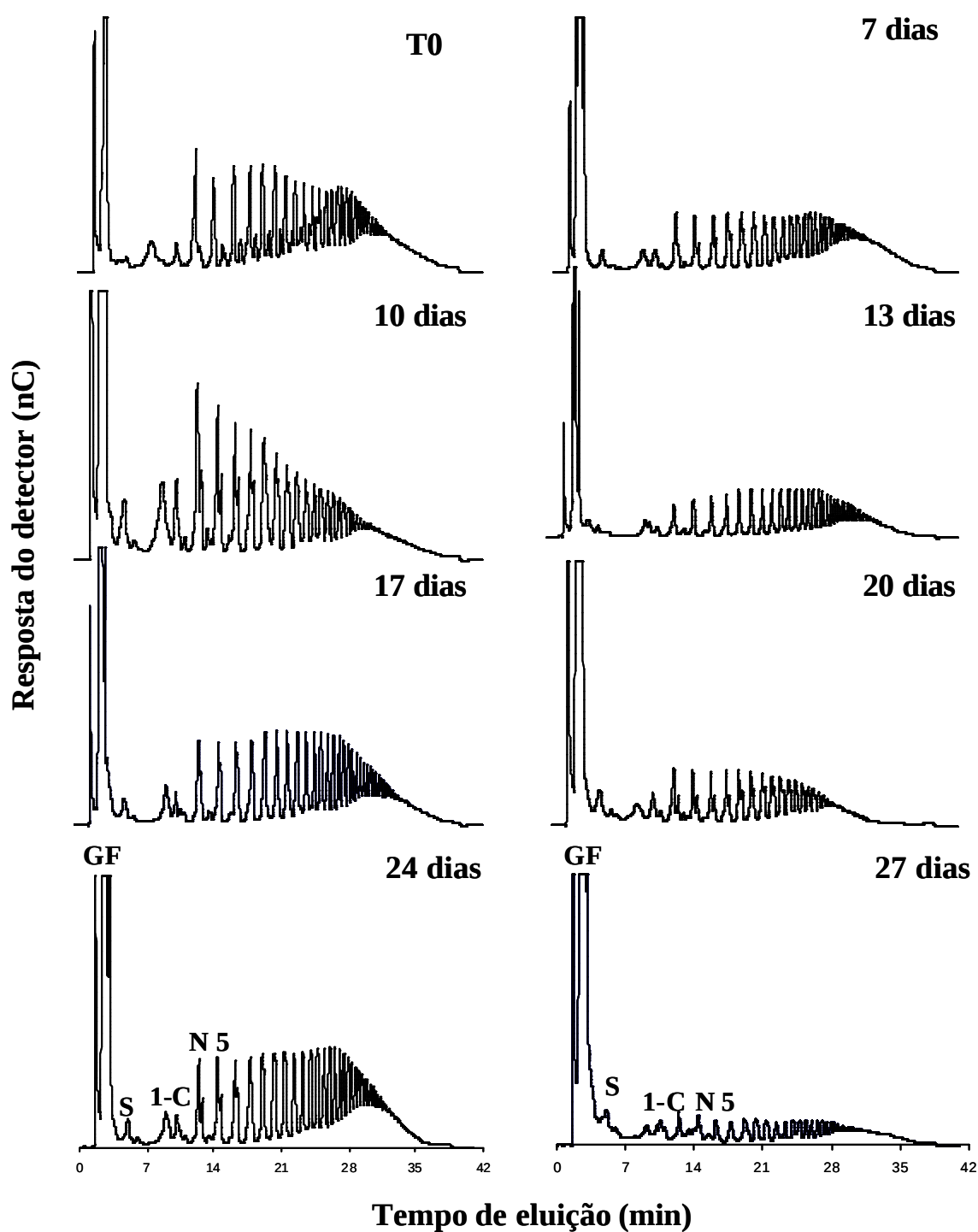


Figura 19. Análise por HPAEC/PAD dos frutanos totais de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação e armazenadas a 5 °C por 7 dias (Induzidas/5 °C). G, F, S 1-C, N e 5 correspondem à glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutano com grau de polimerização 5, respectivamente.

DISCUSSÃO

Analisando-se o processo de mobilização de frutanos em rizóforos de *V. herbacea* durante a fase de brotação natural foi possível apontar a data de amostragem de 09 de setembro e a região proximal do rizóforo como sendo a de maior mobilização de frutanos durante o período. Na região proximal do rizóforo, neste ponto de análise, foram detectadas a atividade mais elevada (figura 1a) e a maior expressão gênica de 1-FEH (figura 1b), que foram acompanhadas de diminuição das frações de fruto-poli e -oligossacarídeos (figura 4), diminuição de açúcares redutores (figura 5), aumento de frutose na fração de fruto-oligossacarídeos (figura 7) e de atividade baixa de invertase (figura 3).

O aumento da atividade de FEH em plantas de *V. herbacea* na fase de brotação já havia sido detectado por Ribeiro Sobrinho *et al.* (1996). Posteriormente, Portes & Carvalho (2006) verificaram a ocorrência de uma distribuição espacial da atividade da FEH ao longo do eixo de crescimento do rizóforo e que o aumento da atividade de FEH foi observado, especialmente, na região proximal desse órgão onde ocorre o desenvolvimento das gemas que dão origem aos ramos aéreos.

Com relação ao conteúdo de frutanos, resultados semelhantes já haviam sido reportados por Carvalho & Dietrich (1993) para rizóforos de *V. herbacea*. Foram verificados uma queda na concentração de frutano total e um aumento de frutose livre nas fases de brotação e floração, sugerindo a ocorrência de hidrólise de frutanos associada ao crescimento dos novos ramos e o desenvolvimento floral. Os níveis de frutanos voltaram a aumentar no final do verão, durante a fase vegetativa. A diminuição do conteúdo de frutanos e predominância de frutose livre na fase de brotação foram verificadas também em raízes tuberosas de *V. discolor* (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993).

Um aumento na atividade da FEH durante a fase de brotação foi detectado também em raízes de *T. officinale* por Rutherford & Deacon (1974). Estes autores sugeriram que o aumento poderia, pelo menos em parte, estar relacionado com a redução do conteúdo de frutanos nas raízes durante esta fase. Observaram também que os níveis destes compostos voltaram ao normal no final do verão, durante a fase de crescimento vegetativo destas plantas.

Em *H. tuberosus* (Marx *et al.* 1997), a atividade de 1-FEH também aumentou gradualmente durante as fases de dormência e brotação. No início da dormência, um

aumento proeminente na atividade da 1-FEH foi acompanhado de aumento nas concentrações de frutose livre e sacarose. Subseqüentemente, a concentração de frutose diminuiu, enquanto a concentração de sacarose permaneceu alta até o final da fase de dormência. No início da fase de brotação, houve um aumento acentuado na concentração de frutose, embora a atividade de 1-FEH tenha aumentado discretamente. Os autores discutem que a concentração de sacarose presente nos tubérculos de *H.tuberosus* na fase de dormência seria suficiente para inibir a atividade de 1-FEH *in planta*. Entretanto, quando os tubérculos iniciaram a brotação, a sacarose foi exportada para suprir o crescimento dos ramos aéreos e, como consequência, a concentração de sacarose vacuolar diminuiu, permitindo a elevação da atividade de 1-FEH.

O mesmo parece acontecer em plantas de *V. herbacea*; a baixa atividade de invertase (figura 3) e baixa proporção de sacarose nas frações de fruto-oligossacarídeos (figura 7) encontrados na região proximal do rizóforo durante a fase de brotação natural são condições que favorecem a atividade elevada de FEH encontrada nesta região em 09 de setembro (figura 1a). A baixa atividade de invertase na região proximal do rizóforo de plantas em fase de brotação também foi relatada por Portes & Carvalho (2006).

A análise da expressão gênica da 1-FEH por *Northern blotting* (figura 1b) revelou que as variações da expressão de 1-FEH ocorrem primordialmente na região proximal do rizóforo, uma vez que não foram detectadas variações nas intensidades do sinal de hibridização nas regiões mediana e distal. O aumento total de proteínas (figura 2) detectado para a região proximal em 09 de setembro é um sinal de intensa atividade metabólica e de demanda por novas proteínas. O aumento da atividade de 1-FEH (figura 1a) deve-se à indução da expressão do gene da 1-FEH, sendo, claramente, evidenciado que a 1-FEH é uma das proteínas requisitadas nesse período, quando ocorre a mobilização de frutanos (figura 4) para suprir a demanda energética da planta durante o crescimento dos ramos aéreos.

O aumento de transcritos e da atividade de 1-FEH está claramente associado ao processo de brotação em *V. herbacea*. O aumento desta atividade enzimática concomitante à diminuição no conteúdo de frutanos em rizóforos de plantas induzidas à brotação foi verificado anteriormente por Asega & Carvalho (2004) 20 dias após a excisão dos ramos aéreos. Mais recentemente, Portes & Carvalho (2006) demonstraram que estas variações ocorreram principalmente na região proximal do rizóforo.

No presente trabalho, além da atividade da 1-FEH e da análise do conteúdo e da composição de frutanos em rizóforos de plantas de *V. herbacea* sob diferentes condições de brotação, foi analisado também o padrão de expressão gênica de 1-FEH durante este processo.

A atividade elevada de 1-FEH em plantas Induzidas (figura 11a) foi detectada próximo ao dia de maior expressão de 1-FEH (figura 11b). Nestas plantas a maior taxa de despolimerização dos frutanos ocorreu por volta dos 17-20 dias após a excisão dos ramos aéreos, quando foram observados os menores conteúdos de fruto-poli e -oligossacarídeos (figura 14). A alta atividade de 1-FEH e a baixa atividade de invertase (figura 13) aos 17 dias indica baixos níveis de sacarose o que favorece a atividade de 1-FEH, uma vez que esta enzima é inibida por este dissacarídeo.

O armazenamento a 5 °C de plantas induzidas à brotação intensificou o aumento da atividade e da expressão da 1-FEH (figura 11a e 11b), além de permitir a manutenção desta atividade por um período de tempo maior do que o verificado em plantas Induzidas e o conteúdo mais elevado de fruto-oligossacarídeos ao longo do período de análise.

A atividade de 1-FEH (figura 11a) parece ter sido induzida em duas etapas: a primeira, detectada sete dias após o início do tratamento, induzida pelo frio e a segunda, aos 17 dias, induzida pela desfolhação e intensificada pelo frio. Esta hipótese é sustentada pelo aumento de transcritos de 1-FEH detectado na análise de expressão por *Northern blotting* que revelou a expressão de 1-FEH já no início do tratamento em plantas Induzidas/5°C com sinal de hibridização mais forte do que aquele detectado em plantas Induzidas.

Portes (2005) também verificou que a atividade da 1-FEH detectada em plantas de *V. herbacea* submetidas à excisão dos ramos aéreos e armazenadas durante 20 dias sob baixa temperatura, foi mais elevada do que em plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos e sugeriu um efeito sinérgico da excisão dos ramos aéreos e do frio sobre a atividade dessa enzima e/ou a ocorrência de um mecanismo de regulação diferente por esses dois fatores de estresse, frio e desfolhação.

O frio promoveu, ainda, o aumento da atividade de invertase (figura 13) aos sete dias, que antecedeu o aumento de atividade de 1-FEH.

Asega & Carvalho (2004) analisaram a atividade de enzimas FEH e invertase em rizóforos de plantas de *V. herbacea* induzidas à brotação e também verificaram que o pico de atividade da invertase antecedeu o pico de atividade de FEH nestas plantas.

Entretanto, no presente experimento esta relação foi verificada apenas em plantas Induzidas/5 °C. A alta atividade de invertase verificada ao final do período analisado nos dois tratamentos pode estar relacionada ao fato dos órgãos aéreos já estarem desenvolvidos, portanto fotossintetizando e transportando sacarose para o rizóforo.

Como sugerido por Asega & Carvalho (2004), o papel das invertases no processo de mobilização de carboidratos durante a brotação e início do crescimento em *V. herbacea* parece estar relacionado ao uso da sacarose que antecede o uso de frutanos, uma vez que os níveis baixos de sacarose representam uma condição vacuolar ideal para a atividade de FEHs (Edelman & Jefford 1964, Claessens *et al.* 1990).

Os menores conteúdos de polissacarídeos encontrados aos 17 dias em plantas Induzidas (figura 14) ocorreram concomitantemente à alta atividade de FEH (figura 11a). Em plantas Induzidas/5°C o menor conteúdo de polissacarídeo e uma alta concentração de açúcar redutor foram detectados aos 20 dias, quando a atividade de 1-FEH já se encontrava alta. Estes resultados sugerem que no processo de rebrota após a excisão dos ramos aéreos, os polissacarídeos são preferencialmente mobilizados pela enzima FEH para fornecer energia para o restabelecimento da planta.

Foi observado também que aos 17 dias, plantas Induzidas apresentaram conteúdo de açúcar redutor semelhante ao de plantas Induzidas/5 °C (figura 15), porém o conteúdo de fruto-oligossacarídeos foi maior em plantas Induzidas/5 °C. Este resultado sugere que em plantas Induzidas/ 5°C, a 1-FEH atuou inicialmente na diminuição das cadeias de polissacarídeos, contribuindo para a manutenção dos níveis de oligossacarídeos (figura 14) e para a diminuição da razão polissacarídeos:oligossacarídeos (figura16).

Os resultados relativos ao conteúdo e à composição dos frutanos em rizóforos de plantas de *V. herbacea* demonstram claramente que o armazenamento no frio promoveu o acúmulo de frutanos com menor grau de polimerização em plantas induzidas à brotação. Estes resultados parecem estar associados ao aumento de tolerância a baixas temperaturas e são consistentes com a hipótese de os frutanos, por serem compostos altamente solúveis, promoverem o ajuste osmótico em situações ambientais adversas pela variação no grau de polimerização das moléculas (Pontis & Del Campillo 1985, Pilon-Smits *et al.* 1995).

Portes (2005) sugeriu que a maior proporção de oligossacarídeos encontrada em plantas de *V. herbacea*, submetidas à excisão dos ramos aéreos e à exposição ao frio esteja relacionada com o envolvimento destes compostos na estabilização de complexos

protéicos e membranas celulares em situações de estresse. A capacidade de interação dos frutanos com as membranas celulares reduz a temperatura da fase de transição dos lipídeos de líquido-cristalina para gel, conferindo a esses carboidratos um papel importante na proteção das plantas ao frio e à seca (Crowe *et al.* 1996, Hinch *et al.* 2000).

O aumento na atividade da FEH nos órgãos subterrâneos de reserva durante o processo de brotação induzido pela excisão dos ramos aéreos foi detectado anteriormente em outras Asteraceae. Fukai *et al.* (1997) detectaram um aumento significativo na atividade da FEH nos órgãos subterrâneos de reserva de *P. sonchifolia* durante a rebrota de novos ramos que sucedeu a perda da parte aérea por ação de fortes ventos sobre a plantação. De Roover *et al.* (1999) que também detectaram aumento da atividade da FEH em plantas jovens de *C. intybus* após a desfolhação, sugeriram que esta enzima pode também ser considerada uma enzima de “sobrevivência” que pode ser induzida em outras fases fenológicas além da fase de brotação quando a demanda energética da planta aumenta.

Vários autores observaram não apenas o aumento da atividade da FEH após a desfolhação, mas também mudanças nas concentrações de frutanos, como as verificadas em plantas de *V. herbacea*. Em *L. perenne*, nos restolhos de folhas, os frutanos de alto grau de polimerização foram hidrolisados completamente nas primeiras seis horas após a excisão foliar (Pavis *et al.* 1998) ou durante os dois dias de rebrota (Morvan-Bertrand *et al.* 1999, Pavis *et al.* 2001). Em raízes de *C. intybus*, De Roover *et al.* (1999) verificaram uma rápida diminuição nas concentrações de hexoses, sacarose e frutano total nas primeiras 24 horas após a desfolhação, e em *D. glomerata* foi observada uma diminuição nas concentrações de sacarose e glucose nos restolhos dos caules (Yamamoto & Mino 1987), demonstrando claramente que o processo de mobilização de frutanos pela FEH está associado à retirada das folhas nessas plantas.

A indução da atividade da FEH após a desfolhação, em restolhos de folhas de *L. perenne*, foi relacionada com a biossíntese de giberelinas. Morvan *et al.* (1997) sugeriram esta relação, uma vez que a indução foi suprimida após a aplicação de uniconazol, inibidor da biossíntese de giberelinas. Entretanto, mais recentemente Morvan-Bertrand *et al.* (2001) mostraram que os níveis deste hormônio diminuíram simultaneamente ao aumento da atividade da FEH após a desfolhação. Desta forma, estes autores acreditam ser improvável que o GA₁ esteja positivamente envolvido no controle da atividade da FEH durante a rebrota. Logo, o efeito do uniconazol

previamente observado na atividade da FEH poderia ser mediado por mudanças em outros reguladores de crescimento, não em GA₁, uma vez que o uniconazol não é um inibidor específico para biossíntese de GA₁.

Os efetores endógenos e exógenos para a indução dos genes envolvidos no metabolismo de frutanos ainda são desconhecidos. Acredita-se que açúcares, fitormônios e diferentes tipos de estresses regulam estes genes nas plantas (Van den Ende *et al.* 2002). Dentre os fatores de estresse capazes de induzir os genes ligados à biossíntese de frutanos encontram-se o estresse nutricional causado por deficiência de nitrogênio (Wang *et al.* 2000), baixa temperatura, desfolhação seguida de exposição à luz contínua (Wei *et al.* 2001) em folhas de *Hordeum vulgare* L., e estresse hídrico em folhas e raízes de *C. intybus* (De Roover *et al.* 2004). Teores elevados de sacarose, glucose e frutose também induzem os genes ligados à biossíntese de frutanos em *H. vulgare* (Muller *et al.* 2000, Koroleva *et al.* 2001, Wei *et al.* 2001).

Até recentemente, apenas a regulação dos genes relacionados à biossíntese de frutanos havia sido estudada (Müller *et al.* 2000, Nagaraj *et al.* 2001, Noel *et al.* 2001) e apenas quatro seqüências promotoras haviam sido descritas Hv6-SFT, Fa-1SST, LpFt1 e Lp1-SST (Nagaraj *et al.* 2001, Lidgett *et al.* 2003, Chalmers *et al.* 2003, Nagaraj *et al.* 2003). O trabalho realizado por Michiels *et al.* (2004) foi pioneiro no estudo da regulação das FEHs, apresentando a única região promotora de FEH descrita até o momento. Estes autores descreveram a região promotora da 1-FEH IIa de *C. intybus* e identificaram motivos para resposta à auxina, ácido abscísico, frio, etileno, giberelina e ácido salicílico. Além disso, foram identificados também motivos essenciais para expressão relacionada à falta de açúcar tais como os elementos GARE, GC Box, G box, TATCCA e elemento SURE (resposta à sacarose), além de um possível elemento Evening, dois adjacentes elementos CIRC, necessários para o controle circadiano da expressão do gene, e de dois adjacentes REalpha que atuam na regulação do fitocromo.

A análise da expressão das FEHs em *C. intybus* também revelou um forte sinal de hibridização da 1-FEH IIa e da 1-FEH I em raízes de plantas desfoliadas e de raízes de plantas desfoliadas e armazenadas por uma semana sob baixa temperatura (Van den Ende *et al.* 2001). Verificou-se ainda que somente a 1-FEH IIa foi expressa em plantas jovens desfoliadas, não sendo detectado sinal da 1-FEH I nestas plantas. Os autores concluíram que a 1-FEH I e a 1-FEH IIa são expressas sob diferentes condições, que as duas são reguladas de maneiras diferentes e que a 1-FEH IIa poderia ser considerada

uma enzima de sobrevivência, induzida quando há um aumento de demanda energética da planta. Posteriormente, o gene da 1-FEHIIa de *C. intybus* foi altamente expresso quando as plantas foram submetidas à baixas temperaturas (Michiels *et al.* 2004) sendo discutido por estes autores que a indução da 1-FEH IIa pelo frio resulta em um aumento de frutanos de cadeias curtas ou aumento da concentração de frutose no apoplasto, responsável pela preservação das membranas celulares das plantas durante o estresse pelo congelamento, conforme já reportado por Demel *et al.* (1998) e Hinch *et al.* (2002).

O nível de transcrito de 1-FEH em *V. herbacea* foi, em geral, consistente com a atividade de 1-FEH e com a composição de frutanos, tanto na brotação natural quanto na induzida, o que sugere para as FEHs de *V. herbacea* uma regulação em nível de transcrição, assim como foi sugerido para outros genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos (Wang *et al.* 2000, Koroleva *et al.* 2001, Chalmers *et al.* 2005). Considerando a regulação dos genes em nível de transcrição, o estudo das regiões promotoras destes genes constitui uma ferramenta importante para a compreensão da regulação do metabolismo de frutanos (Chalmers *et al.* 2005).

Aplicando-se o conhecimento da região promotora da 1-FEH IIa de *C. intybus*, para a fisiologia da planta em estudo, pode-se perguntar quais os elementos que promoveriam a indução desta enzima em *V. herbacea*. A percepção do comprimento relativo da noite, da temperatura e da disponibilidade de água das plantas durante a primavera no cerrado promoveria a síntese da 1-FEH na fase de brotação natural? Os baixos níveis de fotoassimilados e o balanço hormonal decorrentes da excisão dos ramos aéreos, somados à indução pelo frio, seriam responsáveis pela síntese da outra 1-FEH durante a brotação induzida?

A distinção das isoformas de 1-FEH presentes nos processos de brotação, natural e induzida, além daquela expressa sob o efeito do frio em plantas induzidas à brotação, poderá ser efetuada posteriormente utilizando as distintas seqüências de cDNAs apresentadas no capítulo III, 1-FEH Induzida/5°C e 1-FEH Natural, para a realização da análise de expressão gênica por *Northern blotting* e para a análise quantitativa de transcritos por PCR.

Baseando-se na hipótese da ocorrência de isoformas de FEH durante o processo de brotação em *V. herbacea*, apresentada nos capítulos II e III, e nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se sugerir que na fase de brotação natural ocorre a síntese *de novo* de 1-FEH e que esta enzima hidrolisa fruto-oligo e -polissacarídeos

indistintamente enquanto que em plantas induzidas à brotação, ocorre a indução de outra 1-FEH com expressão e atividade intensificadas pelo frio, sem que ocorra alteração no conteúdo total de proteínas. Esta última parece hidrolisar preferencialmente os fruto-polissacarídeos, para fornecer a energia necessária para o restabelecimento dos ramos aéreos em plantas Induzidas e para a manutenção dos níveis de fruto-oligossacarídeos detectados em plantas Induzidas/5 °C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asega, A.F.** (2003). Enzimas do metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 98p.
- Asega, A.F. & Carvalho, M.A.M.** (2004). Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 313-319.
- Bialeski, R.** (1993). Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower. *Plant Physiology* 103: 213-219.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.** (1993). Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C.** (1997). Growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizopheres. *New Phytologist* 136: 153-161.
- Claessens, G., Van Laere, A. & De Proft, M.** (1990). Purification and properties of an inulase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology* 136: 35-39.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Nguyen, K. H.N. & Crowe, L.M.** (1996). Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids? *Biochimica et Biophysica Acta* 1280: 187-196.
- Degasperi, M.I., Itaya, N.M., Buckeridge, M.S., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (2003). Fructan degradation and hydrolitic activity in tuberous roots of *Viguiera discolor* (Baker) (Asteraceae), a herbaceous species from the cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 11-21.
- Demel, R.A., Dorrepaal, E., Ebskamp, M.J.M., Smeekens, J.C.M & de Kruijff, B.** (1998). Fructans interact strongly with model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1375: 36-42.

- De Roover, J.D., Van Laere, A. & Van den Ende, W.** (1999). Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 106: 158-163.
- De Roover, J.D., Vandenbranden, K., Van Laere, A. & Van den Ende, W.** (2004). Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 210: 808-814
- Edelman, J. & Jefford, T. G.** (1964) The mechanism of fructose polymers in plants. 4. β -fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Biochemical Journal* 93: 148-161.
- Edelman, J. & Jefford, T. G.** (1968) The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* 67: 517-531.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Dietrich, S.M.C., Chu, E.P., Carvalho, M.A.M., Vieira, C.C.J., & Graziano, T.T.** (1986). Reserve carbohydrate in underground organs of native Brazilian plants. *Revista Brasileira de Botânica* 9: 159-166.
- Frehner, M., Keller, F. & Wiemken, A.** (1984). Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal of Plant Physiology* 116: 197 - 208.
- Fukai, K., Ohno, S., Goto, K., Nanjo, F. & Hara, Y.** (1997). Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science Plant Nutrition* 43: 171-177.
- Hendry, G. A. F.** (1993). Evolutionary origins and natural fractions of fructans: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* 123: 3-14.
- Hendry, G.A.F. & Wallace, R.K.** (1993). The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In M. Suzuki & N.J.Chatterton (eds.). *Science and Technology of Fructans*, CRC Press, Boca Raton, pp. 119-139.
- Hincha, D.K., Hellwege, E.M., Heyer, A.G. & Crowe, J.H** (2000). Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *European Journal of Biochemistry* 267: 535-540.
- Hincha, D.K., Zuther, E., Hellwege, E.M. & Heyer, A.G.** (2002). Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* 12: 103-110.

- Isejima, E.M., and Figueiredo-Ribeiro, R.C.** (1993). Fructan variations in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae): the influence of phenology. *Plant and Cell Physiology* 34: 723-727.
- Jermyn, M.A.** (1956). A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature* 177: 38-39.
- Koops, A.J. & Jonker, H.H.** (1996). Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia.
II. 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* 110: 1167-1175.
- Koroleva, O.A., Tomos, A.D., Farrar, J.F., Gallagher, J. & Pollock, C.J.** (2001). Carbon allocation and sugar status in individual cells of barley leaves affects expression of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase gene. *Annals of Applied Biology* 138: 27-32.
- Livingston, D.P. & Henson, C.A.** (1998). Apoplastic sugars, fructans, fructan exohidrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiology* 116: 403-408.
- Lüscher, M., Erdin, C., Sprenger, N., Hochstrasser, U., Boller, T. & Winkler, A.** (1996). Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferases from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Letters* 385: 39-42.
- Marx, S.P., Nösberger, J. & Frehner, M.** (1997a). 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* 135: 267-277.
- Marx, S.P., Nösberger, J. & Frehner, M.** (1997b). Hydrolyses of fructan in grasses: a β (2,6) linkage specific fructan - β - fructosidase from stubble of *Lolium perenne*. *New Phytologist* 135: 279 - 290.
- Michiels, A., Van Laere, A., Van Den Ende, W. & Tucker, M.** (2004). Expression analysis of a chicory fructan 1-exohidrolase gene reveals complex regulation by cold. *Journal of Experimental Botany* 55 (401) 1325-1333.
- Morvan, A., Challe, G., Prud`Homme, M.P., Le Saos, J. & Boucad, J.** (1997). Rise of fructan exohidrolase activity in stubble of *Lolium perenne* after defoliation is

decreased by uniconazole, an inhibitor of the biosynthesis of gibberellins. *New Phytologist* 136: 81-88.

- Morvan-Bertrand, A., Ernstsén, A., Lindgård, B., Koshioka, M., Le Saos, J., Boucaud, J., Prud'homme, M.P. & Junttila, O.** (2001). Endogenous gibberellins in *Lolium perenne* and influence of defoliation on their contents in elongating leaf bases and in leaf sheaths. *Physiologia Plantarum* 111: 225-231.
- Morvan-Bertrand, A., Pavis, N., Boucaud, J. & Prud'homme, M.P.** (1999). Partitioning of reserve and newly assimilated carbon in roots and leaf tissues of *Lolium perenne* during regrowth after defoliation: assessment by ¹³C steady-state labelling and carbohydrate analysis. *Plant Cell and Environment* 22: 1097-1108.
- Muller, J., Aeschbacher, R.A., Sprenger, N., Boller, T. & Wiemken, A.** (2000). Disaccharide-mediated regulation of sucrose: fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiology* 123: 265-274.
- Nagamatsu, Y., Yahata, M. & Hatanaka, C.** (1991). Fructan mobilization and the involvement of two β -fructofuranosidases in *Lycoris radiata* sprouting. *Agricultural and Biological Chemistry* 55: 3091-3095.
- Nagaraj, V.J., Riedl, R., Boller, T. Wiemken, A. & Meyer, A.D.** (2001). Light and sugar regulation of the barley sucrose: fructan 6-fructosyltransferase promoter. *Journal of Plant Physiology* 158: 1601-1607.
- Noel, G.M., Tognetti, J.A. & Pontis, H.G.** (2001). Protein kinase and phosphatase activities are involved in fructan synthesis initiation mediated by sugars. *Planta* 213: 640-646.
- Pavis, N., Boucad, J. & Prud'Homme, M.P.** (1998). Immediate effects of defoliation on fructan and fructan exohidrolase activity in *Lolium perenne* L. In A. Fuchs, A Van Laere (eds.). *Proceedings of Seventh Seminas on Inulin*, European Fructan Association. Denver, Belgium.
- Pavis, N., Chatterton, N.J., Harrison, P.A., Baumgartner, S., Praznik, W., Boucaud, J. & Prud'homme, M.P.** (2001). Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne*. *New Phytologist* 150: 83-95.
- Pollock, C. J., Cairns, A.J., Sims, I.M. & Housley, T.L.** (1996). Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. In E. Zamski and A.A. Shaffer (eds.). *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source - Sink Relationships*, A.A. Marcel Dekker Inc, New York, pp. 97-113.

- Pontis, H.G. & Del Campillo, E.** (1985). Fructans. In P.M. Dey & R.A. Dixon (eds.). Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants, Academic Press, New York, pp. 205-226.
- Portes, M.T.** (2005). Biossíntese e degradação de frutanos em diferentes regiões do rizóforo de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae). Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 112p.
- Portes, M.T. & Carvalho, M.A.M.** (2006). Spatial distribution of fructans and fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby in different developmental phases. Plant Science 170: 624-633.
- Pilon-Smits, E.A.H., Ebskamp, M.J.M., Paul, M.J., Jeuken, M.J.W., Weisbeek, P.J. & Smeekens, S.C.M.** (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. Plant Physiology 107: 125-130.
- Ribeiro Sobrinho, D.S., Buckeridge, M. S. & Carvalho, M.A.M.** (1996). Fructan hydrolase from rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell) Rusby and its role in fructan mobilization. In Third International Fructan Conference, Utah. Abstracts, Third International Fructan Conference, Utah, p 45.
- Rutherford, P.P & Deacon, A.C.** (1974). Seasonal variation in dandelion roots of fructosan composition, metabolism and response to treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Annals of Botany 38: 251-260.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Simpson, R.J. & Bonnett, G.D.** (1993). Fructan exohydrolase from grasses. New Phytologist 123: 453-469.
- Solhaug, K.A. & Aares, E.** (1994). Remobilization of fructans in *Phippisia algida* during rapid inflorescence development. Physiologia Plantarum 91: 219-225.
- Somogyi, M.** (1945). A new reagent for the determination of sugars. Journal of Biological Chemistry 160: 61-63.
- Tertuliano, M.F. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (1993). Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. New Phytologist 123: 741-749.

- Van den Ende, W. & Van Laere, A.** (1996). Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. *Journal of Plant Physiology* 149: 43-50.
- Van Den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J. & Van Laere, A.** (2002). Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World JOURNAL* 2: 1281-1295.
- Van den Ende, W., Michiels, A., Van Wouterghem, D., Clerens, S., De Roover, J. & Van Laere, A.** (2001). Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEH IIa e 1-FEH IIb). Mass fingerprint of the 1-FEH II enzymes. *Plant Physiology* 126: 1186-1195.
- Tertuliano, M.F. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** (1993). Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. *New Phytologist* 123: 741-749.
- Van den Ende, W. & Van Laere, A.** (1996). Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. *Journal of Plant Physiology* 149: 43-50.
- Van den Ende, W., Michiels, A., Van Wouterghem, D., Clerens, S., De Roover, J. & Van Laere, A.** (2001). Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEH IIa e 1-FEH IIb). Mass fingerprint of the 1-FEH II enzymes. *Plant Physiology* 126: 1186-1195.
- Vergauwen, R., Van Den Ende, W. & Van Laere, A.** (2000). The role of fructan in flowering of *Campanula rapunculoides*. *Journal of Experimental Botany* 51 (348): 1261-1266.
- Wang, C., Van Den Ende, W. & Tillberg, J.E.** (2000). Fructan accumulation induced by nitrogen deficiency in barley leaves correlates with the level of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase mRNA. *Planta* 211: 701-707.
- Wei, J.Z., Chatterton, N.J. & Larson, S.R.** (2001). Expression of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) and myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS) genes in barley (*Hordeum vulgare*) leaves. *Journal of Plant Physiology* 158: 635-643.

- Yamamoto, S. & Mino, Y.** (1985). Partial purification and properties of phleinandase induced in stem base of orchardgrass after defoliation. *Plant Physiology* 78: 591-595.

Considerações finais

O cerrado é o segundo maior bioma no território brasileiro estando atrás apenas da floresta amazônica (Coutinho 2002). A vegetação do cerrado apresenta crescimento sazonal e uma série de estratégias adaptativas para superar condições adversas como o fogo, a seca e o estresse nutricional característico deste bioma. Parte destas estratégias inclui a presença massiva de órgãos subterrâneos espessados em plantas herbáceas que atravessam períodos de acúmulo de fotoassimilados durante o seu ciclo de desenvolvimento (Mantovani & Martins 1988).

A maioria das espécies ricas em frutanos encontra-se fora da região tropical, sendo mais abundantes em áreas onde o crescimento é sazonal (Hendry & Wallace 1993). Entre as espécies de Asteraceae, família que representa aproximadamente 17% da flora de angiospermas de uma área restrita de cerrado do estado de São Paulo, destaca-se *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, pelo elevado conteúdo de frutanos em seus órgãos subterrâneos espessados, denominados rizóforos.

Em *Vernonia herbacea*, o crescimento sazonal foi bem descrito e associado com variações no conteúdo e composição de frutanos nos rizóforos (Carvalho & Dietrich 1993). A mobilização destes compostos ocorre por ação da enzima FEH, especialmente na fase de brotação da planta. Assim, o estudo desta enzima pode fornecer dados valiosos para a compreensão dos mecanismos fisiológicos e das estratégias adaptativas de plantas como *V. herbacea*, que garantem a sua sobrevivência nos períodos de condições ambientais adversas, como a seca e o frio.

Com a finalidade de compreender os mecanismos de regulação da mobilização de frutanos em *Vernonia herbacea*, foram realizados experimentos de purificação, clonagem e expressão da 1-FEH em plantas em fase de brotação natural, em plantas induzidas à brotação (Induzidas) e em plantas induzidas à brotação e submetidas à baixa temperatura (Induzidas/5 °C).

No primeiro capítulo foram abordados os resultados referentes à purificação das 1-FEHs de plantas em fase de brotação natural, que foram confrontados com os obtidos, anteriormente por Asega (2003), quando foram utilizadas plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos e submetidas à baixa temperatura. No presente trabalho foram evidenciadas as diferenças existentes entre as 1-FEHs de plantas em fase natural de brotação e de plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos e submetidas à baixa temperatura (Asega 2003). Estas diferenças foram demonstradas pelo comportamento das proteínas durante as etapas de purificação.

Os resultados indicaram que a mobilização de frutanos durante a brotação natural e a brotação induzida seguida de armazenamento à baixa temperatura, ocorre por um conjunto de isoformas de 1-FEHs para suprir a demanda energética da planta e manter as condições osmóticas das células.

Entretanto em nenhuma das condições acima descritas foi obtida a homogeneidade eletroforética necessária para o seqüenciamento da 1-FEH e subsequente análise da expressão gênica desta enzima. Assim, a clonagem dos genes que codificam as 1-FEHs foi uma estratégia experimental utilizada no presente trabalho para ampliar o conhecimento sobre esta enzima e sobre o seu papel na mobilização de frutanos em *V. herbacea*. A estratégia possibilitou o isolamento de dois cDNA distintos, referentes à 1-FEH Induzida/5°C e à 1-FEH Natural, obtidos de plantas em brotação induzida pela excisão dos ramos aéreos e submetidas à baixa temperatura e de plantas em brotação natural, respectivamente. Estes resultados reforçaram os obtidos no capítulo II de que no processo de brotação, a mobilização de frutanos ocorre por ação de isoformas de 1-FEH.

A análise funcional da seqüência de cDNA da 1-FEH Induzida/5°C constitui uma etapa importante para a confirmação da autenticidade da seqüência como codificadora de uma FEH. Esta seqüência foi eficientemente expressa em células de *Pichia pastoris* e a proteína recombinante demonstrou atividade exclusivamente de FEH, produzindo frutose livre quando incubada com inulina, e frutose e sacarose quando incubada com 1-cestose, sendo incapaz de hidrolisar a sacarose, não apresentando portanto, atividade de invertase. Este resultado é o primeiro relato de clonagem de uma FEH de espécie do cerrado.

Além da ocorrência de isoformas de 1-FEHs nos processos de brotação, natural e induzido foi analisada também a expressão gênica da 1-FEH em plantas em fase de brotação natural, em plantas Induzidas e em plantas Induzidas/5°C. A análise da expressão gênica da 1-FEH revelou que a região proximal do rizóforo é o tecido abundante em transcritos de 1-FEH tanto em plantas em fase de brotação natural, quanto em plantas Induzidas e em plantas Induzidas/ 5°C. O frio intensificou a indução da expressão de transcritos de 1-FEH. A abundância do transcrito na região proximal indica a alta expressão de FEH nesta região do rizóforo e demonstra o papel que esta enzima desempenha na mobilização de frutanos durante o restabelecimento dos ramos aéreos, originados principalmente das gemas localizadas na região proximal.

Os resultados relativos ao conteúdo e à composição dos frutanos nos rizóforos de plantas de *V. herbacea* demonstram claramente que as variações ocorrem também na região proximal, em plantas em fase de brotação natural e que o armazenamento no frio promoveu o acúmulo de frutanos com menor grau de polimerização em plantas induzidas à brotação. Estes resultados parecem estar associados ao aumento à tolerância a baixas temperaturas e são consistentes com a hipótese de os frutanos, por serem compostos altamente solúveis, promoverem o ajuste osmótico em situações ambientais adversas pela alteração no comprimento das moléculas (Pontis & Del Campillo 1985, Pilon-Smits *et al.* 1995).

Baseando-se na hipótese da ocorrência de isoformas de FEH durante o processo de brotação em *V. herbacea*, apresentada nos capítulos II e III, e nos resultados de mobilização de frutanos mostrados no capítulo IV, pode-se sugerir que na fase de brotação natural ocorre a síntese uma 1-FEH que hidrolisa fruto-oligo e -polissacarídeos indistintamente enquanto que em plantas induzidas à brotação, ocorre a indução de outra 1-FEH com expressão e atividade intensificadas pelo frio, sem que ocorra alteração no conteúdo total de proteínas. Esta 1-FEH parece hidrolisar preferencialmente os fruto-polissacarídeos, para fornecer a energia necessária para o restabelecimento dos ramos aéreos em plantas Induzidas e para a manutenção dos níveis de fruto-oligossacarídeos detectados em plantas Induzidas/5 °C.

O nível de transcrito de 1-FEH em *V. herbacea* consistente com a atividade de 1-FEH e com a composição de frutanos, tanto na brotação natural quanto na induzida sugere para as FEHs de *V. herbacea* uma regulação em nível de transcrição, como foi sugerido para outros genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos (Wang *et al.* 2000, Koroleva *et al.* 2001, Chalmers *et al.* 2005).

A clonagem do cDNA de 1-FEH Induzida/5°C e confirmação de que este codifica uma FEH verdadeira permitirá o uso do seu cDNA para o preparo de sondas, clonagem da região promotora do gene, além do uso da 1-FEH recombinante no estudo da cinética enzimática, na investigação de inibidores de sua atividade e preparo de anticorpos, permitindo o estudo da regulação do gene e da proteína e estudos de imunolocalização desta enzima. Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para a ampliação do conhecimento da atuação da FEH no processo de mobilização de frutanos durante a brotação ou em condições ambientais adversas, como o frio, que ocorre

durante o inverno em áreas do cerrado, onde *V. herbacea* é encontrada, e às quais as espécies acumuladoras de frutanos são adaptadas.

CONCLUSÕES

- A atividade e a expressão da 1-FEH de *Vernonia herbacea* são induzidas pela excisão dos ramos aéreos e são intensificadas pelo frio.
- Durante os processos de brotação, natural e induzida, em *Vernonia herbacea* ocorrem isoformas de 1-FEHs responsáveis pela mobilização de frutanos.
Funções inferidas:
 - *Suprir a demanda energética da planta*
 - *Manter os níveis de oligossacarídeos*
- O frio promove o acúmulo de fruto-oligossacarídeos em plantas excisadas, sugerindo o envolvimento destes açúcares na resistência à baixa temperatura.
- As variações no metabolismo de frutanos durante os processos de brotação ocorrem, especialmente, na região PROXIMAL do rizóforo.
- A regulação da 1-FEH de *Vernonia herbacea* ocorre em nível de transcrição.

RESUMO

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby é uma espécie nativa do cerrado que apresenta crescimento sazonal e órgãos subterrâneos denominados rizóforos, que acumulam altas concentrações de frutanos do tipo inulina. A enzima responsável pela despolimerização de frutanos é a 1-FEH. A atividade mais elevada desta enzima é detectada principalmente em rizóforos de plantas em brotação natural e de plantas induzidas à brotação pela excisão dos órgãos aéreos. Esta atividade de 1-FEH pode ser ainda intensificada pelo armazenamento no frio das plantas induzidas à brotação. O presente trabalho teve como objetivo estudar a mobilização de frutanos pela ação da FEH durante o processo de brotação. A metodologia utilizada para purificar esta enzima consistiu de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de afinidade em coluna ConA e cromatografia de troca iônica e resultou na separação de diversas frações com atividade de 1-FEH e no isolamento de uma invertase com massa molecular de 60 kDa estimada por SDS-PAGE. As frações obtidas de plantas em fase de brotação natural apresentaram um comportamento diferente em coluna de troca aniônica quando comparado com o das frações obtidas de plantas induzidas à brotação e armazenadas no frio, indicando a presença de diferentes isoformas de 1-FEH em ambas as preparações. Os resultados obtidos sugeriram que durante o processo de brotação, natural ou induzido, a mobilização de frutanos ocorre por um conjunto de proteínas com atividade hidrolítica que diferem na sua estrutura física e química. Durante este trabalho foram clonadas duas seqüências distintas de FEH obtidas de plantas em fase de brotação, 1-FEH Natural, e de plantas induzidas à brotação e armazenadas a 5°C, 1-FEH Induzida/5°C. As seqüências foram obtidas por PCR e iPCR, utilizando oligonucleotídeos degenerados e específicos, respectivamente. O seqüência parcial do cDNA da 1-FEH Natural apresentou alta identidade com invertase e com as FEHs de outras espécies, enquanto o cDNA da 1-FEH Induzida/5°C apresentou alta identidade somente com outras FEHs, peso molecular de 65,7 kDa e o pI de 5,32 e algumas modificações pós-traducionais. Este último cDNA foi eficientemente expresso em *Pichia pastoris* e a proteína recombinante apresentou atividade de 1-FEH. A atividade e a expressão gênica da FEH e o conteúdo e a composição de frutanos foram analisados em plantas em fase de brotação natural e em plantas induzidas à brotação (Induzidas). Foi avaliado também o efeito da baixa temperatura em plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Induzidas/5°C). A atividade da FEH, os conteúdos de proteína e frutanos foram

determinados por colorimetria, a composição dos frutanos por HPAEC/PAD e a análise da expressão gênica por *Northern blotting*. As variações no conteúdo e na composição de frutanos, na atividade e na expressão gênica de FEH foram detectadas mais significativamente na região proximal dos rizóforos de plantas em fase de brotação natural. A baixa temperatura promoveu o acúmulo de frutanos de baixo GP e intensificou a atividade e a expressão gênica da FEH em plantas induzidas à brotação. Os resultados sugerem que no processo de brotação natural ocorre uma 1-FEH que hidrolisa fruto-polissacarídeos e –oligossacarídeos indistintamente enquanto no processo de brotação induzida ocorre outra 1-FEH com atividade e expressão gênica intensificadas pelo frio que hidrolisa preferencialmente fruto-polissacarídeos para fornecer energia para o restabelecimento dos órgãos aéreos em plantas Induzidas e para a manutenção dos níveis de fruto-oligossacarídeos em plantas Induzidas/5 °C.

ABSTRACT

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby is a native species from the Brazilian cerrado presenting a seasonal growth pattern. Its underground organs, named rhizophores, accumulate high levels of inulin-type fructan. FEH is the enzyme responsible for fructan depolymerization. The highest FEH activity in rhizophores is detected mainly during sprouting and in plants induced to sprouting by defoliation. This FEH activity is also enhanced by cold storage of the induced plants. The aim of the present work was to study fructan mobilization by FEH during the sprouting process. The purification protocol used to purify FEH consisted of ammonium sulphate precipitation, ConA affinity chromatography and ion exchange chromatography allowed the separation of several fractions with FEH activity and one soluble invertase with molecular mass of 60 kDa estimated by SDS-PAGE. Fractions presenting FEH activity obtained from sprouting plants showed different behavior in anion exchange column when compared to fractions obtained from plants induced to sprouting by defoliation and cold storage, indicating differences in the isoforms of FEH from both preparations. Results suggest that during the sprouting process, either natural or induced by defoliation, fructan mobilization occurs by a set of proteins with hydrolytic activity that differs in their physical and chemical structures. Two distinct sequences of cDNAs FEH were obtained from plants in natural (1-FEH Natural) and induced (1-FEH Induced/5 °C) sprouting, by PCR and iPCR techniques, using degenerated and specific primers, respectively. The partial sequence 1-FEH Natural showed identity to invertases and FEH sequences of other species while the 1-FEH Induced/5°C complete sequence showed identity only to other FEH sequences. For the latter one, the predicted apparent molecular mass is 65,7 kDa and the pI predicted was 5,32 as well some post translational modifications. The cDNA of 1-FEH Induced/5°C was successfully expressed in *Pichia pastoris* and the recombinant enzyme was shown to be a functional 1-FEH. The activity and gene expression of 1-FEH, fructan contents and composition were analyzed in rhizophores of plants during natural and induced sprouting (Induced). The effect of low temperature in plants induced to sprouting (Induced/5°C) was also investigated. FEH activity, protein and fructan contents were determined by colorimetric analyzes, fructan composition was analyzed by HPAEC/PAD and gene expression by *Northern blotting*. Variations in fructan contents and composition, and in FEH activity and gene expression were markedly detected during sprouting in the

proximal region of the rhizophores, near the axillary buds that give rise to the new shoots. Low temperature promoted the accumulation of low DP fructans and enhanced FEH gene expression and activity. Results indicate the occurrence of one 1-FEH hydrolyzing both fructo-oligo and –polysaccharides, indistinctly, in naturally sprouting plants, and another 1-FEH with activity and expression enhanced by low temperature, that hydrolyzes preferably fructo-polysaccharides to supply energy for the reestablishment of the aerial organs in Induced plants and for the maintenance of the fructo-oligosaccharide levels in Induced/5°C plants.