

PAOLA MITIE APARECIDA GARCIA

**Variações no metabolismo de frutanos em
Vernonia herbacea (Vell.) Rusby (Asteraceae) em
resposta ao déficit hídrico e sua relação com a
tolerância à seca**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

**SÃO PAULO
2009**

PAOLA MITIE APARECIDA GARCIA

**Variações no metabolismo de frutanos em
Vernonia herbacea (Vell.) Rusby (Asteraceae) em
resposta ao déficit hídrico e sua relação com a
tolerância à seca**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

“Não sei... se a vida é curta...

Não sei...

Não sei...

Ou longa demais para nós.

Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,

Se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:

Colo que acolhe,

Braço que envolve,

Palavra que conforta,

Silêncio que respeita,

Alegria que contagia,

Olhar que sacia,

Amor que promove.

E isso não é coisa do outro mundo:

É o que dá sentido à vida.

É o que faz com que ela

Não seja curta,

Nem longa demais,

Mas que seja intensa,

Verdadeira e pura...

Enquanto durar.”

(Cora Coralina)

Aos meus pais Edison e Natália
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha família, pelo incentivo e paciência.

À Dra. Maria Angela Machado de Carvalho pela orientação, confiança, esforço e respeito dedicados.

Ao Dr. Emerson Alves da Silva pela colaboração e pelo apoio.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, especialmente à Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelas facilidades oferecidas

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.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e apoio financeiro aos projetos temáticos.

À Dra. Márcia Regina Braga, chefe da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas por permitir a realização do trabalho na seção.

À Dra Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro pelo incentivo e apoio.

Aos funcionários da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu.

Aos funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica, em especial à Mary pelo apoio e ótima convivência no laboratório.

Ao Dr. Cláudio José Barbedo por permitir a utilização do psicrômetro da Seção de Sementes e Melhoramento Vegetal do Instituto de Botânica.

Ao Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro por permitir a utilização do psicrômetro no Instituto Agrônômico (IAC) e aos alunos Daniela e Ricardo pelo auxílio.

Ao Prof. Dr. Norio Shiomi, da Universidade Rakuno Gakuen (Hokkaido, Japão), pela doação dos padrões de 1-cestose e nistose.

Ao Leandro, pela compreensão, carinho e amor.

Aos colegas e amigos da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Amanda Asega, Amanda de Souza, Anderson, César, Cynthia, Cristiane, Denise, Fábio, Fernanda K., Fernanda M., João P. Naldi, Janaína, João, Juliana Iura, Kelly, Ludmila, Marcelino, Marina, Marlize,

Michelle, Monaly, Nair, Raíssa, Roberta, Rodrigo Cabral, Rodrigo Caccere, Tatiana, Vanessa Costa e Vanessa de Oliveira pelos momentos de alegria e pela agradável convivência e apoio.

Aos amigos que não são do Botânico, mas, de alguma forma, me apoiaram e incentivaram sempre.

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

SUMÁRIO

PREFÁCIO	IX
INTRODUÇÃO GERAL	
Frutanos: ocorrência e distribuição.....	1
Metabolismo de frutanos	2
Utilização de frutanos	4
Cerrado	5
Déficit Hídrico.....	6
Solutos orgânicos.....	6
Frutanos e o déficit hídrico	8
<i>Vernonia herbacea</i>	11
Referências Bibliográficas.....	14
CAPÍTULO I. Efeito do déficit hídrico em plantas submetidas à suspensão de regas I	
Resumo	23
Abstract.....	24
Introdução	25
Material e Métodos.....	28
Material vegetal e condições de cultivo	28
Tratamentos e amostragem.....	28
Umidade do solo (U_{solo}) e potencial hídrico do solo ($\Psi_{\text{w solo}}$).....	28
Conteúdo de água (%)	29
Potencial hídrico das folhas (Ψ_{w})	29
Extração enzimática.....	30
Ensaio enzimático.....	30
Análise das atividades enzimáticas.....	30
Extração de carboidratos solúveis	31
Análise quantitativa e qualitativa dos frutanos.....	32
Resultados.....	33
Discussão	44
Referências Bibliográficas.....	48

CAPÍTULO II Efeito do déficit hídrico em plantas submetidas à suspensão de regas II

Resumo	54
Abstract.....	55
Introdução.....	56
Material e Métodos	59
Material vegetal e condições de cultivo	59
Tratamento e amostragem	59
Umidade do solo (U_{solo}) e potencial hídrico do solo ($\Psi_{\text{w solo}}$).....	59
Conteúdo de água (%)	60
Potencial hídrico da parte aérea (Ψ_{wpa}) e do rizóforo (Ψ_{wrz}).....	60
Taxas de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E)	61
Dosagem de prolina livre.....	61
Extração enzimática.....	61
Ensaio Enzimático	62
Análise das Atividades Enzimáticas.....	62
Extração de carboidratos solúveis	63
Análise quantitativa e qualitativa dos frutanos.....	63
Análises estatísticas	64
Resultados.....	65
Discussão	80
Referências Bibliográficas.....	85

CAPÍTULO III. Efeito do déficit hídrico em plantas submetidas a diferentes regimes de rega

Resumo	91
Abstract.....	92
Introdução.....	93
Material e Métodos	97
Material vegetal e condições de cultivo	97
Tratamento e amostragem	97
Umidade do solo (U_{solo}) e potencial hídrico do solo ($\Psi_{\text{w solo}}$).....	97

Conteúdo de água (%)	98
Potencial hídrico da parte aérea (Ψ_{wpa}) e do rizóforo (Ψ_{wrz})	98
Taxas de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E)	99
Dosagem de prolina livre.....	99
Extração enzimática.....	99
Ensaio Enzimático	100
Análise das Atividades Enzimáticas.....	100
Extração de carboidratos solúveis	101
Análise quantitativa e qualitativa dos frutanos.....	101
Resultados.....	103
Discussão	115
Referências Bibliográficas.....	119
CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
Resumo	129
Abstract.....	130

PREFÁCIO

No presente trabalho é abordada a influência do déficit hídrico no metabolismo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, uma espécie herbácea de Asteraceae nativa do cerrado, e os resultados são distribuídos em três capítulos.

No capítulo I são abordadas as alterações no metabolismo de frutanos decorrentes da imposição de déficit hídrico pela suspensão total de rega.

O capítulo II também trata da imposição de déficit hídrico pela suspensão total de regas, porém analisou-se um número maior de parâmetros fisiológicos do que no experimento descrito no capítulo I.

O capítulo III traz os resultados obtidos pela aplicação de diferentes regimes de rega.

O trabalho compara duas formas diferentes de aplicação de déficit hídrico em plantas, a suspensão total da rega e o regime de regas, que permitiram a avaliação gradual das respostas da planta sob diferentes intensidades de deficiência hídrica. Além disso, fornece informações que ampliam o conhecimento sobre o metabolismo de frutanos em uma espécie nativa do cerrado e contribuem para o entendimento do papel desses carboidratos de reserva na adaptação dessas plantas ao cerrado.

INTRODUÇÃO GERAL

Frutanos: ocorrência e distribuição

A maioria das plantas acumula amido ou sacarose como carboidrato de reserva, mas aproximadamente 15% das angiospermas armazenam frutanos. Dentre estas, encontram-se muitas espécies de importância econômica e de famílias altamente evoluídas como Asteraceae e Poaceae. Como exemplo, podemos citar os cereais (cevada, trigo, aveia), algumas verduras (endívia/chicória, cebola, alho, alface), plantas ornamentais (dália, tulipa) e gramíneas forrageiras (*Lolium sp.*, *Phleum sp.*) (Hendry & Wallace 1993).

Em Asteraceae, a presença de frutanos foi amplamente documentada para a flora de regiões temperadas (Pollard & Amuti 1981) e em região restrita do cerrado brasileiro para a flora tropical e subtropical (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993). Levantamentos florísticos realizados no cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, SP (22° 18' S, 47° 11' W) mostraram a predominância de espécies de Asteraceae no estrato herbáceo, correspondendo a 17% das espécies encontradas na região (Mantovani 1983). A detecção de carboidratos e proteínas nos órgãos subterrâneos espessados de plantas nativas dessa área do cerrado e da mata do estado de São Paulo apontou plantas com potencial para exploração econômica e para estudos fisiológicos e metabólicos dos compostos de reserva em órgãos subterrâneos (Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1986). Segundo Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro (1993), aproximadamente 60% das espécies herbáceas presentes nesta área restrita de cerrado acumulam frutanos do tipo inulina como carboidrato de reserva em seus órgãos subterrâneos.

Os frutanos consistem de séries homólogas de oligo e polissacarídeos não redutores, nas quais cada membro da série contém um resíduo de frutose a mais que o membro anterior (Edelman & Jefford 1968). Os diferentes tipos de frutanos são identificados conforme a ligação glicosídica entre as unidades de frutose. O frutano mais simples é um monofrutosil sacarose, um trissacarídeo. São conhecidos três isômeros desse trissacarídeo, que diferem entre si pela ligação da frutose a um dos grupos hidroxila da sacarose. A 1-cestose (1-F-frutosil sacarose, α -glu-1,2- β -fru-1,2-fru), foi o primeiro isômero a ser caracterizado e é encontrada em todas as espécies que acumulam frutanos; a 6-cestose (6-F-frutosil sacarose, α -glu-1,2- β -fru-6,2-fru) apresenta o resíduo terminal de frutose ligado ao carbono 6 da frutose e a neocestose (6-G-frutosil sacarose, β -fru-2,6- α -glu-1,2-fru) apresenta as duas unidades de frutose ligadas à glucose. Assim, a 1-cestose e a 6-cestose possuem uma glucose e uma frutose terminais, enquanto a neocestose apresenta a glucose interna (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:

- a) inulina, uma molécula tipicamente linear encontrada especialmente em Asteraceae, que contém ligações do tipo $\beta(2,1)$ e é baseada no trissacarídeo 1-cestose;
- b) levano ou fleano, que também é uma molécula linear, encontrado principalmente em Poaceae, contém ligações do tipo $\beta(2,6)$ 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 ou neosérie da inulina, com ligações $\beta(2,1)$ entre as unidades de frutose, encontrado em Liliaceae e alguns membros de Poaceae;
- e) frutanos baseados em neocestose ou neosérie do levano, com ligações $\beta(2,6)$ entre as unidades de frutose, presente em alguns membros de Poaceae.

Uma série de frutanos que não contém a unidade de glucose terminal, denominada *inulono-ose*, foi encontrada em algumas fases de desenvolvimento de espécies de Asteraceae (Carvalho *et al.* 1997).

A complexidade estrutural dos frutanos varia, portanto, de acordo com a ligação glicosídica entre as unidades de frutose, a ramificação e o comprimento das cadeias, e a posição da molécula de sacarose na cadeia. A razão da variedade estrutural dos frutanos em plantas é desconhecida. Ela pode basear-se nas diferentes necessidades fisiológicas ou ser uma consequência das diferentes origens evolucionárias da biossíntese de frutanos em diferentes famílias (Ritsema & Smeekens 2003b).

Nas células, os frutanos são acumulados na forma solúvel em vacúolos (Frehner *et al.* 1984) e encontrados principalmente em órgãos subterrâneos de reserva, como raízes tuberosas, rizóforos, tubérculos e bulbos, assim como em órgãos fotossintetizantes, como folhas e caules e em inflorescências e sementes (Ritsema & Smeekens 2003a). Porém, vários trabalhos demonstraram que esses compostos também podem ser encontrados no apoplasto, assim como nos tecidos vasculares (Vieira & Figueiredo-Ribeiro 1993, Livingston & Henson 1998, Wang & Nobel 1998, Ernst & Pfenning 2000, Van den Ende *et al.* 2005).

Metabolismo de frutanos

As espécies acumuladoras de frutanos são mais proeminentes em ambientes sujeitos a estresses abióticos como o frio e a seca (Hendry 1993). A capacidade de sintetizar frutanos surgiu

do desenvolvimento de frutossiltransferases a partir de invertases vacuolares (Ritsema *et al.* 2006). Acredita-se que o baixo conteúdo de água e a alta concentração de sacarose nas células ocasionados pela desidratação (ou pela baixa disponibilidade de água no ambiente) possibilitou às invertases vacuolares desenvolverem a capacidade de usar sacarose ao invés de água como acceptor de substrato, ocorrendo transglicosilação entre duas moléculas de sacarose (Valluru & Van den Ende 2008).

Segundo modelo clássico proposto por Edelman & Jefford (1968) para tubérculos de *Helianthus tuberosus* L., os frutanos são sintetizados pela ação de duas frutossiltransferases. A sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99), que catalisa irreversivelmente a formação da 1-cestose a partir de duas moléculas de sacarose, liberando uma molécula de glucose que, após fosforilação, é novamente utilizada na síntese de sacarose. Essa enzima apresenta alta especificidade pela sacarose. A outra frutossiltransferase envolvida é a frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100), responsável pelo alongamento da cadeia, catalisando a transferência reversível de unidades terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora. Nesta reação, a menor molécula receptora é a sacarose que nunca pode ser doadora. Como a reação é reversível, essa enzima também atua na redistribuição das unidades de frutose, podendo promover também a diminuição do comprimento das cadeias. Esse modelo é aceito atualmente, tendo sido confirmado por estudos de Koops & Jonker (1996) em *H. tuberosus* e por Van den Ende & Van Laere (1996) em *Cichorium intybus* L.

O perfil de frutanos encontrado em diferentes grupos de plantas reflete a diversidade estrutural destes carboidratos e resulta da ação de múltiplas enzimas. A ampla variação de estruturas e graus de polimerização encontrados entre os diferentes grupos de plantas que contém frutanos é atribuída, principalmente, a diferenças nas propriedades de suas frutossiltransferases. Diferenças na afinidade da 1-FFT pelo substrato doador e receptor resultam em um padrão diferente de polímeros de inulina (Hellwege *et al.* 2000, Vergauwen *et al.* 2003).

A despolimerização das moléculas de frutanos é catalisada por uma frutano-exohidrolase (1-FEH, EC 3.2.1.153) e ocorre pela remoção seqüencial das unidades terminais de frutose. Os produtos finais da FEH são a frutose e a sacarose, sendo a enzima fortemente inibida por esse dissacarídeo (Edelman & Jefford 1968, Van den Ende *et al.* 2002). Uma vez que a sacarose é o dissacarídeo que dá origem aos frutanos, no estudo do metabolismo destes carboidratos deve-se considerar a ação da enzima invertase (E.C. 3.2.1.26), que hidrolisa a sacarose e libera glucose e frutose.

Para a biossíntese das outras séries de frutanos, outras frutossiltransferases estão envolvidas: a sacarose:frutano 6-frutossiltransfase (6-SFT) é a enzima responsável pelas ligações $\beta(2,6)$ nos frutanos tipo levano e levano 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). A frutano: frutano 6^G 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 $\beta(2,1)$ ou $\beta(2,6)$, produzindo frutanos da neosérie de inulina ou da neosérie de levano, respectivamente. Além da 1-FEH, a degradação de frutanos ocorre pela ação da 6-frutano exohidrolase (6-FEH, EC 3.2.1.154) que atua sobre ligações $\beta(2,6)$.

Além do seu papel na degradação de frutanos 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.

Utilização de frutanos

A inulina é reconhecida como um composto benéfico à saúde. É adicionada a vários alimentos como adoçante não calórico quando na forma de fruto-oligossacarídeos (FOS) ou frutose destes derivada, como fibra dietética solúvel e como substituinte de gorduras (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro 2001, Carvalho *et al.* 2007). Os FOS são compostos bifidogênicos, cujos produtos de fermentação são efetivos na redução da pressão sanguínea, da glicemia e das taxas de triglicérides e colesterol (Roberfroid 1993, Yamasaki & Matsumoto 1993). Além disso, os FOS apresentam ação anti-tumoral (Taper *et al.* 1999) e estimulam a absorção de cálcio, magnésio e ferro no intestino (Roberfroid *et al.* 1995).

Na indústria farmacêutica, a inulina também é utilizada em testes de função renal para a determinação do ritmo de filtração glomerular (Aires 1991). Atualmente, a inulina disponível para utilização industrial é produzida na Europa, principalmente a partir de raízes tuberosas de *Cichorium intybus* (Asteraceae). Na última década, a produção industrial de inulina aumentou de

1000 para 100 000 toneladas anuais (Van den Ende *et al.* 2002). Entretanto, a necessidade de importação e o custo elevado invalidam o uso rotineiro desta inulina no país.

Cerrado

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupa cerca de 21% do território, estando atrás apenas da floresta amazônica.

Caracteriza-se por apresentar uma vegetação peculiar com fisionomias que variam em uma ordem crescente de biomassa como, campo limpo, campo sujo, campo cerrado, cerrado (*sensu strictu*) e cerradão (Coutinho 1978). Podemos descrever essa vegetação como constituída por dois grupos essencialmente opostos, o das árvores permanentes, que reúne todas as árvores e arbustos, e o das efêmeras que compreende inúmeras plantas herbáceas. Climaticamente caracteriza-se por sua sazonalidade bem definida e regime de água que inclui verão úmido e inverno seco (Eiten 1972, Coutinho 2002).

Os solos do cerrado em geral são profundos, porosos, permeáveis, oferecendo ao sistema radicular das plantas um meio de fácil penetração. Consistem de uma mistura de areia e argila, em proporções diferentes, com baixa retenção de água, baixa capacidade de troca catiônica e pobre em nutrientes. Os solos são ácidos, com pH variando entre 4 e 5. Comparando-se o gradiente fisionômico no sentido cerradão ao campo sujo, observamos um aumento da carência de nutrientes e da acidez (Godoy & Felipe 1992). Estas condições contribuem para a formação de uma vegetação xeromórfica e rica (Eiten 1972).

Na vegetação do cerrado, uma das estratégias empregadas para superar os extremos de temperatura, a seca e o estresse nutricional é 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). 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). Outra estratégia é a síntese de compostos protetores, que podem atuar na estabilização de membranas e proteínas ou promover o ajuste osmótico (Valliyodan & Nguyen 2006).

Déficit Hídrico

A distribuição dos vegetais na superfície terrestre é basicamente controlada por dois fatores abióticos, a temperatura do ar e a disponibilidade de água. Desde que a temperatura do ar permita que as plantas se desenvolvam, a quantidade e a distribuição de chuvas torna-se o principal fator limitante ao desenvolvimento vegetal. Essa importância ecológica da água é resultado de sua importância fisiológica, pois, o único meio pelo qual um fator ambiental como a água pode afetar o crescimento de uma planta é influenciando as condições e os processos fisiológicos (Kosłowski & Pallardy, 1997). De fato, na natureza, a intensidade e a distribuição das chuvas definem o regime hídrico, influenciando desde o crescimento e a produtividade dos indivíduos até a distribuição das populações e a biodiversidade dos ecossistemas (Passioura 2006). Devido ao aumento de dióxido de carbono na atmosfera, acompanhado de um aumento na temperatura do ar, acredita-se que haverá uma maior demanda evaporativa das plantas, e, em muitas regiões, um aumento da ocorrência, frequência, intensidade e distribuição da seca. Os modelos de mudanças climáticas mostram uma alta frequência de chuvas separadas por longos períodos de seca (Dore 2005). Sendo assim, entre os fatores ambientais, a deficiência hídrica destaca-se como fator adverso ao crescimento e à produção vegetal sendo essencial para estudos que abordem o tema.

Seca significa perda de água e desidratação em temperaturas normais ou pouco elevadas. O déficit hídrico decorrente da seca se estabelece quando a absorção de água pelo sistema subterrâneo não atende às demandas da planta (Fan *et al.* 2006). Alterações fisiológicas e bioquímicas associadas ao estresse hídrico incluem a perda de turgescência, mudanças na fluidez e composição das membranas, aumento da concentração de solutos celulares e ocorrência de interações proteína-proteína e proteína-lípido, levando à desestruturação da membrana e prejudicando os processos metabólicos (Chaves *et al.* 2003, Mahajan & Tuteja 2006).

Solutos orgânicos

Existem vários tipos de respostas ao déficit hídrico que objetivam a manutenção do status hídrico da planta e, por extensão, para a manutenção dos processos fisiológicos e bioquímicos vitais. Algumas dessas respostas incluem o acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular, também chamados de solutos compatíveis, no processo conhecido como ajuste osmótico (Bajji *et al.* 2001).

O ajuste osmótico é considerado um dos mecanismos mais eficazes para a manutenção da turgescência celular, permitindo a manutenção da abertura estomática e da fotossíntese sob condições de baixo potencial hídrico no solo.

As plantas podem acumular prolina (Nayyar & Walia 2003, Yamada *et al.* 2005) e outros aminoácidos livres (Rai 2002, Kusaka *et al.* 2005), poliálcois (Ramanjulu & Bartels 2002) e carboidratos (Pelleschi *et al.* 1997, Chaves *et al.* 2002), de forma a se aclimatar e/ou se adaptar a déficits hídricos de diferentes níveis de intensidade. Estes compostos compartilham a propriedade de permanecerem estáveis em pH neutro e serem altamente solúveis em água (Ballantyne & Chamberlin 1994). Além disso, em altas concentrações, exercem pouco ou nenhum efeito sobre a interação de macromoléculas solventes.

A prolina é um dos aminoácidos mais comumente associados a respostas ao estresse hídrico. É sintetizada a partir do glutamato e da arginina sob condições fisiológicas normais, sendo o glutamato o caminho preferencial sob condições de estresse hídrico (Chen & Kao 1993). Seu acúmulo ocorre no citoplasma (Leigh *et al.* 1981) de células de folhas, de colmos e de raízes, sendo a capacidade de acúmulo e a sua concentração decrescentes com a idade da folha.

Algumas culturas caracterizam-se por baixos níveis desse composto sob condições ótimas e acúmulo durante o déficit hídrico (Ramanjulu & Bartels 2002). De acordo com Alia (2003), a prolina constitui menos que 5% dos aminoácidos totais livres em plantas mantidas sob condições normais, enquanto em plantas submetidas ao estresse hídrico, a concentração de prolina pode chegar a 80% do *pool* total de aminoácidos.

Existem na literatura contradições em relação à função do acúmulo de prolina em plantas submetidas ao estresse. Alguns autores afirmam que a prolina teria funções ligadas a processos de adaptação ao déficit hídrico (Singh *et al.* 1973), enquanto outros apontam a prolina apenas como indicador de estresse (Becker & Fock 1986) ou ainda um marcador bioquímico de alterações metabólicas geradas por diferentes tipos de estresse (Lima *et al.* 2004).

Devido à alta solubilidade em água, esse aminoácido contribui para o ajuste osmótico da célula enquanto promove o aumento nos níveis de outros osmólitos. Outras funções sugeridas para a prolina são a remoção de espécies reativas de oxigênio e a interação com resíduos hidrofóbicos de proteínas, protegendo-as da degradação e agregação (Valliyodan & Nguyen 2006). Por possuir um anel pirrolina, que confere uma baixa capacidade de ceder elétrons, a prolina forma um complexo de transferência de carga e sequestra O₂ livre. Assim, a prolina pode reduzir o dano por fotoinibição nas membranas do tilacóide pelo sequestro e redução da produção

de íons superóxido (Reddy *et al.* 2004). Além disso, sua síntese pode estar envolvida na recuperação da acidose citoplasmática, podendo manter a relação NADP⁺/NADPH em valores compatíveis com o metabolismo normal (Hare & Cress 1997). O catabolismo rápido de prolina pode promover reduções equivalentes que suportem a fosforilação oxidativa mitocondrial e a geração de ATP para a recuperação e consequente reparo de danos causados pelo estresse

Apesar de não haver claras evidências de maior acúmulo de prolina em espécies tolerantes que em espécies sensíveis, esse mecanismo parece fazer parte do processo de proteção ao estresse hídrico.

Os frutanos também são comumente descritos como protetores contra a seca. Em batatas transgênicas produtoras de frutanos, por exemplo, Knipp & Honermeier (2006) verificaram que houve uma menor produção de prolina quando comparada às plantas selvagens, sugerindo um mecanismo protetor dominante desses carboidratos ou um efeito pleiotrópico indireto na via de síntese da prolina.

De fato, entre os solutos compatíveis, os carboidratos são elementos-chave, pois podem ser armazenados tanto na forma de polissacarídeos com baixa atividade osmótica como o amido, quanto na forma de açúcares altamente solúveis e higroscópicos como a sacarose e hexoses (Whittaker *et al.*, 2007). Neste sentido é plausível que espécies acumuladoras de carboidratos em órgão de reserva como tubérculos, rizomas, rizóforos e raízes espessadas possam, durante o seu crescimento, ter a síntese e o acúmulo desses carboidratos afetados pelo déficit hídrico, bem como utilizá-los na geração de compostos osmoticamente ativos através de sua degradação em resposta a esse tipo de estresse do ambiente.

A manipulação dos genes que protegem e mantêm as funções celulares ou que mantêm a estrutura dos componentes celulares tem sido o maior alvo para produção de plantas tolerantes a estresses (Valliyodan & Nguyen 2006) e para o conhecimento dos mecanismos de proteção aos estresses abióticos.

Frutanos e o déficit hídrico

Plantas capazes de sintetizar frutanos estão presentes em muitas famílias não relacionadas filogeneticamente, sugerindo uma origem polifilética para o metabolismo de frutanos. Esta diversidade de distribuição filogenética e geográfica, juntamente com a ocorrência de frutanos em famílias altamente evoluídas, indica que os genes necessários ao metabolismo de frutanos podem ter surgido em resposta a uma ou várias pressões de seleção em um passado relativamente recente

(Hendry 1993). A disponibilidade de água pode ter sido a pressão de seleção que direcionou a evolução do metabolismo de frutanos nas plantas (Pilon-Smits *et al.* 1995). Dados paleoclimáticos, analisados frente à expansão da flora de frutanos, dão suporte a essa hipótese (Hendry & Wallace 1993). O surgimento da flora produtora de frutanos (30 a 15 milhões de anos atrás) ocorreu na mesma época do aparecimento da seca estacional e a distribuição da flora atual que apresenta o metabolismo de frutanos corresponde às regiões onde ocorre seca estacional (Hendry 1993).

Desta forma, além da função de reserva, vários trabalhos sugerem que os frutanos conferem às plantas resistência à seca e/ou tolerância ao frio (Hendry 1993, Pilon-Smits *et al.* 1995, Livingston & Henson 1998, Pilon-Smits *et al.* 1999, Van den Ende *et al.* 2000). Em algumas espécies, eles são acumulados *de novo* (Volaire & Lelièvre 1997, Kerepesi *et al.* 1998, De Roover *et al.* 2000), em outras, ocorrem alterações no tamanho de suas cadeias (Thomas 1991, Volaire *et al.* 1998, Thomas & James 1999), ou diminuição em seu conteúdo (Spollen & Nelson 1994) durante a desidratação. Evidências adicionais do papel protetor dos frutanos em condições de seca foram verificadas em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e beterraba (*Beta vulgaris* L.) acumuladoras de frutano, que se mostraram mais tolerantes à seca que as plantas selvagens (Pilon-Smits *et al.* 1995, 1999). A suspensão de rega promoveu a síntese de frutanos em plântulas de *Cichorium intybus* que, em condições normais, não apresentam essa capacidade, verificada apenas na planta adulta (De Roover *et al.* 2000).

O mecanismo pelo qual os frutanos protegem contra estresses abióticos são desconhecidos. Acreditava-se que os frutanos agiam como um suplemento de hexoses que protegeriam o tecido diminuindo o ponto de congelamento (Englmaier 1987, Pontis 1989). Porém, foi observado, em aveia, que, por mais que os frutanos fossem hidrolisados, o aumento das hexoses produzido diminuía o ponto de congelamento da água em apenas um grau (Livingston & Henson 1998). Então, foi proposto que os açúcares atuariam na prevenção da plasmólise celular. Williams (1980), estudando a relação entre volume celular, concentração de solutos e temperatura de congelamento, encontrou um volume celular mínimo que as células atingem antes de morrer. É possível que as plantas possam usar os açúcares sintetizados durante a aclimatação ao frio ou gerados na hidrólise dos frutanos para impedir a redução do volume celular alterando o potencial osmótico. Os estudos relacionando frutanos e aclimatação ao frio poderiam, então, ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de proteção à seca, uma vez que a dessecação faz parte do processo de congelamento. Assim, as hexoses geradas poderiam diminuir

o potencial hídrico do líquido intracelular e permitir a manutenção da expansão foliar durante períodos de seca (Santarius 1973, Spolen & Nelson 1994).

Segundo Kramer (1995), a adição de solutos osmoticamente ativos às células é mais eficaz em promover a diminuição do potencial hídrico do que a própria perda de água. Uma redução de 10% no volume do vacúolo celular provoca a diminuição no potencial osmótico em cerca de 11% do valor inicial, enquanto a adição de solutos é responsável por uma redução de até 50% deste valor.

Além da sua atuação no ajuste osmótico, estudos recentes demonstraram que os frutanos atuam na estabilização de membranas em condições de estresse (Demel *et al.* 1998, Hinch *et al.* 2000, Vereyken *et al.* 2001, Hinch *et al.* 2002). As membranas são as primeiras estruturas afetadas pelo congelamento e dessecação, causando injúria às células. O estresse dentro da bicamada lipídica resulta no deslocamento das proteínas de membrana e isto contribui para a perda da integridade da membrana, da seletividade, interrupção da compartimentalização celular e perda das atividades enzimáticas. As proteínas citosólicas e as organelas apresentam diminuição da atividade ou desnaturação completa quando desidratadas. A alta concentração de eletrólitos durante a desidratação do protoplasma pode causar a interrupção do metabolismo celular (Ramanjulu & Bartels 2002).

Durante o estresse causado pelo frio, a transição dos lipídeos do estado líquido-cristalino para gel é responsável pelo dano causado à membrana por aumentar a sua permeabilidade. Em experimentos realizados *in vitro*, utilizando lipossomos isolados, os frutanos atuaram na estabilização das membranas sob condições estressantes devido à sua habilidade de interagir com os fosfolipídeos (Demel *et al.* 1998). Vereyken *et al.* (2001) revelaram que tanto o levano quanto a inulina interagiram com as membranas compostas de fosfolipídeos, protegendo-as durante a transição das fases (estado líquido-cristalino para gel). Foi demonstrado, ainda, que a bicamada lipídica torna-se menos permeável durante o tratamento de congelamento e desidratação quando os frutanos estão presentes (Hinch *et al.* 2000). Desta forma, a célula não perde sua integridade devido ao aumento da permeabilidade e à perda da seletividade da membrana ocorridos durante o frio e a seca (Demel *et al.* 1998, Hinch *et al.* 2006).

A engenharia metabólica para a biossíntese de frutanos mostrou-se uma ferramenta adequada para estudos da regulação do metabolismo desses compostos em função de alterações do ambiente. Genes bacterianos da síntese de frutanos foram introduzidos em plantas não acumuladoras de frutanos como tabaco, batata, beterraba e milho, permitindo que algumas dessas

plantas exibissem acúmulo de frutanos e tolerância ao estresse hídrico (Kawakami *et al.* 2008 e referências ali contidas). Em alguns casos, fenótipos aberrantes como branqueamento, necroses e nanismo foram observados nas plantas que expressavam esses genes bacterianos (Cairns 2003). Assim, plantas transgênicas codificando genes de frutossiltransferases de espécies acumuladoras de frutanos passaram a ser o foco da identificação funcional desses genes e da análise do acúmulo de frutanos em espécies que não sintetizam esse carboidrato (Livingston *et al.* 2007).

Os cDNAs de enzimas de síntese (SST, FFT) e hidrólise (FEH) de frutanos foram também clonados de diversas Asteraceae (Van den Ende *et al.* 2002), incluindo o cDNA da FEH de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asega *et al.* 2008) e da FFT de *Viguiera discolor* Baker, outra Asteraceae do cerrado acumuladora de frutanos. A clonagem desses genes tornou-se a mais recente ferramenta na pesquisa de frutanos. Atualmente o metabolismo de frutanos e as enzimas podem ser estudados em nível molecular para elucidar as variações dos frutanos durante o desenvolvimento da planta, bem como suas respostas frente a fatores ambientais adversos, como baixas temperaturas e deficiência hídrica. Adicionalmente, a síntese e a degradação dos frutanos podem ser adaptadas para a produção destes açúcares em plantas para uso como ingredientes de alimentos funcionais (Ritsema & Smeekens 2003b) bem como para o preparo de culturas mais tolerantes a estresses ambientais.

Vernonia herbacea

Vernonia herbacea (Figura 1) é uma espécie perene nativa do cerrado que apresenta crescimento sazonal. Trata-se de uma entre muitas espécies de Asteraceae encontrada na região do cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (SP) (Carvalho & Dietrich 1993, Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993). Plantas desta espécie possuem órgãos subterrâneos de origem caulinar denominados rizóforos, responsáveis por sua reprodução vegetativa e pela função de reserva para a planta, acumulando até 80% de sua massa seca em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich 1993).

Considerando a sazonalidade climatológica que impõe restrição hídrica às plantas dessa região durante o inverno, a ampla ocorrência de frutanos nas espécies de cerrado parece coerente com a hipótese do papel destes carboidratos na tolerância dessas plantas ao estresse hídrico. De fato, experimentos de suspensão de rega realizados com *V. herbacea* mostraram que essas plantas são capazes de reter água nos seus órgãos subterrâneos de reserva por longos períodos (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004). Os autores verificaram ainda um aumento da razão fruto-oligo:fruto-

polissacarídeos, paralelamente ao aumento da concentração de frutose nessas condições, sugerindo que as frutossiltransferases, além das hidrolases, atuam na mobilização dos frutanos nessas condições, favorecendo a tolerância das plantas ao déficit hídrico.

A tolerância à seca é um processo muito complexo e a proteção exercida pelos frutanos explica apenas uma parte de um conjunto de estratégias de adaptação das plantas. Os frutanos podem ser facilmente degradados, produzindo uma mistura de hexoses, sacarose e fruto-oligossacarídeos. Acredita-se que o acúmulo dessas moléculas de cadeias curtas no vacúolo possibilita a diminuição do potencial hídrico, afetando o influxo de água do citoplasma e mantendo a turgescência dos tecidos. É possível, ainda, que os frutanos protejam os tecidos indiretamente, pois sua natureza solúvel, ao contrário do amido, permite uma rápida produção de carbono e energia para a síntese de moléculas protetoras alternativas.



Figura 1- Aspecto geral de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby.

Os mecanismos pelos quais os frutanos desempenham esse papel de proteção à seca ainda não foram completamente elucidados, sendo necessária uma avaliação minuciosa do metabolismo

desses carboidratos através de análises das atividades das enzimas do seu metabolismo e da composição de frutanos em plantas de *V. herbacea* submetidas ao déficit hídrico.

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da intensidade e da duração do déficit hídrico no metabolismo de frutanos em plantas de *V. herbacea* e, dentro desta proposta, avaliar o papel dos frutanos como indicadores de processos fisiológicos e sinalizadores de estresse e de adaptação ao ambiente e a possível atuação desses compostos na osmorregulação das células e manutenção da turgescência.

Referências Bibliográficas

- Aires, M.M.** 1991. Fisiologia renal. *In*: M.M. Aires (ed.). Fisiologia, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 495-583.
- Alia, M.** 2003. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline. *In*: 1st Annual User Meeting of the Free Radical Research Facility Daresbury, at Council for the Central Laboratory of the Research Councils, Cheshire, UK.
- Asega, A.F., Nascimento, J.R.O., Schroeven, L., Van den Ende, W. & Carvalho, M.A.M.** 2008. Cloning, Characterization and Functional Analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Cell Physiology* 49(8): 1185-1195.
- 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.
- Bajji, M., Lutts, S., Kinet, J.M.** 2001. Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Science* 160: 669-681.
- Ballantyne, J.S. & Chamberlin, M.E.** 1994. Regulation of cellular amino acid levels. *In*: K. Strange (ed). Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. CRC Press, Boca Raton, pp.111-122.
- Becker, T.W. & Fock, H.P.** 1986. The activity of nitrate reductase and pool sizes of some amino acids and some sugars in water-stressed maize leaves. *Photosynthesis Research* 8: 267-274.
- Cairns, A.J.** 2003. Fructan biosynthesis in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 549-567.
- Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.C.** 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.
- 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 en Iberoamérica: Tecnología y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Projeto CYTED XI.6, Varela, São Paulo, pp. 77-90.

- Carvalho, M.A.M., Asega, A.F., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2007. Fructans in Asteraceae from the Brazilian cerrado. *In*: N. Shiomi, N. Benkeblia & S. Onodera (eds.). Recent advances in fucto-oligosaccharides research. Research Signpost. Trivandrum, Índia, pp. 67-91.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S.** 2003. Understanding plant responses to drought – from genes to whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- Chaves, M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osorio, M. L., Carvalho L., Faria, T. & Pinheiro, C.** 2002. How plants cope with water stress in the field. *Photosynthesis and growth. Annals of Botany* 89: 907–916.
- Chen, C. & Kao, C.H.** 1993. Osmotic stress and water stress have opposite effects on putrescine and proline production in excised rice leaves. *Plant Growth Regulation* 13: 197-202.
- Coutinho, L.M.** 1978. O conceito de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 1:17-23.
- Coutinho, L.M.** 2002. Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. *In*: A. L. Klein (Org), Unesp/Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo.
- De Roover, J., Vandenbranden, K., Van Laere, A. & Van den Ende, W.** 2000. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Chicorium intybus* L.). *Planta* 210: 808-814.
- 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 – Biomembranes* 1375: 36-42
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Itaya, N.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 Biology and Technology* 47: 363-373.
- Dore, M.H.I.** 2005. Climate change and changes in global precipitation patterns: What do we know? *Environmental International* 31: 1167-1181.
- 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.
- Eiten, G.** 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38: 201-341.
- Englmaier, P.** 1987. Carbohydrate metabolism of salt-tolerant fructan grasses as exemplified with *Puccinellia peisonis*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 182: 163-182.
- Ernst, M. & Pfenning, J.** 2000. Fructan in stem exudates of *Helianthus tuberosus* L. *In*: A. Fuchs (ed.). Proceedings of the Eighth Seminar on Inulin, EFA, pp. 56–58

- Fan, L., Linker, R., Gepstein, S., Tanimoto, E., Yamamoto, R. & Neumann, P.M.** 2006. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiology* 140: 603-612.
- 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 carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. *Revista Brasileira de Botânica* 9: 156-166.
- Frehner, M., Keller, F. & Wienken, 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.
- Godoy, S.M.A. & Felipe, G.M.** 1992. Crescimento inicial em *Qualea grandiflora*, uma árvore dos cerrados. *Revista Brasileira de Botânica* 15(1): 23-30.
- Hare, P.D. & Cress, W.A.** 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21: 79-102.
- Hellwege, E.M., Czapla, S., Jahnke, A., Willmitzer, L. & Heyer, A.G.** 2000. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A.* 97: 8699-8704.
- 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.
- 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., Popova, A.V. & Cacela, C.** 2006. Effects of sugars on the stability of lipid membranes during drying. *In: Liu A. Leitmannova (ed.). Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, vol. 3, Elsevier, Amsterdam, pp. 189-217.
- 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.
- Kawakami, A., Sato, Y. & Yoshida, M.** 2008. Genetic engineering of Rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *Journal of Experimental Botany* 59: 793-802.

- Kerepesi, I., Galiba, G. & Bányai, E.** 1998. Osmotic and salt stresses induced differential alteration in water-soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 5347-5354.
- Knipp, G. & Honermeier, B.** 2006. Effect of water stress on proline accumulation of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* L.) generating fructans. *Journal of Plant Physiology* 163: 392-397.
- Koslowski, T.T. & Pallardy, S.G.** 1997. *Physiology of wood plants*. 2° ed. Academic Press, San Diego.
- 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.
- Kramer, P.J.** 1995. *Water relations of plants and soils*. Academic Press, London.
- Kusaka, M., Ohta, M. & Fujimura, T.** 2005. Contribution of inorganic components to osmotic adjustment and leaf folding for drought tolerance in pearl millet. *Physiologia Plantarum*, 125: 474–489.
- 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.
- Leigh, R.A., Ahmad, N. & Jone, R.G.W.** 1981. Assessment of glycine betaine and proline compartmentation by analysis of isolated beet vacuoles. *Physiologia Plantarum* 153: 34-41.
- Lima, G.P.P., Fernandes, A.A.H., Catâneo, A.C., Cereda, M.P. & Brasil, O.G.** 2004. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. *Bragantia* 63: 335-340.
- 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.
- Livingston, D.P., Hinch, D.K. & Heyer, A.G.** 2007. The relationship of fructan to Abiotic stress tolerance in plants. *In: N. Shiomi, N. Benkeblia & S. Onodera (eds.). Recent advances in fucto-oligosaccharides research*. Research Signpost. Trivandrum, Índia, pp. 181-199.
- Mahajan, S. & Tuteja, N.** 2006. Cold, salinity and drought stresses: An overview; *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 444: 139158
- Mantovani, W.** 1983. *Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo, São Paulo*. 1983. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- 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.
- Nayyar, N. & Walia, D.P.** 2003. Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biologia Plantarum* 46: 275-279.
- Passioura, J.** 2006. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *Journal of Experimental Botany. Integrated Approaches to Sustain and Improve Plant Production under Drought Stress Special Issue.* pp: 1-5.
- Pelleschi, S., Rocher, J.P. & Prioul, J.L.** 1997. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis on mature maize leaves. *Plant, Cell and Environment* 20: 493-503.
- 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. 1981. *Biochemical Systematics and Ecology* 9: 69-78.
- Pollock, C. J., Cairns, A.J., Sims, I.M. & Housley, T.L.** 1996. Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. *In: E. Zamski & A.A. Shaffer A.A. (eds.). Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source - Sink Relationships, Marcel Dekker Inc, New York, pp. 97-113.*
- Pontis, H.G.** 1989. Fructans and cold stress. *Journal of Plant Physiology* 134: 148-150.
- Rai, V.K.** 2002. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum* 45: 481-487.
- Ramanjulu, S. & Bartels D.** 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* 25:141-151.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. & Vivekanandan, M.** 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161: 1189-1202.
- Ritsema, T., Hernandez, L., Verhaar, A., Altenbach, D., Boller, T., Wiemken, A. & Smeekens, S.** 2006. Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding Box. *The Plant Journal* 48: 228-237.
- Ritsema, T. & Smeekens, S.** 2003a. Engineering fructan metabolism in plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 811-820.
- Ritsema, T. & Smeekens, S.** 2003b. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 223-230.

- Roberfroid, M.B.** 1993. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33: 103-148.
- Roberfroid, M.B., Bornet, F., Bouley, C. & Cummings, J.H.** 1995. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition Review*: 53 127-130.
- Santarius, K.A.**, 1973. The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. *Planta* 113: 105–114.
- Shiomi, N.** 1989. Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructans in Liliaceous plants. *Journal of Plant Physiology* 134: 151-155.
- Singh, T.N., Aspinnall, D. Paleg, L. & Boggess, S.F.** 1973. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Australian Journal Biological Science* 26: 57-63.
- Spollen, W.G. & Nelson, C.J.** 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* 106: 329-336.
- Taper, H. Lemort, C. & Roberfroid, M.B.** 1999. Inhibition of dietary inulin and oligofructose on the growth of transplantable mouse tumor. *Anticancer Research* 18: 4123-4126.
- 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.
- Thomas, H.** 1991. Accumulation and consumption of solutes in swards of *Lolium perenne* during drought and after rewatering. *New Phytologist* 118: 35-48.
- Thomas, H., James, A.R.** 1999. Partitioning of sugars in *Lolium perenne* (perennial ryegrass) during drought and on rewatering. *New Phytologist* 142: 292–305.
- Valliyodan, B. & Nguyen, H. T.** 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2006 9: 1–7.
- Valluru, R. & Van den Ende, W.** 2008. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany* 59: 2905-2916.
- 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., 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., De Roover, J., Verhaert, 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. & 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., Yoshida, M., Clerens, S., Vergauwen, R & Kawakami, A.** 2005. Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolase (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum* L.) *New Phytologist* 166: 917-932.
- Vereyken, I.J., Chupin, V., Demel, R.A., Smeekens, S.C.M. & Kuijff, B.D.** 2001. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 1510: 307-320.
- Vergawen, 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 Physiology* 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 phenological phases. *Plant, Cell and Environment* 16: 919–928.
- Volaire, F. & Lelièvre, F.** 1997. Production, persistence, and water-soluble carbohydrate accumulation in 21 contrasting populations of *Dactylis glomerata* L. subjected to severe drought stress in the south of France. *Australian Journal of Agricultural Research* 48: 933-944.
- Volaire, F., Thomas, H., Bertagne, N., Bourgeois, E., Gautier, M.F. & Lelièvre, F.** 1998. Survival and recovery of perennial forage grasses under prolonged Mediterranean drought. II. Water status, solute accumulation, abscisic acid concentration and accumulation of dehydrin transcripts in bases of immature leaves. *New Phytologist* 140: 451-460.
- Wang, N. & Nobel, P.S.** 1998. Phloem transport of fructans in the Crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology* 116: 709–714.
- 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.
- Whittaker, A., Martinelli, T., Farrant, J.M., Boicchio, A. & Vazzana, C.** 2007. Sucrose phosphate synthase activity and the co-ordination of carbon partitioning during sucrose and amino acid accumulation in desiccation-tolerant leaf material of the C4 resurrection plant *Sporobolus stapfianus* during dehydration. *Journal of Experimental Botany* 58: 3775-3787.
- Williams, R.J.** 1980. *Analysis and Improvement of Plant Cold Hardiness.*
- Yamada, N., Morishita, H., Urano, K. Shiozaki, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. & Yoshida, K.** 2005. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. *Journal of Experimental Botany* 56: 1975-1981.

Yamasaki, H. & Matsumoto, K. 1993. Production of fructo-oligosaccharides-rich fructose syrup. *In*: A. Fuchs (ed.). *Inulin and Inulin-Containing Crops*, Elsevier, Amsterdam, pp. 355-357.

CAPÍTULO I

**Efeito do déficit hídrico em plantas submetidas à
suspensão de rega. I**

Resumo

Frutanos do tipo inulina são os principais carboidratos de reserva armazenados nos órgãos subterrâneos das espécies de Asteraceae do cerrado. *Vernonia herbacea* encontra-se entre essas espécies e aproximadamente 80% da massa seca dos órgãos subterrâneos é constituída por frutanos. Além de seu papel de reserva, os frutanos parecem atuar como osmorreguladores, favorecendo o crescimento e o desenvolvimento das plantas mesmo sob condições limitantes de água no solo. Esse papel fisiológico dos frutanos parece coerente com a ampla ocorrência desses carboidratos em espécies do cerrado que encontram condições de restrição hídrica ao longo do ano. O objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo de frutanos por meio da análise do seu conteúdo e composição e das atividades das suas enzimas de síntese, sacarose:sacarose frutossiltransferase (SST) e frutano:frutano frutossiltransferase (FFT), e despolimerização, frutano-exohidrolase (FEH), em plantas submetidas à restrição hídrica por suspensão de rega. As plantas foram divididas em 3 lotes: rega diária (controle), suspensão de rega por 23 dias (tratado) e suspensão de rega com re-irrigação no 15º dia (re-irrigado). As coletas foram realizadas no início do experimento e após, 3, 7, 11, 15, 17 e 23 dias após a suspensão da rega. Nas plantas submetidas à suspensão de rega, a SST e a FFT apresentaram um aumento pontual no início do período de restrição hídrica, concomitante ao início da diminuição do potencial hídrico do solo. A partir deste ponto o potencial hídrico de suas folhas também apresentou diminuição. A FEH atuou na degradação de frutanos, liberando açúcar redutor e, possivelmente, juntamente com a FFT, atuou na redistribuição das moléculas de frutanos após a re-irrigação. As plantas tratadas apresentaram maior conteúdo de fruto-oligossacarídeos e açúcar redutor, que podem ter atuado na regulação osmótica, diminuindo o potencial hídrico da célula e permitindo a manutenção da turgescência. Desse modo, a hipótese de que os frutanos atuam como reguladores osmóticos em *V. herbacea* parece coerente com os resultados obtidos, uma vez que as plantas submetidas à suspensão de rega apresentaram alterações em seu metabolismo, possibilitando aos tecidos uma baixa perda de água durante a suspensão de rega e uma rápida reabsorção de água após a re-irrigação das plantas.

Palavras-chave: déficit hídrico, frutanos, *Vernonia herbacea*.

Abstract

Fructans of the inulin type are the main reserve carbohydrates stored in the underground organs of Asteraceae species from the cerrado. *Vernonia herbacea* is one of this species and the plants accumulate about 80% of its dry mass as fructans. Besides its role as reserve compounds, fructans seem to act as osmotic regulators, favoring the growth and development of the plants even under drought conditions. This physiological function attributed to fructans seems consistent with the wide occurrence of these carbohydrates in cerrado species, a bioma that undergoes periods of drought throughout the year. The aim of this work was to analyze fructan composition and the activities of the enzymes involved in fructan synthesis, sucrose:sucrose fructosyltransferase (SST) e fructan:fructan fructosyltransferase (FFT) and depolymerization, fructan exohydrolase (FEH) in plants submitted to water restriction. The plants were divided into 3 groups that received 3 treatments: daily watering (control), suspension of irrigation for 23 days (treated) and suspension of irrigation and rewatering after 15 days (re-irrigated). Samplings were done at the beginning of the experiment and after 3, 7, 11, 15, 17 and 23 days after suspension of irrigation. SST and FFT presented a clear increase at the beginning of the period of water restriction, coinciding with the onset of the reduction in soil water potential and in leaf water potential. An increase in FEH activity led to the production of reducing sugars due to fructan mobilization. FEH together with FFT also seemed to act in the redistribution of fructan molecules after re-irrigation. Treated plants showed an increase in fructo-oligosaccharides and reducing sugars and these compounds were thought to act in the osmotic regulation, favoring the decrease in cell water potential and allowing the maintenance of cell turgor. Considering that plants submitted to water restriction showed changes in fructan metabolism, favoring water retention and absorption after re-irrigation, the hypothesis that fructans act as osmotic regulators is reinforced.

Key words: fructans, *Vernonia herbacea*, water restriction.

Introdução

Os frutanos ocorrem como principal carboidrato de reserva em cerca de 15% das angiospermas. Dentre estas, encontram-se muitas espécies de importância econômica e de famílias altamente evoluídas como Asteraceae e Poaceae. Como exemplo, podemos citar os cereais (cevada, trigo, aveia), algumas verduras (endívia/chicória, cebola, alho, alface), plantas ornamentais (dália, tulipa) e gramíneas forrageiras (*Lolium* sp.) (Hendry & Wallace 1993).

Frutanos são polímeros de frutose formados pela adição de unidades de frutose à molécula de sacarose (Edelman & Jefford 1968, Pollock *et al.* 1996). Os diferentes tipos de frutanos são identificados dependendo da ligação glicosídica entre as unidades de frutose. Todos são sintetizados pela adição de unidades frutofuranosil unidas por ligações do tipo β (2,1) ou β (2,6) a 3 trissacarídeos (1-cestose, 6-cestose e neocestose) que, por sua vez, são sintetizados pela ligação de uma unidade de frutose a diferentes grupos hidroxila da sacarose. A inulina, encontrada principalmente em Asteraceae, contém ligações β (2,1) e é baseada no trissacarídeo 1-cestose; o levano ou fleano, presente em Poaceae, contém ligações β (2,6) e é baseado na 6-cestose; e o frutano baseado no trissacarídeo neocestose, que apresenta a unidade de glucose interna à molécula e pode ser constituído de unidades de frutose unidas por ligações β (2,1) ou β (2,6) é encontrado principalmente em Poaceae. Tipos de frutanos mais complexos e ramificados são encontrados principalmente em monocotiledôneas (Pollock *et al.* 1996).

Nas células, os frutanos são acumulados na forma solúvel nos vacúolos (Frehner *et al.* 1984) e encontrados principalmente em órgãos subterrâneos de reserva, como raízes tuberosas, rizóforos, tubérculos e bulbos, assim como em órgãos fotossintetizantes, como folhas e caules e em inflorescências e sementes (Meier & Reid 1982).

Os frutanos têm como molécula precursora a sacarose e são sintetizados pela ação de frutossiltransferases. A síntese da inulina se dá pela atuação de duas enzimas distintas (Edelman & Jefford 1968, Koops & Jonker 1996, Luscher *et al.* 1996, Van den Ende & Van Laere 1996). Inicialmente ocorre a formação do trissacarídeo 1-cestose e a liberação de uma molécula de glucose a partir de duas moléculas de sacarose, pela ação da sacarose frutossiltransferase (1-SST). Em seguida, a frutano: frutano frutossiltransferase (1-FFT) catalisa o alongamento da cadeia pela transferência de unidades de frutose de uma molécula doadora para uma receptora. A FFT também atua na redistribuição das unidades de frutose, podendo promover a diminuição do comprimento das cadeias. A ampla variação de estruturas e graus de polimerização encontrados entre os diferentes grupos de plantas que contém frutanos é atribuída, principalmente, a

diferenças nas propriedades de suas frutossiltransferases (Hellwege *et al.* 2000, Vergauwen *et al.* 2003). A hidrólise de frutanos ocorre pela remoção seqüencial dos resíduos terminais de frutose por frutano-exohidrolases (FEH). Esta enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose e é fortemente inibida por este dissacarídeo (Edelman & Jefford 1968, De Coninck *et al.* 2007, Asega *et al.* 2008).

Plantas capazes de sintetizar frutanos estão presentes em muitas famílias não relacionadas filogeneticamente, sugerindo uma origem polifilética para o metabolismo de frutanos. Esta diversidade de distribuição filogenética, juntamente com a diversidade de distribuição geográfica, e a ocorrência de frutanos em famílias altamente evoluídas, indica que os genes necessários ao metabolismo de frutanos podem ter surgido em resposta a uma ou várias pressões de seleção em um passado relativamente recente (Hendry 1993). A disponibilidade de água pode ter sido a principal pressão de seleção que direcionou a evolução do metabolismo de frutanos nas plantas (Pilon-Smits *et al.* 1995). De fato, dados paleoclimáticos, analisados frente à expansão da flora de frutanos, dão suporte a essa hipótese (Hendry & Wallace 1993). O surgimento da flora produtora de frutanos (30 a 15 milhões de anos atrás) ocorreu na mesma época do aparecimento da seca estacional e a distribuição da flora atual que apresenta o metabolismo de frutanos corresponde às regiões onde ocorre seca estacional (Hendry 1993).

Vernonia herbacea é uma entre muitas espécies de Asteraceae encontrada na região do cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, SP (Carvalho & Dietrich 1993). Possui órgãos subterrâneos de origem caulinar, denominados rizóforos, responsáveis pela reprodução vegetativa das plantas, e que atuam, também, como órgãos de reserva, acumulando até 80% de sua massa seca em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich 1993).

Considerando a sazonalidade climatológica que impõe restrição hídrica às plantas dessa região durante o inverno, a ampla ocorrência do metabolismo de frutanos nas espécies de cerrado parece coerente com a hipótese do papel destes carboidratos na resistência dessas plantas ao estresse hídrico. De fato, experimentos de suspensão de rega realizados com *V. herbacea* mostraram que essas plantas são capazes de reter água nos seus órgãos subterrâneos de reserva por longos períodos enquanto a umidade do solo diminui (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004). Esses autores verificaram ainda um aumento da razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos, paralelamente ao aumento da concentração de frutose nessas condições, sugerindo que as frutossiltransferases, além das hidrolases, estariam atuando na mobilização dos frutanos nessas condições.

Estudos sobre nutrição mineral, adubação e produção de inulina em cultivos de *V. herbacea* indicaram que essa espécie do cerrado representa uma alternativa para a produção comercial de inulina (Carvalho *et al.* 1998, Cuzzuol *et al.* 2008). Além destes, estudos realizados em ratos demonstraram a aplicabilidade da inulina de *V. herbacea* para uso em testes de função renal (Dias-Tagliozzo *et al.* 1996).

Além da função de reserva, vários trabalhos sugerem que os frutanos conferem às plantas resistência à seca e tolerância ao frio (Hendry 1993, Pilon-Smits *et al.* 1995, Livingston & Henson 1998, Pilon-Smits *et al.* 1999, Van den Ende *et al.* 2000) possivelmente por serem compostos osmoticamente ativos. Entretanto, os mecanismos pelos quais os frutanos desempenham esses papéis ainda não foram completamente elucidados. Em *Festuca arundinacea* Schreb., a despolimerização de frutanos foi observada sob estresse hídrico (Spollen & Nelson 1994). Outros trabalhos sugeriram que durante a seca, genótipos tolerantes de *Dactylis glomerata* L. (Volaire & Lelièvre 1997) e trigo (Kerepesi *et al.* 1998) acumularam maiores quantidades de frutanos do que os mais sensíveis, e mostraram que plantas transgênicas de tabaco e beterraba para a síntese de frutanos apresentaram maior resistência ao estresse hídrico do que as plantas não transformadas (Pilon-Smits *et al.* 1995, 1999). A suspensão de rega também promoveu a síntese de frutanos em plântulas de *C. intybus* (De Roover *et al.* 2000).

Em vista da ampla ocorrência de espécies herbáceas acumuladoras de frutanos em regiões de cerrado, da ocorrência de um período de seca neste ambiente e da possível tolerância à seca que estes compostos conferem às plantas, o objetivo deste trabalho foi avaliar as variações no metabolismo de frutanos em plantas de *V. herbacea* em resposta ao déficit hídrico.

Material e Métodos

Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby com aproximadamente 6 meses de idade, obtidas por brotação de fragmentos de rizóforos de plantas adultas, coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, SP (22° 18' S, 47° 11' W) (Carvalho *et al.* 1997). As plantas foram cultivadas em vasos individuais de 3 L contendo terra de canteiro e mantidas em casa de vegetação. Foram efetuadas medidas diárias das temperaturas máxima e mínima, com as quais calculou-se a temperatura média compensada ($T_D = (0,29.T_{\min}) + (0,71.T_{\max})$), conforme Goudriaan & Laar (1994), assim como medidas da umidade relativa do ar, calculada com base nas leituras dos termômetros de bulbo úmido e seco realizadas às 07:00 e 14:00 h.

Tratamentos e amostragem

As plantas foram divididas em 3 lotes: um lote recebeu regas diárias (controle), outro foi mantido em suspensão total de rega por 23 dias (tratado) e um terceiro foi mantido em suspensão de rega por 15 dias, após o que foi re-irrigado por 8 dias (tratado – re-irrigado). As coletas de tecidos vegetais foram realizadas no início do experimento (tempo zero), e aos 3, 7, 11, 15, 17 e 23 dias após o início da suspensão de rega. O dia da re-irrigação foi determinado pelo aspecto de murcha apresentado pelas plantas.

Em cada ponto de amostragem foram coletadas 3 amostras de 3 plantas cada. Após lavagem com água e congelamento em nitrogênio líquido, amostras de rizóforos foram armazenadas a -80 °C até a realização das extrações de carboidratos e enzimas, em triplicata. Foram feitas também determinações da massa fresca (MF) e seca (MS) da parte aérea (por secagem em estufa a 60 °C por 72 horas) e dos rizóforos (por liofilização), assim como medidas de umidade do solo e de potencial hídrico das folhas e do solo em cada ponto de amostragem. As coletas foram realizadas entre 14:00 e 15:00 horas.

Umidade do solo (U_{solo}) e potencial hídrico do solo ($\Psi_{\text{w solo}}$)

A cada amostragem de plantas para as análises bioquímicas, a umidade do solo nos vasos foi determinada por gravimetria (Blake 1965). Para tal, amostras de solo foram obtidas de cada vaso utilizando-se anéis volumétricos de 80 cm³, sendo determinada a massa fresca

imediatamente após a coleta e a massa seca após 72 h de secagem da amostra em estufa ventilada a 70°C. A umidade do solo (U_{solo}) foi calculada a partir da fórmula:

$$U_{\text{solo}}(\%) = \frac{MF - MS}{MS - Ta} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

MF = massa fresca da amostra de solo;

MS = massa seca da amostra de solo;

Ta = tara do anel volumétrico.

Nas mesmas amostras coletadas conforme descrito anteriormente para determinação da U_{solo} , foram realizadas medidas pontuais do $\Psi_{w \text{ solo}}$. Para tal, utilizou-se um psicrômetro de ponto de orvalho (Modelo Decagon WP4). As medidas foram realizadas entre 14:00 e 15:00 horas.

Conteúdo de água (%)

O conteúdo de água da parte aérea e do rizóforo foi determinado a partir da fórmula:

$$TU(\%) = \frac{MF - MS}{MF} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

MF = massa fresca da amostra, determinada imediatamente após a coleta;

MS = massa seca da amostra após secagem em estufa a 60 °C (parte aérea) e após liofilização (rizóforos).

Potencial hídrico das folhas (Ψ_w)

Foram realizadas medidas do Ψ_w da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice das plantas de cada amostra. Antes de destacá-la da planta, a folha utilizada foi submetida à abrasão com lixa de areia para remoção de tricomas e ceras cuticulares e, para a realização da medida, foram retirados 3 discos foliares de 1,15 cm de diâmetro. A exemplo do $\Psi_{w \text{ solo}}$, as medidas do Ψ_w foram também realizadas pelo método de psicrometria de ponto de orvalho, utilizando o aparelho Decagon WP4 em modo contínuo até a obtenção do equilíbrio dos valores de Ψ_w . as medidas foram realizadas aproximadamente às 8:00 horas.

Extração enzimática

A extração e determinação das atividades enzimáticas foram realizadas conforme descrito em Asega & Carvalho (2004). Os rizóforos foram homogeneizados em tampão citrato–fosfato (McIlvaine) 50 mM pH 5,5, contendo 2 mM de EDTA, 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β -mercaptoetanol e 10% de polivinil polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi mantido em repouso por 30 min e, em seguida, filtrado em nylon duplo. Ao filtrado foi adicionado sulfato de amônio a 20% de saturação, sendo a mistura mantida em repouso por uma noite. Após centrifugação a 12000 g por 20 min a 5 °C, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 80% de saturação. A mistura foi mantida em repouso por 1 hora. Após centrifugação por 20 min a 17000 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em tampão. O extrato foi dessalinizado em colunas de Bio Gel P-6 DG e submetido aos ensaios de atividade enzimática. Toda a manipulação do material durante a extração foi realizada a 5 °C. O conteúdo de proteína nos extratos foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (Sigma) ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) como padrão.

Ensaio enzimático

As misturas de incubação foram constituídas de extrato enzimático e substratos na proporção de 1:1 (v/v). Os substratos foram preparados em tampão Mc Ilvaine 50 mM, pH 4,5. Os extratos foram incubados a 30 °C utilizando-se substratos nas concentrações finais de 200 mM de sacarose (Sigma) para a atividade de SST, 50 mM de sacarose (Sigma) para a atividade de invertase, 200 mM de 1-cestose para a atividade de FFT e 5% de inulina de *Helianthus tuberosus* L. (Sigma) para a atividade de FEH. O tempo de incubação foi de 2 horas para a atividade da SST, 1 hora para FFT, 4 h para a invertase e de 30 minutos a FEH. As misturas de incubação foram submetidas à fervura para interrupção da reação.

Análise das atividades enzimáticas

Para a determinação das atividades da SST e FFT, amostras das misturas de incubação foram diluídas (200x) em água deionizada e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema de cromatografia Dionex (DX-300) utilizando-se coluna CarboPac PA-1 (4 x 250 mM). A eluição dos carboidratos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150 mM de

hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH) com a seguinte programação: 0 - 2 min, 25 mM; 2,1 - 8 min, 50 mM; 8,1 - 10 min, 350 mM; 10,1 - 12 min, 500 mM; 12,1 - 17 min, 25 mM. Os potenciais aplicados para E1 (480 ms), E2 (180 ms) e E3 (360 ms) foram 0,05, 0,75 e -0,20, respectivamente, e o fluxo aplicado à coluna foi de 1 mL min⁻¹. As atividades da SST e da FFT foram determinadas pelas áreas dos picos da 1-cestose e da nistose, respectivamente, utilizando-se padrões externos. A atividade da FEH foi determinada pela quantidade de frutose liberada na mistura de incubação, por quantificação do açúcar redutor (Somogyi 1945), utilizando-se frutose (Sigma) como padrão. Para a determinação da atividade da invertase, alíquotas das misturas de incubação foram diluídas (100x) e analisadas por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo DX-300, utilizando-se coluna CarboPac PA-1 (4 X 250 mm) e programa isocrático de 100 mM de hidróxido de sódio. Os potenciais aplicados para E1 (480 ms), E2 (180 ms) e E3 (360 ms) foram 0,05, 0,75 e -0,20, respectivamente, e o fluxo aplicado foi de 1 mL min⁻¹. A atividade da invertase foi determinada pela área do pico da frutose, utilizando-se padrão externo.

Extração de carboidratos solúveis

Amostras liofilizadas de rizóforos foram pesadas para a determinação da massa de matéria seca e, então, submetidas à extração de carboidratos conforme Carvalho *et al.* (1998) com modificações. As amostras foram pulverizadas em almofariz, colocadas em etanol 80% e mantidas em banho-maria a 80 °C por 15 min, sendo então centrifugadas a 700 g por 15 min. Os precipitados foram re-extraídos duas vezes. Os sobrenadantes etanólicos foram reunidos e reservados. Os resíduos finais foram extraídos duas vezes em água a 60 °C por 30 min e filtrados a vácuo em tecido de algodão. Os sobrenadantes etanólicos e os filtrados aquosos foram reunidos, concentrados em evaporador rotatório e o extrato final (extrato bruto), submetido à precipitação a frio com três volumes de etanol, para separação das frações de fruto-oligo (sobrenadante) e polissacarídeos (precipitado) após centrifugação a 2900 g por 10 min a 5 °C. O sobrenadante, contendo a fração de fruto-oligossacarídeos foi concentrado em evaporador rotatório para a retirada de etanol, e o precipitado, que consistiu da fração de polissacarídeos, foi ressuspenso e solubilizado em água.

Análise quantitativa e qualitativa dos frutanos

Os conteúdos de frutose livre e ligada foram determinados no extrato bruto e nas frações de fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos, separadamente, pelo método de antrona modificado (Jermyn 1956) para cetoses. Os teores de frutanos foram estimados com base em uma reta padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de frutose.

Para as análises qualitativas, amostras de fruto-oligossacarídeos, constituídas de alíquotas equivalentes de cada uma das três replicatas foram submetidas à deionização em colunas de troca iônica contendo resinas nas formas catiônicas (Dowex 50 WX8 - 100) e aniônica (Dowex 1 X 8 - 100) (Carvalho & Dietrich 1993). Em seguida foram filtradas em membranas de 0,45 μm e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex modelo DX-300, utilizando-se coluna Carbo Pac PA1 (4 x 250 mm) e concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, conforme Carvalho *et al.* (1997). Utilizou-se como padrão uma mistura de fruto-oligossacarídeos extraída de tubérculos de *H. tuberosus*. A eluição dos carboidratos presentes nas amostras de fruto-oligossacarídeos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura dos eluentes A (150 mM de hidróxido de sódio) e 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 E1 (480 ms), E2 (180 ms) e E3 (360 ms) foram 0,05; 0,75 e -0,20, respectivamente e o fluxo aplicado foi de 1 mL min^{-1} .

Resultados

Durante o período experimental, a temperatura média do ar no interior da casa de vegetação foi de 30 °C, com máxima de 36 °C e mínima de 28 °C. A umidade relativa (UR) média do ar foi 70%, com máxima de 91% e mínima de 50%.

A umidade do solo manteve-se praticamente constante no controle, com valores superiores a 35% durante todo o experimento. Por outro lado, a suspensão de rega proporcionou valores de umidade do solo inferiores a 20%, alcançados aos 15 dias após a suspensão. A manutenção da suspensão de rega até os 23 dias não gerou variações na umidade do solo após o 15º dia. Os solos que receberam água aos 15 dias de experimento apresentaram valores semelhantes aos do controle aos 17 e 23 dias (Figura 1A).

O potencial hídrico apresentou decréscimo acentuado nos solos das plantas sob déficit hídrico a partir do 7º dia de experimento e o menor valor de $\Psi_{w\text{ solo}}$, de aproximadamente -5,0 MPa, observado aos 15 dias após a suspensão de rega, ocorreu concomitante aos menores valores de umidade do solo. No controle, o $\Psi_{w\text{ solo}}$ manteve-se constante durante todo experimento com valores de, no mínimo, -0,5 MPa (Figura 1B).

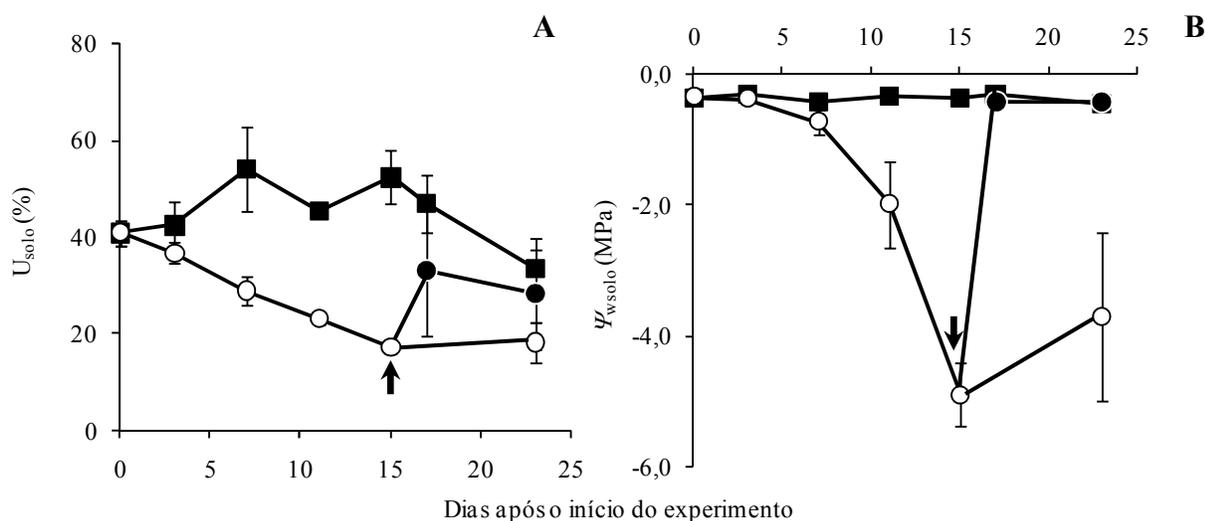


Figura 1 – Medidas de umidade (U_{solo}) (A) e potencial hídrico do solo ($\Psi_{w\text{ solo}}$) (B) dos vasos submetidos à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

A figura 2 mostra que o teor de umidade da parte aérea e do rizóforo nas plantas controle não sofreu alteração durante o período experimental. Já as plantas submetidas à suspensão de rega apresentaram reduções no teor de umidade a partir do 11º dia de experimento. No 23º dia de

suspensão de rega, a parte aérea apresentou redução de aproximadamente 36% e os rizóforos de 22% em relação ao teor de umidade inicial. No 17º dia, dois dias após a re-irrigação, houve uma recuperação do conteúdo de água dessas plantas, que voltou a atingir valores semelhantes aos das plantas controle.

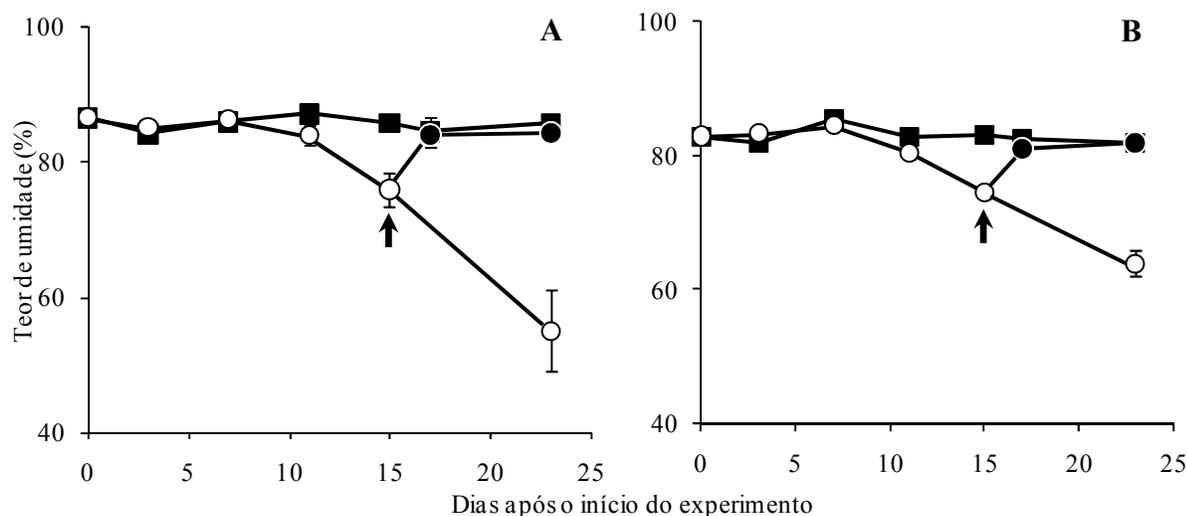


Figura 2 – Teor de umidade (%) da parte aérea (A) e do rizóforo (B) de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Até o 15º dia de tratamento, as plantas mantidas sob déficit hídrico apresentaram uma porcentagem de sobrevivência de 100%. Mas apresentaram sinais de murcha em suas folhas e rizóforos, recuperando, entretanto, seu aspecto normal aos 17 dias de experimento, dois dias após a re-irrigação dos vasos. Aos 23 dias de experimento, as plantas mantidas sob suspensão de rega, passaram a apresentar folhas secas e sinais de senescência (Figuras 3 e 4).



Figura 3 - Plantas de *Vernonia herbacea*, 17 dias após o início do experimento e dois dias após a re-irrigação. A partir da esquerda: planta controle, em suspensão de rega e re-irrigada.



Figura 4 - Plantas de *Vernonia herbacea* 23 dias após o início do experimento e oito dias após a re-irrigação. A partir da esquerda: planta controle, em suspensão de rega e re-irrigada.

Durante os primeiros 7 dias, o potencial hídrico das folhas apresentou um ligeiro aumento em ambas as condições experimentais a que foram submetidas as plantas, seguido de uma diminuição entre o 7º e o 15º dias de experimento nas plantas tratadas. Os valores mantiveram-se praticamente constantes nas plantas controle até o final do período experimental (Figura 5).

O déficit hídrico imposto às plantas pela suspensão da rega foi suficiente para gerar um potencial hídrico da ordem de $-2,0$ MPa nas folhas (Figura 5) e de $-5,5$ no solo (Figura 1B), valores esses obtidos no 15º dia após o início do experimento. Tais valores estão relacionados a conteúdos de água de aproximadamente 75% tanto nas folhas como nos rizóforos (Figura 2B) e de 17% no solo (Figura 1A).

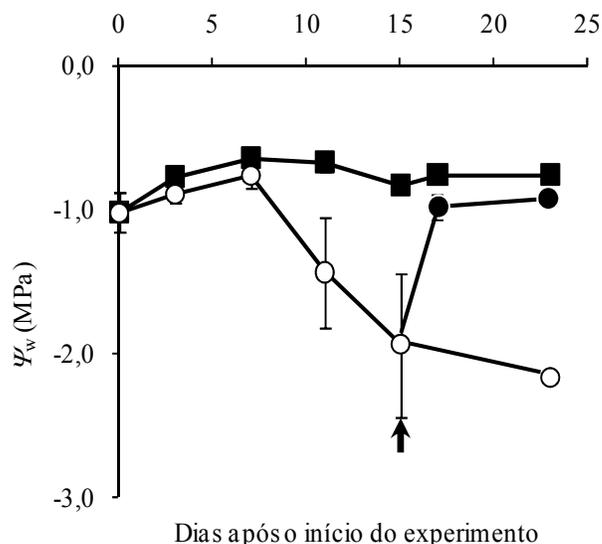


Figura 5 – Medidas de potencial hídrico (Ψ_w) das folhas de plantas de *Vernonia herbacea* submetidos à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). A seta indica o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

A figura 6 mostra a atividade específica das enzimas do metabolismo de frutanos. No início do experimento, a maior atividade enzimática foi a da FFT, seguida da SST, FEH e invertase.

Nas plantas controle, a SST apresentou as menores variações em sua atividade durante todo o período experimental nas plantas controle. Nas plantas mantidas sob suspensão de rega, ocorreu um aumento nítido dessa atividade no 7º dia de experimento, seguida de uma queda no 11º dia, após o qual esta se manteve estável até o final do período experimental. Após o fornecimento de água, aos 15 dias, ocorreu um pequeno aumento da atividade dessa enzima aos 17 e 23 dias de experimento. Nas plantas submetidas à suspensão de rega até o 23º dia, a atividade da SST manteve-se baixa e inferior à atividade nas plantas controle (Figura 6A).

A atividade da FFT apresentou um perfil semelhante ao da SST, com um aumento no 7º dia do experimento tanto nas plantas controle como nas tratadas, embora nas últimas este aumento tenha sido mais pronunciado. Após a re-irrigação, a exemplo da SST, houve um pequeno aumento da atividade aos 17 e 23 dias de experimento (Figura 6B).

A atividade da FEH diminuiu em ambos os grupos de plantas até o 15º dia, embora nas plantas tratadas a diminuição tenha sido mais pronunciada desde o 3º dia do experimento. Após a re-irrigação, a FEH apresentou um aumento de atividade mais acentuado do que o observado nas

plantas controle, seguido de diminuição até o 23º dia. Nas plantas sob suspensão de rega, a atividade da FEH apresentou um aumento bastante pronunciado entre o 15º e 23º dia (Figura 6C).

A atividade da invertase foi inicialmente baixa e não apresentou diferenças entre os tratamentos até o 7º dia, a partir do qual apresentou aumento nas plantas mantidas em suspensão de rega. Nas plantas que foram re-irrigadas, a atividade dessa enzima diminuiu após a re-irrigação, apresentando valores próximos aos do controle (Figura 6D).

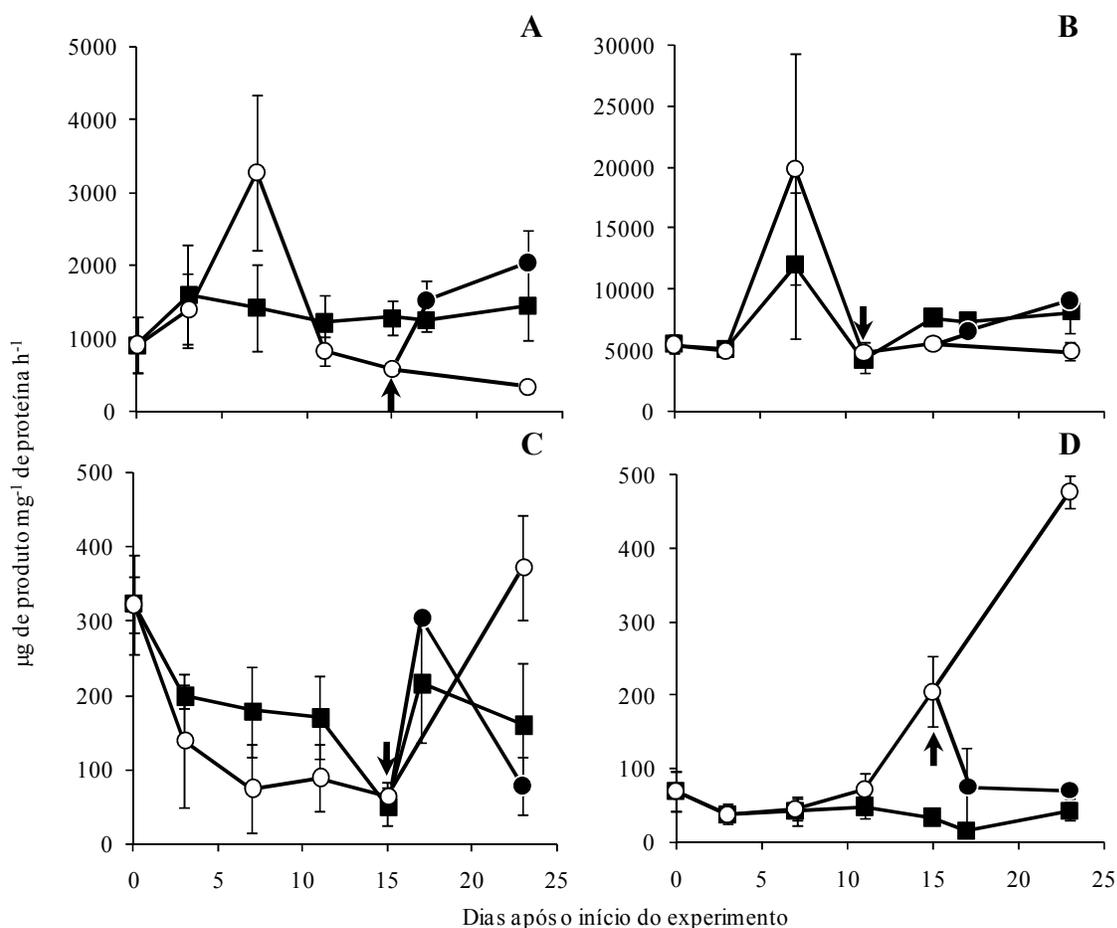


Figura 6 - Atividade de SST (A), FFT (B), FEH (C) e invertase (D) em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

O conteúdo total de frutanos apresentou, de maneira geral, queda durante o período experimental tanto nos rizóforos de plantas tratadas quanto nas plantas controle (Figura 7A). O conteúdo de fruto-oligosacarídeos de plantas controle apresentou um aumento no 3º dia, seguido de diminuição no 7º dia, apresentando pequenas variações até o final do experimento. Os fruto-

oligossacarídeos dos rizóforos tratados apresentaram aumento semelhante ao das plantas controle até o 3º dia. Entretanto, diferentemente destas, o conteúdo de oligossacarídeos das plantas sob suspensão de rega continuou aumentando até o 11º dia, apresentou diminuição marcante até o 15º dia, após o qual se manteve praticamente constante (Figura 7B). A re-irrigação também não causou alterações no conteúdo de oligossacarídeos quando os valores foram comparados com as plantas controle e plantas sob suspensão de rega. O conteúdo de fruto-polissacarídeos sofreu decréscimo do início do experimento até o 7º dia, após o qual se manteve relativamente constante tanto nos rizóforos de plantas tratadas quanto nas plantas controle (Figura 7C). Pela análise do conteúdo de frutano total dos rizóforos de plantas tratadas observa-se uma maior tendência de queda se comparado aos rizóforos do controle refletindo o observado nos teores de polissacarídeos (Figura 7A e C). O aumento ocorrido entre 7 e 11 dias nos rizóforos de plantas controle pode ser observado, também, nas suas frações de fruto-oligo e polissacarídeos.

Acompanhando as variações nas concentrações de frutanos durante o período experimental (Figura 8), foram verificadas algumas variações na razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos. Houve um aumento inicial desta razão tanto nos rizóforos das plantas do controle quanto nos de plantas tratadas até o 3º dia. Verificou-se um aumento pronunciado desta razão nas plantas submetidas à suspensão de regas entre o 3º e o 7º dias e entre o 15º e 23º dias. Entre o 15º e o 23º dias o aumento foi maior nas plantas sob suspensão de rega, intermediário nas plantas re-irrigadas e inferior nas plantas controle (Figura 8).

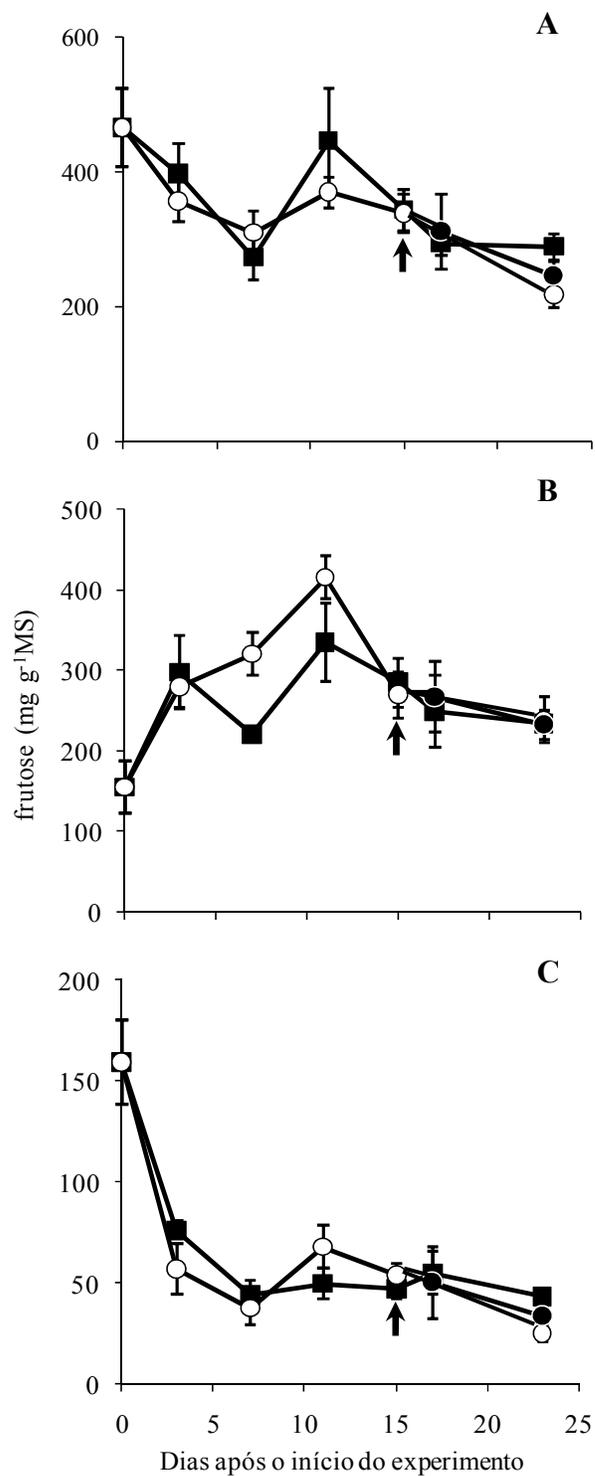


Figura 7 - Conteúdo de frutano total (A), fruto-oligosacarídeos (B) e fruto-polissacarídeos (C) extraídos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidos à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

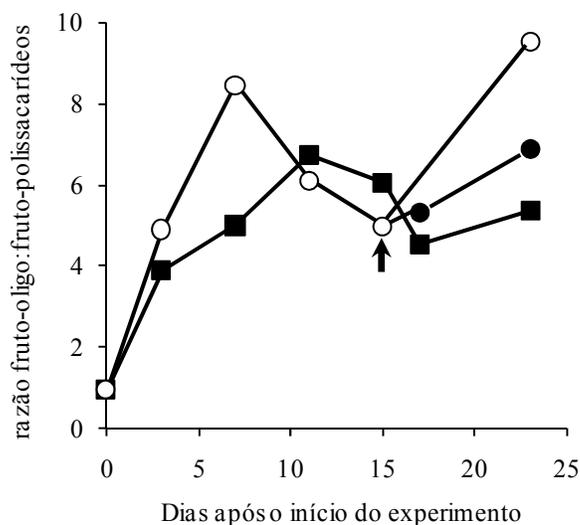


Figura 8 – Razão entre os fruto-oligosacarídeos e fruto-polissacarídeos extraídos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidos à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). A seta indica o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

O conteúdo de açúcar redutor nos rizóforos das plantas foi em geral baixo durante todo o período experimental. Entretanto, após o 7º dia, as plantas submetidas à suspensão de rega passaram a apresentar conteúdos mais elevados destes açúcares até o 23º dia (Figura 9). Após o 15º dia, as plantas que foram re-irrigadas tiveram seu conteúdo de açúcar redutor diminuído, em relação àquelas que permaneceram sob déficit hídrico, até valores encontrados nas plantas controle (Figura 9).

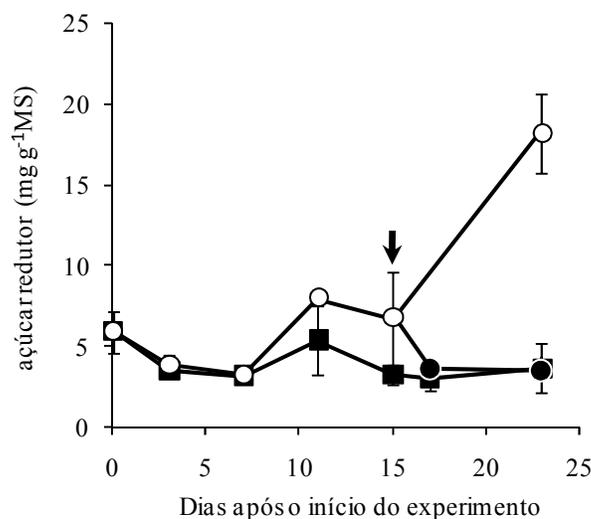


Figura 9 – Conteúdo de açúcar redutor nos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidos à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). A seta indica o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

As análises qualitativas das frações de fruto-oligossacarídeos por cromatografia de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD) são mostradas na figura 10. Além da glucose, frutose e sacarose, todos os membros da série da inulina foram detectados em todos os extratos analisados. Observamos que nas frações das plantas controle não houve diferenças notáveis no perfil dos oligossacarídeos ao longo do período experimental. Nas plantas mantidas sob deficiência hídrica porém, houve, aos 23 dias, um nítido aumento na proporção dos monossacarídeos glucose e frutose e da sacarose em relação aos fruto-oligossacarídeos. Nas plantas tratadas que foram re-irrigadas, observamos, aos 17 dias, além de um aumento da sacarose, um aumento na proporção da 1-cestose e da nistose em relação aos demais membros da série da inulina e em relação ao controle.

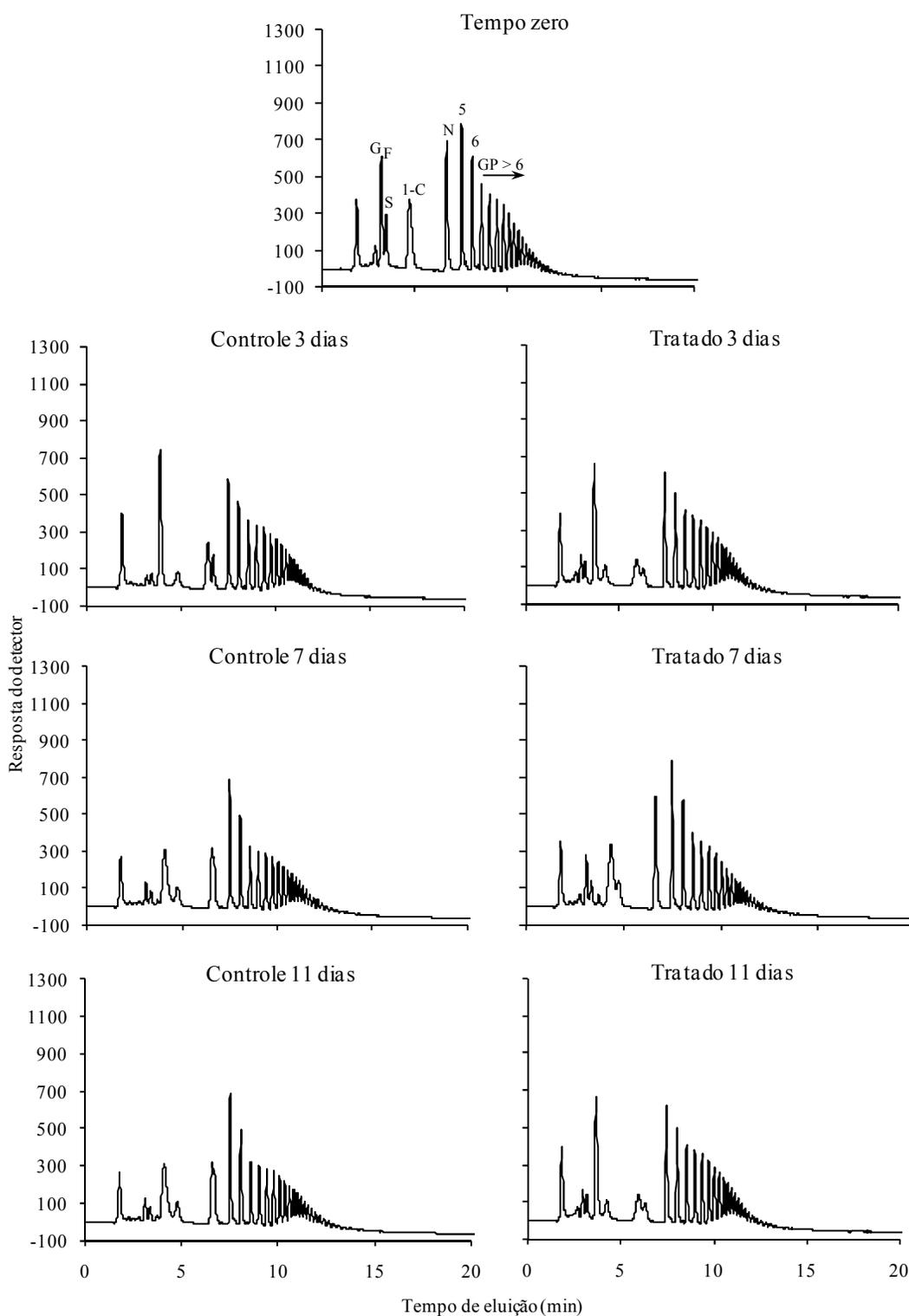


Figura 10 - Cromatografia de troca aniônica de alta resolução dos fruto-oligosacarídeos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea*. G: glucose; F: Frutose; S: Sacarose; 1-C: 1-cestose, N: Nistose. Os números correspondem ao grau de polimerização dos oligossacarídeos e GP>6 aos frutanos com grau de polimerização maior que 6.

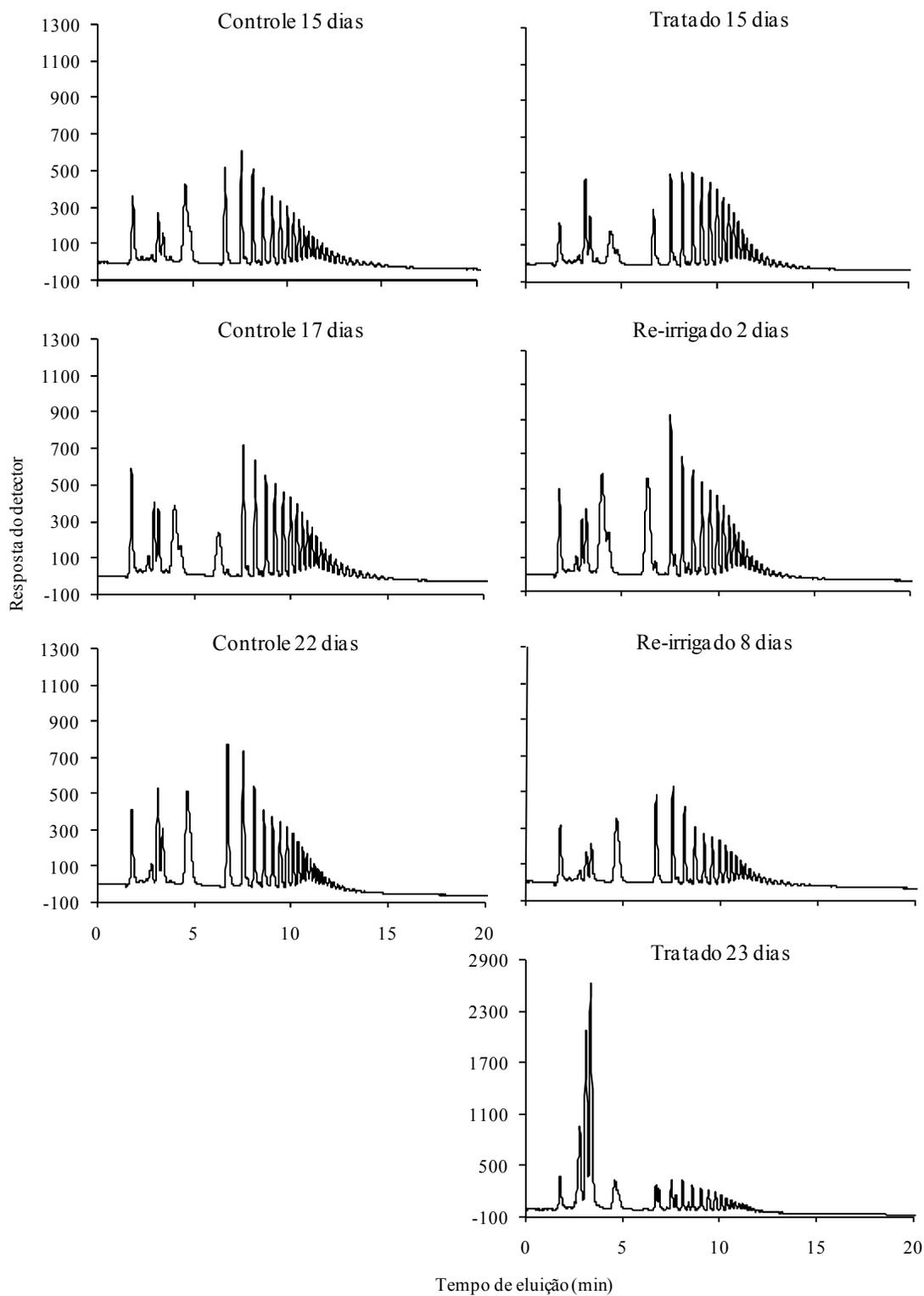


Figura 10 – continuação.

Discussão

No presente trabalho, verificou-se que o método de aplicação do estresse hídrico pela suspensão total da rega permitiu o desenvolvimento do déficit hídrico nas plantas de *V. herbacea*, como indicado pelas medidas dos teores de umidade de folhas e rizóforos e do potencial hídrico das folhas, os quais por sua vez apresentaram estreita relação com as variações na umidade e potencial hídrico do solo. A manutenção da suspensão de rega até os 23 dias não gerou variações na umidade do solo após o 15º dia, sugerindo o alcance do ponto de murcha permanente (Kramer 1995).

Em trabalho realizado anteriormente, no qual plantas de *V. herbacea* foram submetidas à suspensão de rega, Dias-Tagliacozzo *et al.* (2004) demonstraram que essas plantas são capazes de reter água nos seus órgãos subterrâneos de reserva por longos períodos, mesmo após a diminuição no conteúdo de água no solo. No presente trabalho, a manutenção da turgescência tanto da parte aérea quanto do rizóforo até o 11º dia de experimento demonstra essa capacidade de retenção de água, principalmente nos rizóforos, cuja diminuição do conteúdo de água, após esse período, foi mais lenta que a do solo.

Após a re-irrigação, realizada no 15º dia do experimento, as plantas recuperaram o conteúdo de água e passaram a apresentar teores de umidade de folhas e rizóforos semelhantes aos das plantas controle, demonstrando uma capacidade de reidratação dos tecidos e permitindo a recuperação dos valores de potencial hídrico apresentados.

Os valores médios de atividade enzimática *in vitro* apresentados no presente trabalho condizem com os encontrados por Asega & Carvalho (2004), com ordem decrescente de atividade a partir da FFT seguida de SST, FEH e invertase. O aumento pontual de atividade da SST e da FFT verificado aos 7 dias, nas plantas mantidas sob suspensão de rega, coincidiu com o início da diminuição do potencial hídrico do solo dessas plantas e pode ter ocorrido em resposta a essa sinalização. Ao mesmo tempo, a partir do dia 7, o potencial hídrico das folhas das plantas tratadas passou a apresentar uma diminuição gradual. Entretanto, os conteúdos de água nas folhas e rizóforos ainda apresentavam valores elevados, passando a sofrer uma queda pouco acentuada a partir do mesmo ponto de amostragem.

Adicionalmente, aos 7 dias, foi detectada uma maior quantidade de fruto-oligossacarídeos nas plantas tratadas, refletindo numa maior razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos. A SST é a enzima que dá início à síntese de frutanos (Van den Ende & Van Laere 1996) e a FFT é

responsável pelo padrão de distribuição do comprimento das cadeias de inulina (Hellwege *et al.* 1998). O aumento da atividade dessas enzimas nas plantas tratadas sugere sua atuação na síntese de frutanos de baixo peso molecular, que por sua vez podem ter atuado na diminuição do potencial hídrico e na manutenção de conteúdos elevados de água.

Valores inferiores de atividade da FEH apresentado pelas plantas sob suspensão de rega entre 3 e 11 dias, quando comparados aos das plantas controle, sugerem uma parada temporária no crescimento dessas plantas, causada pela baixa disponibilidade de água.

Conforme demonstrado por Asega & Carvalho (2004), o aumento da atividade de FEH ocorre, em geral, após a diminuição da atividade da SST. Em plantas submetidas à deficiência hídrica, um aumento da atividade da FEH foi observado aos 23 dias do início do experimento, concomitante a uma diminuição da atividade da SST. Desse modo, a hipótese do controle temporal das enzimas do metabolismo de frutanos que estão no mesmo compartimento, o vacúolo (Frehner *et al.* 1984), é reforçada.

Estudos realizados com plantas intactas e rizóforos isolados de *V. herbacea* mostraram que a deficiência de água promoveu um aumento de frutose livre e de oligossacarídeos com baixos pesos moleculares nos tecidos (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004), sugerindo aumento da atividade da FEH com liberação de frutose. No presente trabalho, o aumento da atividade de FEH aos 23 dias foi concomitante ao aumento da quantidade de açúcar redutor nas plantas tratadas, reforçando a hipótese de que o aumento de açúcares livres pela ação da FEH em *V. herbacea* está relacionado à tolerância dessas plantas ao déficit hídrico.

De fato, o acúmulo ou síntese de solutos pode contribuir para a diminuição do potencial osmótico da célula e permitir que a mesma mantenha-se túrgida, sendo que os carboidratos mais eficientes na diminuição do potencial osmótico são as hexoses e a sacarose. Como os frutanos podem ser rapidamente mobilizados a frutose e sacarose, esses compostos podem atuar como reguladores osmóticos, garantindo sobrevivência e até o crescimento da planta sob deficiência hídrica (Spolen & Nelson 1994).

Pilon-Smits *et al.* (1995), introduzindo um gene para a síntese de frutanos em plantas de tabaco, não produtora desses carboidratos de reserva, obteve plantas resistentes ao estresse hídrico. Resultados semelhantes foram obtidos com beterrabas transgênicas (Pilon-Smits *et al.* 1999). Plantas de trigo (Virgona & Barlow 1991, Wardlaw & Willenbrink 2000, Yang *et al.* 2004), de chicória (Van den Ende *et al.* 1998) e gramíneas do gênero *Festuca* (Spolen & Nelson

1994, Clark *et al.* 2004) submetidas ao déficit hídrico, apresentaram aumento no conteúdo de açúcares de baixo peso molecular, principalmente a frutose.

Segundo Valluru & Van den Ende (2008), o acúmulo de frutanos de baixo grau de polimerização em condições de estresse ocorre tanto pela atividade de síntese destes compostos quanto pela degradação parcial das moléculas acumuladas anteriormente. Neste trabalho, o aumento pronunciado da razão oligo: polissacarídeos foi concomitante ao aumento da atividade *in vitro* da FEH e da invertase, verificado aos 23 dias. Verificou-se, também, um aumento dessa razão nos 3^o e 7^o dias após a suspensão da rega, porém, ao contrário do ocorrido aos 23 dias, esse aumento provavelmente foi resultado da atividade de síntese de moléculas de baixo peso molecular, já que, neste período, as enzimas de síntese apresentavam atividade mais elevada.

Nas plantas tratadas que foram re-irrigadas, o aumento relativo da sacarose e da proporção da 1-cestose e da nistose em relação aos demais membros da série da inulina aos 17 dias, ocorreu concomitantemente a um aumento relativo da atividade das duas frutossiltransferases e da hidrolase. Embora se saiba que a FEH e a SST apresentam atividades aumentadas em fases diferentes do desenvolvimento das plantas, há relatos na literatura da participação da FEH durante o processo de biossíntese de frutanos. Em trigo, por exemplo, a FEH controla o alongamento das ramificações das moléculas de frutanos durante a biossíntese desses compostos (“*triming process*”) (Van de Ende *et al.* 2003). Em *Lolium temulentum* L. que sofreram excisão das folhas (Cairns *et al.* 1997) e *Smallanthus sonchifolius* (Poep.) H. Rob. em crescimento (Itaya *et al.* 2002) foram encontradas atividades concomitantes de FEH e SST. Desse modo, podemos supor uma atuação da FEH, junto às frutossiltransferases, na redistribuição das moléculas de frutanos em *V. herbacea*.

Os resultados obtidos sugerem fortemente o envolvimento dos frutanos no aumento da tolerância à falta de água, uma vez que as plantas tratadas apresentaram aumento dos fruto-oligosacarídeos, principalmente os de menor grau de polimerização, da frutose e da glucose, observado através da cromatografia de troca aniônica de alta resolução e do conteúdo de açúcar redutor, às expensas deste carboidrato de reserva. O aumento desses açúcares de baixo peso molecular nos rizóforos sugere a ocorrência de uma adaptação osmótica e consequente proteção contra a desidratação.

Como *V. herbacea* é uma espécie de cerrado, e este bioma está sujeito a períodos de seca durante o ano (Eiten 1972), mudanças no metabolismo de frutanos, conforme observado no presente estudo, indicam o envolvimento desses compostos nos processos de retenção de água,

como estratégia adaptativa dessa espécie a condições ambientais adversas e, em particular, à restrição hídrica.

Referências Bibliográficas

- Aires, M.M.** 1991. Fisiologia renal. *In*: M.M. Aires (ed.). Fisiologia, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 495-583.
- 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., Nascimento, J.R.O., Schroeven, L., Van den Ende, W. & Carvalho, M.A.M.** 2008. Cloning, Characterization and Functional Analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Cell Physiology* 49: 1185–1195.
- Blake, G.R.** 1965. Bulk density. *In*: C.A. Black, D.D. Evans, J.L. White, L.E. Ensminger & F.E. Clark, (eds.). *Methods of soil analysis* American Society of Agronomy, Madison, pp. 374-390.
- 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.
- Cairns, A.J., Bonnett, G.D., Gallacher, J.A., Simpsons, R.J., Pollock, C.J.** 1997. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum*. VII. Sucrose and fructan hydrolysis by a fructan-polymerizing enzyme preparation. *New Phytologist* 136: 61-72.
- Carvalho, M.A.M., Asega, A.F. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2007. Fructans in Asteraceae from the Brazilian cerrado. *In*: N. Shiomi, N. Benkeblia & S. Onodera (eds.). *Recent advances in fucto-oligosaccharides research*. Research Signpost. Trivandrum, Índia, pp. 69-91.
- Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.C.** 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 dietetica en Iberoamérica: Tecnologia y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos*. Projeto CYTED XI.6, Varela, São Paulo, pp. 77-90.
- 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: 281-285.
- 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.
- Clark, G.T., Zuther, E., Outred, H.A., McManus, M.T. & Heyer, A.G.** 2004. Tissue-specific changes in remobilization of fructan in the xerophytic tussock species *Festuca novae-zelandiae* in response to a water deficit. *Functional Plant Biology* 31: 377-389.

- Cuzzuol, G.R.F., Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P.** 2008. Fructan production in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby is related to adequate nitrogen supply and period of cultivation. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 95-103.
- De Coninck, B., Van den Ende, W. & Le Roy, K.** 2007. Fructan exohydrolases (FEHs) in plants: properties, occurrence and 3-D structure. *In: N. Shiomi, N. Benkeblia & S. Onodera (eds.). Recent advances in fucto-oligosaccharides research. Research Signpost. Trivandrum, Índia, pp. 157–180.*
- De Roover, J., Vandenbranden, K. Van Laere, A. & Van den Ende, W.** 2000. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Chicorium intybus* L.). *Planta* 210: 808-814.
- 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 Biology and Technology* 47: 363-373.
- Edelman, J. & Jefford, T. G.** 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* 67: 517-531.
- Eiten, G.** 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38: 201-341.
- Frehner, M., Keller, F. & Wienken, 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.
- Goudriaan, J. & Van Laar, H.H.** 1994. Modelling potential crop growth processes. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.
- Hellwege, E.M., Czaplá, S., Jahnke, A., Willmitzer, L. & Heyer, A.G.** 2000. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proceeding of the National Academy of Sciences U.S.A.* 97: 8699-8704.
- Hellwege, E.M., Raap, M., Gritscher, D., Willmitzer, L., & Heyer, A G.** 1998. Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected 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.*

- Itaya, N.M., Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). *Physiologia Plantarum* 116: 451-459.
- Jermyn, M.A.** 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature* 177: 38-39.
- Kerepesi, I., Galiba, G. & Bányai, E.** 1998. Osmotic and salt stresses induced differential alteration in water-soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 5347-5354.
- 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
- Kramer, P.J.** 1995. Water relations of plants and soils. Academic Press, London.
- Livingston, D.P. & Henson, C.A.** 1998. Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiology* 116: 403-408.
- Lüscher, M., Erdin C., Sprenger, N., Hochstrasser, U., Bollert, T. & Wiemkem, A.** 1996. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Letters* 385: 39-42.
- Meier, H. & Reid, J.S.G.** 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. *In: F.A. Loewus, W. Tanner* (eds.). *Encyclopedia of plant Physiology - Plant Carbohydrates I*. Springer-Verlag, Heidelberg 13A: 417-418.
- 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.
- Pollock, C. J., Cairns, A.J., Sims, I.M. & Housley, T.L.** 1996. Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. *In: E. Zamski & A.A. Shaffer* (eds.). *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source - Sink Relationships*, Marcel Dekker Inc, New York, pp. 97-113.
- Roberfroid, M.B.** 1993. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33: 103-148.
- Roberfroid MB, Bornet F, Bouley C & Cummings JH.** 1995. Colonic microflora: nutrition and health. *Nutrition Review* 53: 127-130.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-63.

- Spollen, W.G. & Nelson, C.J.** 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* 106: 329-336.
- Taper, H. Lemort, C. & Roberfroid, M.B.** 1999. Inhibition of dietary inulin and oligofructose on the growth of transplantable mouse tumor. *Anticancer Research* 18: 4123-4126.
- Valluru, R. & Van den Ende, W.** 2008. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany* 59: 2905-2916.
- 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., 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., De Roover, J., Verhaert, 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., Van Hoenacker, G., Moors, S. & Van Laere, A.** 1998. Effect of osmolytes on the fructan pattern in feeder roots produced during forcing of chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology* 153: 290-298.
- 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.
- Vergawen, 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 Physiology* 133: 391-401.
- Virgona, J.M. & Barlow, E.W.R.** 1991. Drought stress induces changes in the non-structural carbohydrate composition of wheat stems. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 239-247.
- Volaire, F. & Lelièvre, F.** 1997. Production, persistence, and water-soluble carbohydrate accumulation in 21 contrasting populations of *Dactylis glomerata* L. subjected to severe drought stress in the south of France. *Australian Journal of Agricultural Research* 48: 933-944.
- Wardlaw, I.F., Willenbrink, J.** 2000. Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. *New Phytologist* 148: 413-422.
- Yamasaki, H. & Matsumoto, K.** 1993. Production of fructo-oligosaccharides-rich fructose syrup. *In: A. Fuchs* (ed.). *Inulin and Inulin-Containing Crops*, Elsevier, Amsterdam, pp. 355-357.

Yang, J., Zhang, J, Wang, Z., Zhu, Q. & Liu, L. 2004. Activities of fructan and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* 220: 331-343.

CAPÍTULO II

**Efeito do déficit hídrico em plantas submetidas à
suspensão de rega. II**

Resumo

Os frutanos são amplamente distribuídos entre as plantas vasculares e são os carboidratos de reserva mais importantes depois do amido e da sacarose. Consistem de séries homólogas de oligo e polissacarídeos não redutores, formados por resíduos de frutose ligados à molécula de sacarose. O alto teor de frutanos encontrado em sistemas subterrâneos de espécies do cerrado sugere, aliado ao fato desses carboidratos serem altamente solúveis e rapidamente mobilizados ou sintetizados, que esses compostos atuam não só como reserva de carbono e energia, mas também contribuindo para a adaptação dessas plantas que atravessam condições ambientais desfavoráveis durante o ciclo de desenvolvimento. *Vernonia herbacea* é uma dessas espécie, cujas plantas acumulam cerca de 80% de inulina nos órgãos subterrâneos (rizóforos). O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição e o metabolismo de frutanos em plantas submetidas à restrição hídrica por suspensão de rega. As plantas foram divididas em 3 lotes que receberam 3 tratamentos: rega diária (controle), suspensão de rega por 22 dias (tratado) e suspensão de rega com re-irrigação no 10º dia (re-irrigado). As coletas foram realizadas no início do experimento e após, 3, 7, 10, 12, 17 e 22 dias após a suspensão da rega. Nas plantas mantidas em suspensão de rega, a limitação estomática levou à redução da condutância, diminuindo a fotossíntese e a transpiração e mantendo a eficiência do uso da água. O alto teor de prolina presente nas plantas sob déficit hídrico sugere que esse aminoácido tenha atuado na osmorregulação ou na sinalização e regulação de outras respostas. Sob déficit hídrico, a frutano-exoidrolase e a invertase promoveram a degradação de frutanos e sacarose e, juntamente com as frutossiltransferases, contribuíram para a redistribuição dos comprimentos das moléculas de frutanos, visando à produção de moléculas de baixo grau de polimerização. As plantas tratadas apresentaram maior conteúdo de fruto-oligossacarídeos e açúcar redutor, compostos ativos na regulação osmótica e proteção de estruturas celulares. Após a re-irrigação, as plantas apresentaram parâmetros semelhantes aos do controle. As plantas submetidas à suspensão de rega apresentaram alterações em seu metabolismo, possibilitando aos tecidos uma baixa perda de água durante a suspensão de rega e uma rápida reabsorção de água após a re-irrigação, reforçando a hipótese de que os frutanos atuam na adaptação de *V. herbacea* a estresses abióticos.

Palavras-chave: déficit hídrico, frutanos, *Vernonia herbacea*.

Abstract

Fructans are widely distributed among vascular plants and have been regarded as second to starch and sucrose in importance as a storage carbohydrate. They consist of homologous series of non-reducing oligo and polysaccharides, each containing fructose units bound to a sucrose molecule. The high fructan contents found in underground systems of cerrado species, their high water solubility and fast metabolism, suggest that these compounds play a role not only as storage of carbon and energy but also as a contributor to adaptive features in these plants which undergo unfavorable environmental conditions. *Vernonia herbacea* is one of this species and the plants accumulate about 80% of inulin in the underground organs (rhizophores). The aim of this work was to analyze the fructan composition and metabolism in plants submitted to complete suspension of irrigation. The plants were divided into 3 groups, receiving 3 treatments: daily watering (control), suspension of irrigation for 22 days (treated) and suspension of irrigation and rewatering after 15 days (re-irrigated). Samplings were done at the beginning of experiment and after 3, 7, 10, 12, 17 and 22 days after suspension of irrigation. In plants kept under suspension of irrigation, the stomatal limitation led to a reduction in conductance, photosynthesis and transpiration and maintenance of intrinsic water use efficiency. The high content of proline detected in plants under water deficit may have acted in osmoregulation or in the signaling and regulation of other responses. Under lack of water, fructan-exohidrolase and invertase acted in fructan mobilization and, along with the fructosyltransferases in the redistribution of fructan molecule sizes, targeting the production of molecules of low degree of polymerization. Treated plants presented higher contents of oligosaccharides and reducing sugars, which may have acted in the osmotic regulation and protection of cellular structures. After re-irrigation, the plants presented similar values of the parameters as detected in control plants. Thus, the assumption that fructans act in the adaptation of *V. herbacea* to abiotic stresses seems consistent, since the plants subject to the suspension of irrigation showed changes in fructan metabolism, allowing tissues to a low loss of water during the suspension of irrigation and rapid absorption of water after re-irrigation of plants.

Key words: fructans, *Vernonia herbacea*, water deficit.

Introdução

Durante seu ciclo de vida, as plantas nem sempre encontram condições ambientais em que todos os fatores sejam favoráveis ao seu crescimento e desenvolvimento. Um importante fator ambiental que limita o crescimento é a redução da disponibilidade de água no solo, que pode levar ao estresse hídrico. O estresse hídrico ocorre geralmente de maneira gradual e as plantas tolerantes apresentam mecanismos para se adaptarem às condições de baixa disponibilidade de água no solo.

O estresse hídrico afeta muitos processos fisiológicos e bioquímicos das plantas (Hanson & Hitz 1982), resultando na alteração de algumas vias metabólicas. Entre os efeitos mais importantes estão os que envolvem o metabolismo de carboidratos, como o acúmulo de açúcares e alguns outros solutos orgânicos, chamados de solutos compatíveis, em um processo conhecido como ajuste osmótico (Iljin 1957, Bajji *et al.* 2001).

O acúmulo intracelular de solutos osmoticamente ativos em resposta às condições estressantes de baixa disponibilidade de água é um mecanismo importante em plantas tolerantes a seca e com baixo potencial hídrico (Turner 1986). Este mecanismo, denominado ajuste osmótico (Munns 1988), é verificado em várias espécies (Morgan 1984) e considerado um dos mais eficazes para manutenção da turgescência celular, permitindo principalmente a manutenção da abertura estomática e da fotossíntese sob condições de baixo potencial hídrico no solo (Lawlor & Leach 1985, Turner 1986, Funkhouser *et al.* 1994, Kramer 1995). Embora o ajuste osmótico não impeça a redução da taxa fotossintética sob condições de estresse hídrico (Jones & Rawson 1979), a manutenção da turgescência permite que a fotossíntese e outras atividades fisiológicas importantes sejam mantidas, mesmo que baixas, possibilitando a redistribuição de carbono e nitrogênio na planta (Kobata *et al.* 1992, Palta *et al.* 1994).

Muitos compostos são sintetizados sob condições de déficit hídrico que permitem à planta manter o equilíbrio osmótico e proteger a membrana celular e as macromoléculas. Esses compostos incluem íons inorgânicos, aminoácidos como a prolina e o glutamato, amônio-quaternários como a glicina-betaina e carboidratos de baixo peso molecular como os açúcares alcoóis manitol, sorbitol, polióis cíclicos, oligos e polissacarídeos como a sacarose e os frutanos. Esses compostos ajudam a célula a manter seu estado hidratado e, então, promovem resistência contra a seca e a desidratação celular, além de atuarem na estabilização de macromoléculas e na

eliminação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Hoekstra *et al.* 2001, Ramanjulu *et al.* 2002, Zidenga 2006, Mahajan & Tuteja 2006).

Os frutanos são formados por adições sucessivas de unidades de frutose com diferentes tipos de ligações a três trissacarídeos (1-cestose, 6-cestose e neocestose) que, por sua vez, são sintetizados pela ligação de um resíduo de frutose a diferentes grupos hidroxila da sacarose. A inulina, encontrada principalmente em Asteraceae, contém ligações β (2,1) e é baseada no trissacarídeo 1-cestose; o levano ou fleano, presente em Poaceae, consiste de ligações β (2,6) e é baseado na 6-cestose; o frutano baseado no trissacarídeo neocestose, com ligações β (2,1) ou β (2,6), no qual o resíduo de glucose é interno à molécula, encontrado em Liliaceae e Poaceae. Outros tipos de frutanos mais complexos e ramificados são encontrados principalmente em monocotiledôneas (Pollock *et al.* 1996).

Segundo modelo proposto por Edelman & Jefford (1968), para tubérculos de *Helianthus tuberosus* L., a síntese da inulina se dá pela atuação de duas enzimas distintas. Inicialmente ocorre a formação do trissacarídeo 1-cestose e a liberação de uma molécula de glucose a partir de duas moléculas de sacarose, pela ação da sacarose:sacarose frutossil transferase (SST). Em seguida, a frutano:frutano frutossil transferase (FFT) catalisa o alongamento da cadeia pela transferência de resíduos de frutose de uma molécula doadora para uma receptora. A hidrólise de frutanos ocorre pela remoção seqüencial das unidades terminais de frutose por uma frutano exohidrolase (FEH). Esta enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose. (Edelman & Jefford 1968, Koops & Jonker 1996, Lüscher *et al.* 1996, Van den Ende & Van Laere 1996).

Os frutanos apresentam outras funções além de constituir fonte de energia ou de carbono de reserva para as plantas. Eles também parecem estar relacionados à tolerância de algumas espécies sujeitas aos estresses ambientais neste ambiente, onde pode haver secas prolongadas e queimadas, constituindo, portanto, uma estratégia adaptativa das plantas às condições adversas do ambiente (Hendry & Wallace 1993, Ritsema & Smeekens 2003).

Durante o déficit hídrico, o papel central dos açúcares depende não apenas do seu envolvimento direto na síntese de outros compostos e na produção de energia, mas também na estabilização de membranas (Hoekstra *et al.* 2001), regulação de expressão gênica (Koch 1996) e sinalização (Smeekens 2000). A presença de frutanos e FEHs no apoplasto sugere que os frutanos e seus produtos de degradação estão envolvidos na tolerância a estresses abióticos pela interação direta com os lipídeos da membrana (Livingston & Henson 1998, Van den Ende *et al.* 2005, Valluru & Van den Ende 2008).

Em condições de estresses abióticos, diversos autores verificaram o acúmulo de frutanos de baixo peso molecular, proporcionado tanto pela atividade de frutossiltransferases como pela ação de exohidrolases (Valluru & Van den Ende 2008 e referências ali contidas).

Em levantamentos realizados no cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, SP, foi verificado que diversas espécies possuem órgãos subterrâneos de reserva que acumulam grandes quantidades de frutanos do tipo inulina (Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1986, Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993).

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby é uma espécie perene nativa do cerrado que apresenta crescimento sazonal. Seus órgãos subterrâneos, rizóforos, são responsáveis por sua reprodução vegetativa, além de atuarem como órgãos de reserva para a planta, acumulando até 80% de sua massa seca em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich 1993).

O papel protetor dos frutanos a condições adversas do ambiente parece coerente com sua ampla ocorrência em ambientes que passam parte do ano sob condições de baixa disponibilidade de água como o cerrado. O objetivo deste trabalho foi, portanto, avaliar o envolvimento dos frutanos na tolerância ao déficit hídrico em plantas de *V. herbacea* submetidas à suspensão total de regas.

Material e Métodos

Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby com aproximadamente um ano e meio de idade, obtidas por propagação vegetativa a partir de fragmentos de rizóforos de plantas adultas, coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, SP (22° 18' S, 47° 11' W) (Carvalho *et al.* 1997). As plantas foram cultivadas em vasos individuais de 3 litros contendo terra de cerrado e mantidas em casa de vegetação durante todo o período experimental. Foram efetuadas medidas diárias das temperaturas máxima e mínima, com as quais calculou-se a temperatura média compensada ($T_D = (0,29.T_{\min}) + (0,71.T_{\max})$), conforme Goudriaan & Laar 1994, assim como medidas da umidade relativa do ar, calculada com base nas leituras dos termômetros de bulbo úmido e seco realizadas as 07:00 e 14:00 h.

Tratamento e amostragem

As plantas foram divididas em 3 lotes: um lote que recebeu regas diárias (controle), outro mantido em suspensão total de rega (tratado) e um terceiro, mantido em suspensão de rega e re-irrigado no 10º dia (re-irrigado). As coletas foram realizadas no início do experimento (tempo zero), e aos 3, 7, 10, 12, 17 e 22 dias após o início do experimento. O dia da re-irrigação foi determinado pelo aspecto de murcha apresentado pelas plantas.

Em cada ponto de amostragem foram coletadas 3 amostras de cada tratamento, sendo que cada amostra foi constituída de 3 plantas. Após lavagem e congelamento em nitrogênio líquido, amostras de rizóforos foram armazenadas a -80 °C até a realização das extrações de carboidratos, enzimas e prolina. Foram feitas determinações da massa de matéria fresca (MF) e seca (MS) da parte aérea, rizóforos e raízes, assim como medidas de potencial hídrico das folhas e do solo em cada ponto de amostragem. As coletas foram realizadas entre 7:00 e 9:00 h, aproximadamente.

Umidade do solo (U_{solo}) e potencial hídrico do solo ($\Psi_{\text{w solo}}$)

A cada amostragem de plantas para as análises bioquímicas, a umidade do solo nos vasos foi determinada por gravimetria (Blake 1965). Para tal, amostras de solo foram obtidas de cada vaso utilizando-se anéis volumétricos de 80 cm³, sendo determinados o peso fresco

imediatamente após a coleta e o peso seco após 72 h de secagem da amostra em estufa ventilada a 70 °C. A umidade do solo (U_{solo}) foi calculada a partir da fórmula:

$$U_{\text{solo}}(\%) = \frac{\text{MF} - \text{MS}}{\text{MS} - \text{Ta}} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

MF = massa fresca da amostra de solo;

MS = massa seca da amostra de solo;

Ta = tara do anel volumétrico.

Nas mesmas amostras coletadas conforme descrito anteriormente para determinação da U_{solo} , foram realizadas medidas pontuais do $\Psi_{\text{w solo}}$. Para tal, utilizou-se um psicrômetro de ponto de orvalho (Modelo Decagon WP4). As medidas foram realizadas entre 9:00 e 11:00 h.

Conteúdo de água (%)

O conteúdo de água da parte aérea e do rizóforo foi determinado a partir da fórmula:

$$\text{TU}(\%) = \frac{\text{MF} - \text{MS}}{\text{MF}} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

MF = massa fresca da amostra, determinada imediatamente após a coleta;

MS = massa seca da amostra após secagem em estufa a 60 °C (parte aérea) e após liofilização (rizóforos).

Potencial hídrico da parte aérea (Ψ_{wpa}) e do rizóforo (Ψ_{wrz})

Foram realizadas medidas do Ψ_{wpa} das plantas no período da antemãhã, entre 4:00 e 5:00 h. Para tal foi utilizada uma bomba de pressão tipo Scholander, Modelo 1000 (PMS Instrument Co., UTAH, EUA).

O Ψ_{wrz} foi medido no suco celular extraído dos rizóforos, utilizando-se um microvoltímetro de ponto de orvalho modelo HR-33T (Wescor, Logan-UTAH) e câmaras psicrométricas modelo C-52 (Weser) com o aparelho trabalhando no modo higrométrico, no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto Agrônômico. O suco celular previamente coletado

dos rizóforos foi armazenado em tubos tipo *ependorf* e congelado até o momento das medidas. Para cada medida foram utilizados 10 μL de suco celular.

Taxas de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E)

Medidas instantâneas de assimilação líquida de CO_2 (A) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e transpiração (E) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram realizadas entre 09:00 e 12:00 h, sob condições saturantes de luz (PAR= 450 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e temperatura controlada de 28 ± 2 °C, (Cuzzuol *et al.* 2008), utilizando-se um analisador de gases no infravermelho (IRGA; CIRAS-2, PP Systems). As medidas foram realizadas na primeira folha totalmente expandida, a partir do ápice, em 3 plantas de cada tratamento. A eficiência do uso da água (EUA) foi calculada como a relação entre a assimilação líquida e a transpiração (EUA = A/E).

Dosagem de prolina livre

A estimativa do teor de prolina livre foi realizada conforme a metodologia de Bates *et al.* (1973). Amostras de tecido vegetal previamente liofilizadas foram maceradas em ácido sulfossalicílico 3%. Após centrifugação a 3000 g, o sobrenadante foi coletado e alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio contendo ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina; 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico 6 M) e ácido acético glacial concentrado. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e os tubos hermeticamente fechados foram acondicionados em banho-maria, a 100 °C, durante 1 hora. A reação foi interrompida por meio de uma redução imediata da temperatura em banho de gelo. Em seguida, tolueno foi adicionado ao meio de reação e, após agitação vigorosa por aproximadamente 15 s, duas fases foram formadas: a fase aquosa superior, de coloração avermelhada (cromóforo + tolueno) foi recuperada e submetida a uma leitura em espectrofotômetro, a 520 nm. Os teores de prolina foram estimados com base em uma reta padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de L-prolina.

Extração enzimática

A extração e determinação das atividades enzimáticas foram realizadas conforme descrito em Asega & Carvalho (2004). Os rizóforos foram homogeneizados em tampão citrato-fosfato (McIlvaine) 50 mM pH 5,5, contendo 2 mM de EDTA, 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β -

mercaptoetanol e 10% de polivinil polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi mantido em repouso por 30 min e, em seguida, filtrado em nylon duplo. Ao filtrado foi adicionado sulfato de amônio a 20% de saturação, sendo a mistura mantida em repouso por uma noite. Após centrifugação a 12000 g por 20 min a 5 °C, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 80% de saturação. A mistura foi mantida em repouso por 1 hora. Após centrifugação por 20 min a 17000 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido no tampão de extração. O extrato foi dessalinizado em colunas de Bio Gel P-6 DG e submetido aos ensaios de atividade enzimática. Toda a manipulação do material durante a extração foi realizada a 5 °C. O conteúdo de proteína nos extratos foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (Sigma) ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) como padrão.

Ensaio Enzimático

As misturas de incubação foram constituídas de extrato enzimático e substratos na proporção de 1:1 (v/v). Os substratos foram preparados em tampão Mc Ilvaine 50 mM, pH 4,5. Os extratos foram incubados a 30 °C utilizando-se substratos nas concentrações finais de 200 mM de sacarose (Sigma) para a atividade de SST, 50 mM de sacarose (Sigma) para a atividade de invertase, 200 mM de 1-cestose para a atividade de FFT e 5% de inulina de *Helianthus tuberosus* (Sigma) para a atividade de FEH. O tempo de incubação foi de 1 hora para a atividade da SST e da FFT, 4 h para a invertase e de 30 min a FEH. As misturas de incubação foram submetidas à fervura para interrupção da reação.

Análise das Atividades Enzimáticas

Para a determinação das atividades da SST e FFT, amostras das misturas de incubação foram diluídas (200x) em água deionizada e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema de cromatografia Dionex modelo ICS-3000, utilizando-se coluna CarboPac PA-1 (2 x 250 mM). A eluição dos carboidratos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH) com a seguinte programação: 0 - 2 min, 25 mM; 2,1 - 8 min, 50 mM; 8,1 - 10 min, 350 mM; 10,1 - 12 min, 500 mM; 12,1 - 17 min, 25 mM. Os potenciais aplicados ao PAD para 0 - 0,4 s, 0,41 - 0,6 s,

0,61 - 1 s foram 0,05, 0,75 e -0,15, respectivamente e o fluxo aplicado foi de 0,25 mL min⁻¹. A quantificação foi feita através da área do pico da 1-kestose e nistose, para atividades da SST e FFT, respectivamente, utilizando padrão externo. A atividade de FEH foi determinada pela quantidade de frutose liberada na mistura de incubação, por quantificação do açúcar redutor (Somogyi 1945), utilizando frutose (Sigma) como padrão. Para a determinação da atividade da invertase, as misturas de incubação foram analisadas por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo ICS-3000, utilizando-se coluna CarboPac PA-1 (2 X 250 mm) e programa isocrático de 100 mM de hidróxido de sódio. Os potenciais aplicados ao PAD para 0 - 0,4 s, 0,41 - 0,6 s, 0,61 - 1 s foram 0,05, 0,75 e -0,15, respectivamente e o fluxo aplicado foi de 0,25 mL min⁻¹. A atividade de invertase foi determinada pela área do pico da frutose, utilizando-se padrão externo.

Extração de carboidratos solúveis

Amostras liofilizadas de rizóforos foram pesadas para a determinação da massa de matéria seca e, então, submetidas à extração de carboidratos conforme Carvalho *et al.* (1998) modificado. As amostras foram pulverizadas em almofariz, colocadas em etanol 80% e mantidas em banho-maria a 80 °C por 15 min, sendo então centrifugadas a 700 g por 15 min. Os precipitados foram re-extraídos duas vezes. Os sobrenadantes etanólicos foram reunidos e reservados. Os resíduos finais foram extraídos duas vezes em água a 60 °C por 30 min e filtrados a vácuo em tecido de algodão. Os sobrenadantes etanólicos e os filtrados aquosos foram reunidos, concentrados em evaporador rotatório e o extrato final (extrato bruto) foi submetido à precipitação a frio com três volumes de etanol, para separação das frações de fruto-oligo (sobrenadante) e polissacarídeos (precipitado) após centrifugação a 2900 g por 10 min a 5 °C. O sobrenadante, contendo a fração de fruto-oligosacarídeos, foi concentrado em evaporador rotatório para a retirada de etanol, e o precipitado que consistiu da fração de polissacarídeos foi ressuspenso e solubilizado em água.

Análise quantitativa e qualitativa dos frutanos

Os conteúdos de frutose livre e ligada foram determinados no extrato bruto e nas frações de fruto-oligosacarídeos e fruto-polissacarídeos, separadamente, pelo método de antrona modificado (Jermyn 1956) para cetoses. Os teores de frutanos foram estimados com base em uma reta padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de frutose.

Para as análises qualitativas, as amostras de fruto-oligossacarídeos foram submetidas à deionização em colunas de troca iônica contendo resinas nas formas catiônicas (Dowex 50 WX8 - 100) e aniônica (Dowex 1 X 8 - 100) (Carvalho & Dietrich 1993). Em seguida foram filtradas em membranas de 0,45 μm e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex modelo ICS 3000 utilizando coluna CarboPac PA1 (2 X 250 mm) e concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em equivalentes de frutose, conforme Asega *et al.* (2008). O gradiente para separação dos componentes da série homóloga da inulina 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) na 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. O conteúdo de glucose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose foi estimado pelas respectivas áreas dos picos referentes a cada um destes açúcares, utilizando-se padrões externos.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados por meio de correlações simples (Pearson), entre parâmetros que avaliam o *status* hídrico das plantas (teor de umidade e potencial hídrico da parte aérea e dos rizóforos) e os outros parâmetros analisados. Foi utilizado o teste “t” de Student para avaliar a significância das correlações.

Resultados

Na figura 1 são apresentados os dados de temperatura e umidade relativa do ar durante os 22 dias de experimento. Neste período, a temperatura média do ar no interior da casa de vegetação foi de 23 °C, com máxima de 30 °C e mínima de 11 °C. A umidade relativa média do ar foi 84%, com máxima de 95% e mínima de 70%.

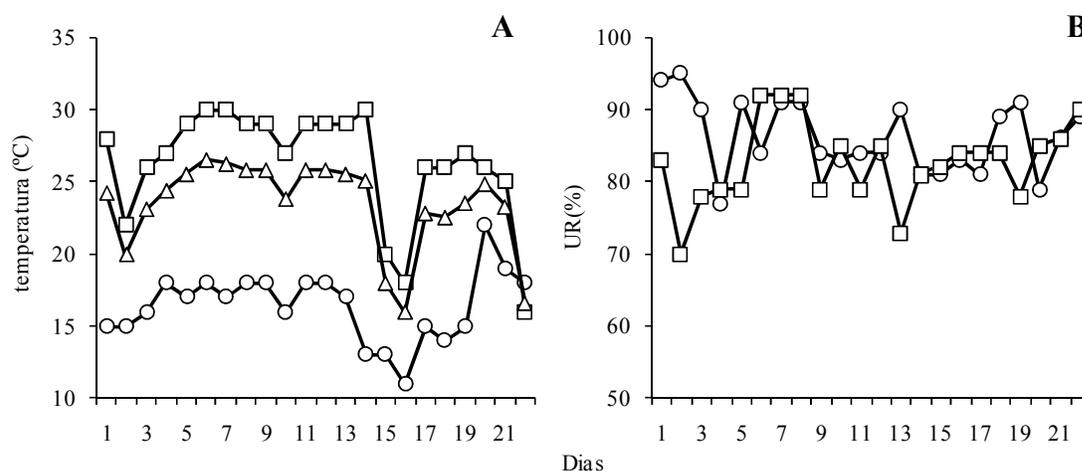


Figura 1 – (A) medidas diárias da temperatura máxima (\square), mínima (\circ) e média (Δ) do ar e (B) medidas da umidade relativa do ar registradas nos períodos da manhã (\circ) e da tarde (\square).

A umidade do solo manteve-se praticamente constante nos vasos controle (Figura 2A). Por outro lado, a suspensão de rega proporcionou valores de umidade abaixo dos 5%, alcançados aos 10 dias após o início do tratamento e sem muitas variações até o final do experimento. Os solos que foram re-irrigados no 10º dia do experimento recuperaram a umidade em 2 dias e voltaram a apresentar valores semelhantes aos do controle. A partir do 3º dia de experimento, o potencial hídrico do solo (Figura 2B) apresentou decréscimo acentuado nos vasos das plantas sob déficit hídrico, sendo que o menor valor de aproximadamente -17 MPa, observado aos 22 dias após a suspensão, coincidiu com os menores valores de umidade do solo (Figura 2A). No controle, o $\Psi_{w \text{ solo}}$ apresentou valor mínimo de -0,3MPa, sem grandes variações ao longo do período experimental (Figura 2B). Nos vasos re-irrigados, o $\Psi_{w \text{ solo}}$ voltou a apresentar valores semelhantes ao controle 2 dias após a re-irrigação.

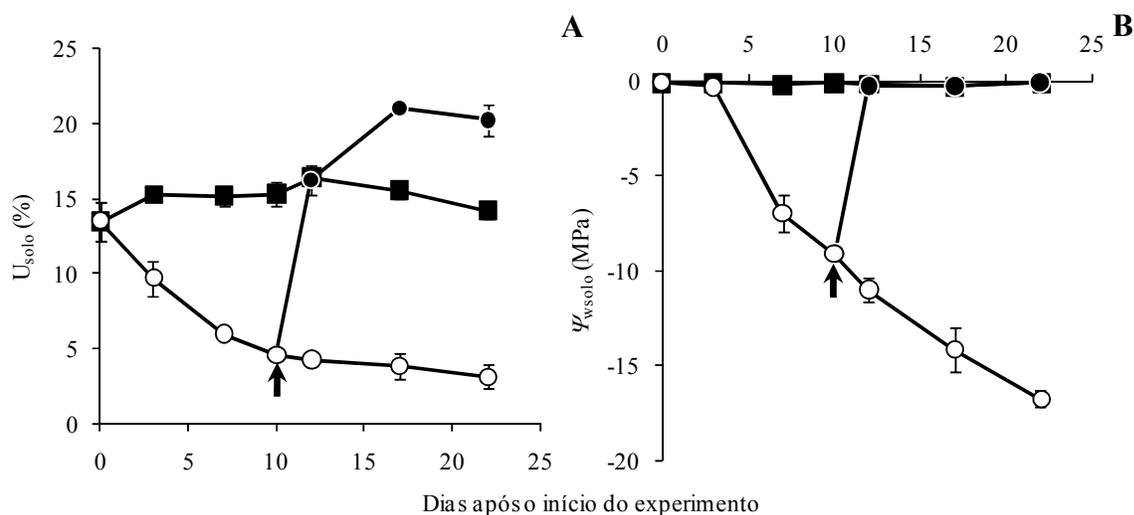


Figura 2 – Medidas de umidade (A) e potencial hídrico do solo (B) dos vasos submetidos à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Nas plantas controle, os teores de umidade da parte aérea e do rizóforo mantiveram-se inalterados durante todo o período experimental (Figura 3). As plantas submetidas à suspensão de rega apresentaram uma queda no teor de umidade a partir do 7º dia de experimento. As plantas que foram re-irrigadas no 10º dia apresentaram um aumento no teor de umidade 2 dias depois, apresentando status hídrico próximo ao das plantas controle (Figura 3). Observa-se que, no rizóforo das plantas tratadas, o teor de umidade não sofreu alterações a partir do 12º dia (Figura 3B), enquanto nas folhas ocorreu diminuição do 7º ao 17º dia (Figura 3^a).

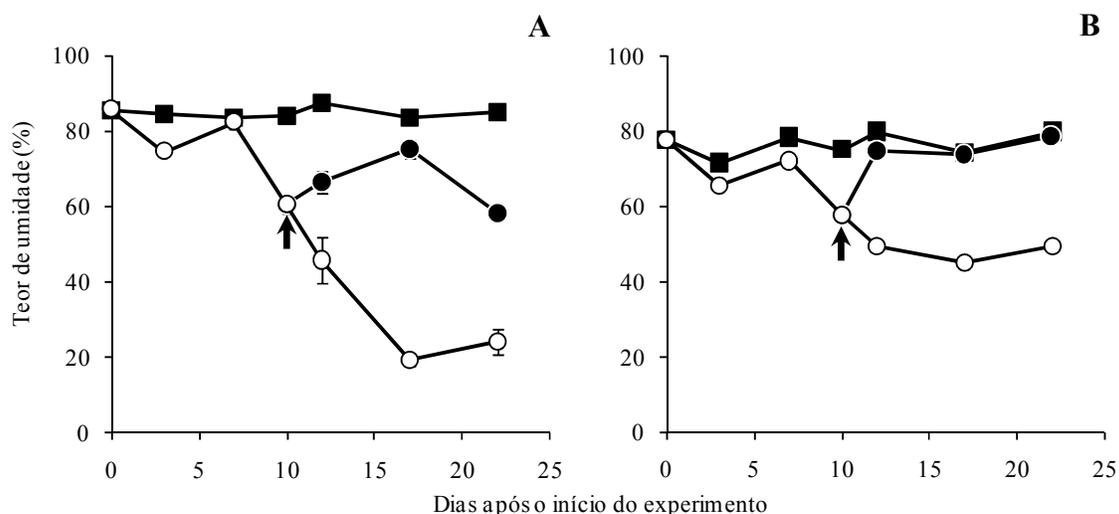


Figura 3 – Teor de umidade (%) da parte aérea (A) e do rizóforo (B) de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Assim como no solo, o potencial hídrico da parte aérea diminuiu a partir do 7º dia de experimento nas plantas tratadas, atingindo cerca de -1,7 MPa aos 12 dias. Nos dois últimos pontos de coleta (17 e 22 dias), não foi possível realizar as medidas de potencial hídrico da parte aérea devido à senescência da mesma. Os valores mantiveram-se praticamente constantes nas plantas controle até o final do período estudado. As plantas que foram re-irrigadas no 10º dia apresentaram um aumento do potencial hídrico 2 dias depois, apresentando valores semelhantes aos das plantas controle (Figura 4A).

O potencial hídrico dos rizóforos apresentou diminuição a partir do 7º dia, semelhantemente à parte aérea, atingindo cerca de -6,0 MPa no 22º dia após o início da suspensão de rega. Nas plantas que foram re-irrigadas, os valores assemelharam-se àqueles encontrados nas plantas controle, cujos valores mantiveram-se praticamente inalterados durante o experimento (Figura 4B).

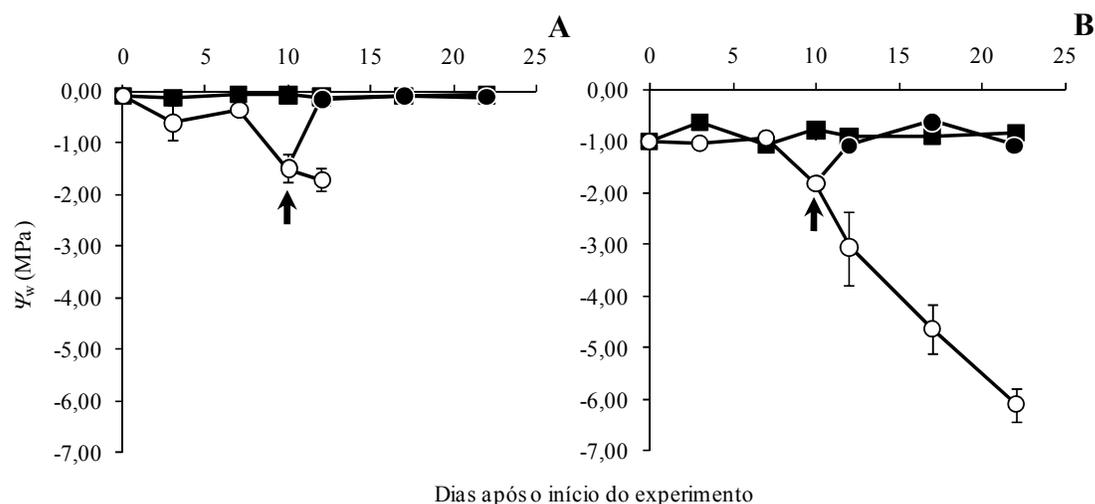


Figura 4 – Potencial hídrico (Ψ_w) da parte aérea (A) e dos rizóforos (B) de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Aos 7 dias de experimento, algumas plantas do lote mantido em suspensão de rega apresentaram sinais de murcha em suas folhas (Figura 5). Aos 12 dias, os rizóforos das plantas re-irrigadas já haviam recuperado seu status hídrico inicial, conforme demonstram as figuras 3, 4 e 6. Aos 17 dias, as plantas re-irrigadas começaram a apresentar rebrota de ramos aéreos (Figura 7). Nas plantas mantidas sob suspensão de rega as folhas passaram a apresentar sinais de senescência a partir do 10º dia (Figura 8).



Figura 5 - Plantas de *Vernonia herbacea* 7 dias após o início do experimento. Planta do controle (esquerda) e planta mantida sob suspensão de rega (direita). Notar os sinais de murcha nas folhas (seta).



Figura 6 - Plantas de *Vernonia herbacea* 12 dias após o início do experimento. A partir da esquerda: controle, suspensão de rega e re-irrigada. Notar o aspecto dos rizóforos das plantas re-irrigadas assemelhando-se ao controle (seta).

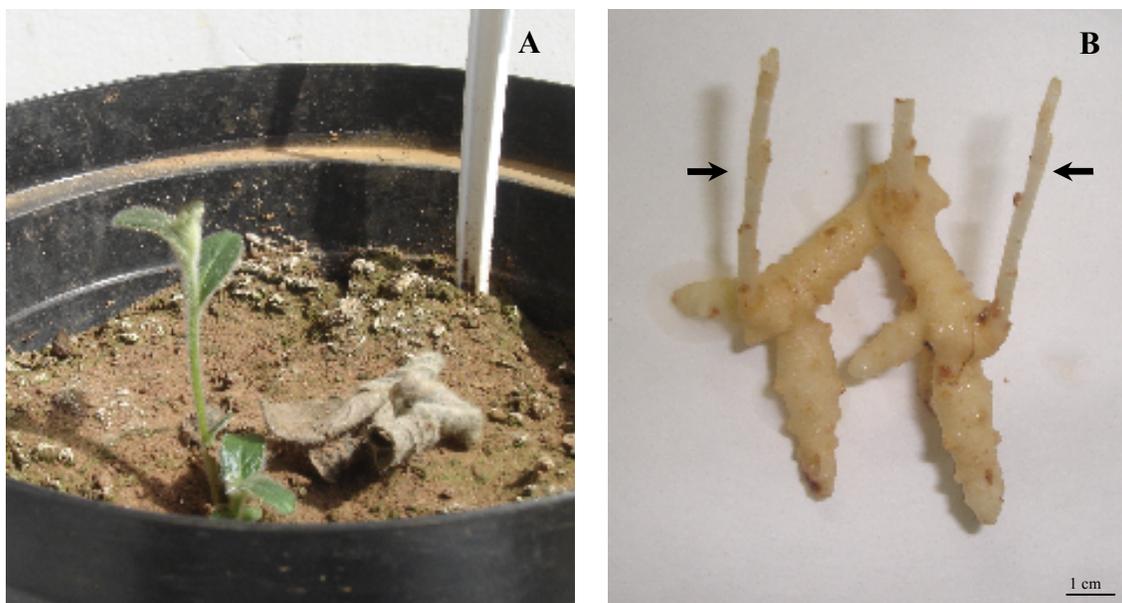


Figura 7 - Plantas de *Vernonia herbacea* que foram re-irrigadas rebrotando aos 17 dias após o início do experimento (A). Detalhe do rizóforo com brotos (setas) (B).



Figura 8 - Plantas de *Vernonia herbacea* 10 dias após o início do experimento. Planta controle (esquerda) e planta mantida sob suspensão de rega (direita). Notar parte aérea em início de senescência (seta).

Os valores de teor de umidade apresentaram correlação positiva com a assimilação fotossintética (A) ($r=0,91$ $P=0,013$) (Figura 9A), com a condutância estomática (g_s) ($r=0,85$

$P=0,032$) (Figura 9B) e com a transpiração (E) ($r=0,88$ $P=0,019$) (Figura 9C) em relação às plantas controle. A eficiência do uso da água (EUA) (Figura 9D) nas plantas tratadas aumentou entre o 3º e o 7º dia, mas a partir do 12º dia, não foi possível realizar as medidas devido à senescência da parte aérea. Logo após a re-irrigação, as plantas apresentaram aumento nestes 3 parâmetros, porém os valores atingidos ficaram abaixo daqueles verificados nas plantas controle, nas quais, esses parâmetros mantiveram-se bastante estáveis durante o período experimental.

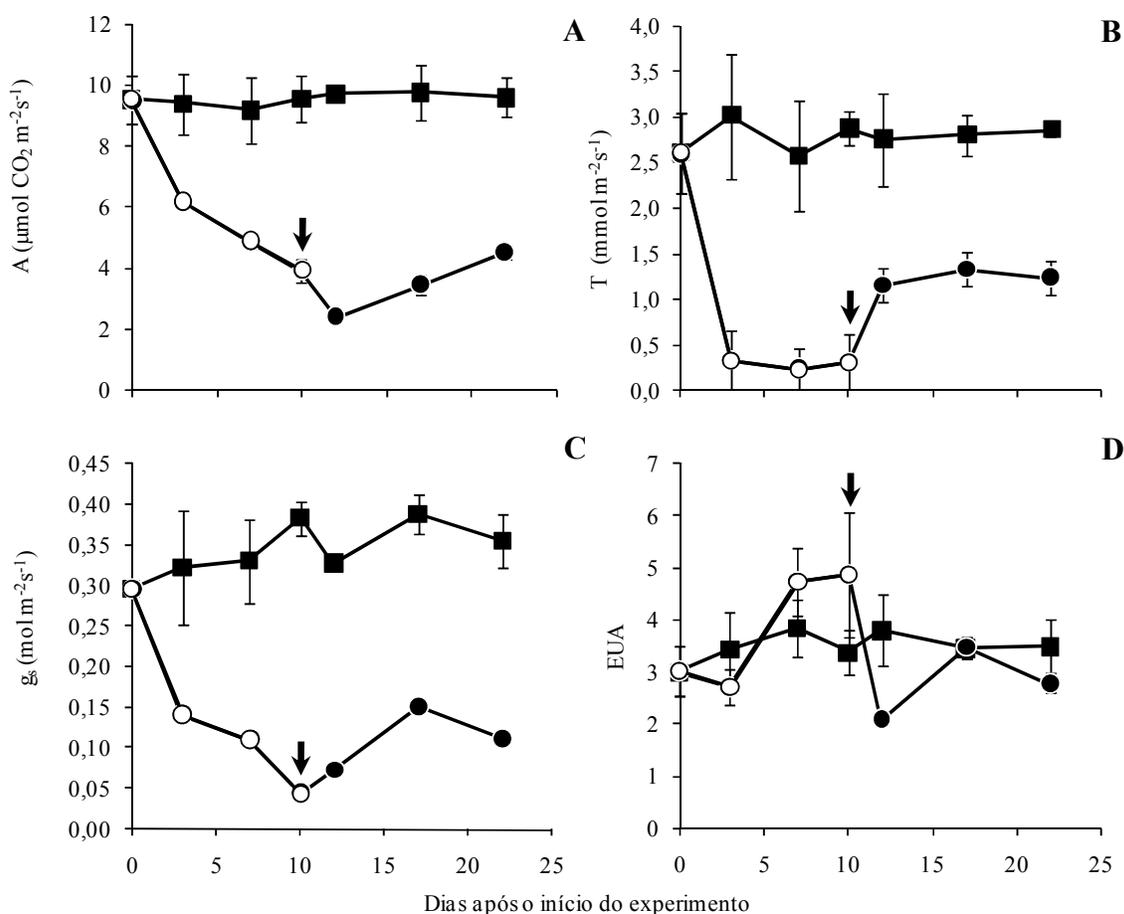


Figura 9 – Assimilação fotossintética (A), transpiração (B), condutância estomática (C) e eficiência do uso da água (EUA) (D) em folhas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média ($n=3$).

Os conteúdos de prolina livre nas folhas e rizóforos são apresentados na figura 10. As plantas controle apresentaram conteúdo de prolina próximo de zero durante todo o período experimental tanto nas folhas como nos rizóforos. Ao contrário, o conteúdo de prolina nas plantas submetidas ao déficit hídrico aumentou a partir do 7º dia de experimento, em ambos os órgãos, e

continuou elevado até o final do período de deficiência hídrica. As plantas submetidas à re-irrigação apresentaram diminuição gradual do conteúdo de prolina logo após o 10º dia até valores próximos aos do controle. O aumento do conteúdo desse aminoácido correlacionou-se negativamente à diminuição do conteúdo de água dos respectivos órgãos e as curvas de aumento em folhas e rizóforos diferiram entre si (Figura 10). Nas folhas ($r=-0,92$ $P=0,010$) houve um pequeno aumento até o 7º dia, seguido de um aumento exponencial até o 10º dia e novamente um pequeno aumento entre o 12º e 22º dias, tendendo à estabilização. Nos rizóforos ($r=-0,81$ $P=0,052$) houve um aumento exponencial a partir do 10º dia até o final do experimento.

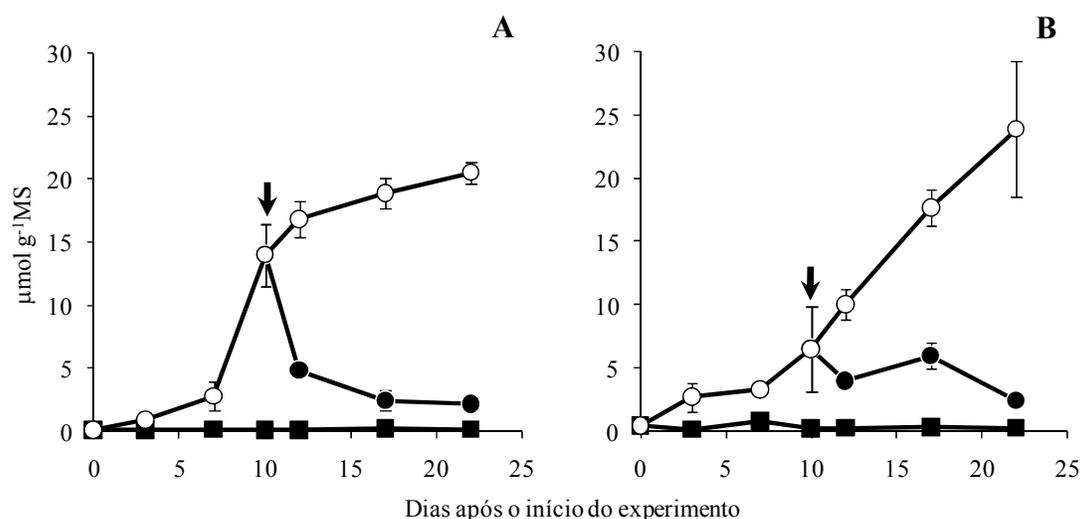


Figura 10 – Conteúdo de prolina em folhas (A) e rizóforos (B) de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

A figura 11 mostra a atividade das enzimas do metabolismo de frutanos. No início do experimento, a enzima que apresentou maior atividade foi a FFT, seguida da SST, FEH e invertase.

A SST apresentou um aumento inicial de atividade em ambos os tratamentos. Nas plantas controle a atividade se manteve com pequenas variações, exceto pela diminuição observada no 10º dia de experimento. Já nas plantas tratadas, houve uma diminuição da atividade aos 7 dias e a enzima apresentou as maiores taxas de atividade entre o 10º e 12º dia do experimento. Nas plantas re-irrigadas houve diminuição após o fornecimento de água (Figura 11A).

Nas plantas controle, a atividade da FFT apresentou pequenas alterações. Naquelas mantidas sob suspensão de rega, ocorreu aumento da atividade a partir do 7º dia de experimento,

seguida de uma queda gradual a partir do 17º dia. Após o fornecimento de água, aos 10 dias, ocorreu diminuição da atividade dessa enzima. (Figura 11B).

A atividade da FEH aumentou a partir do 7º dia de experimento nas plantas tratadas, apresentando atividade máxima no 12º dia (Figura 11C). Nas plantas controle, a atividade da FEH apresentou menores variações durante todo período e as plantas submetidas à re-irrigação apresentaram diminuição da atividade até valores próximos aos encontrados nas plantas do controle.

A atividade da invertase foi inicialmente baixa e não apresentou diferenças entre os tratamentos até o 7º dia, a partir do qual apresentou aumento nas plantas mantidas em suspensão de rega. Nas plantas que foram re-irrigadas, a atividade dessa enzima diminuiu após a re-irrigação, apresentando valores próximos aos do controle (Figura 11D).

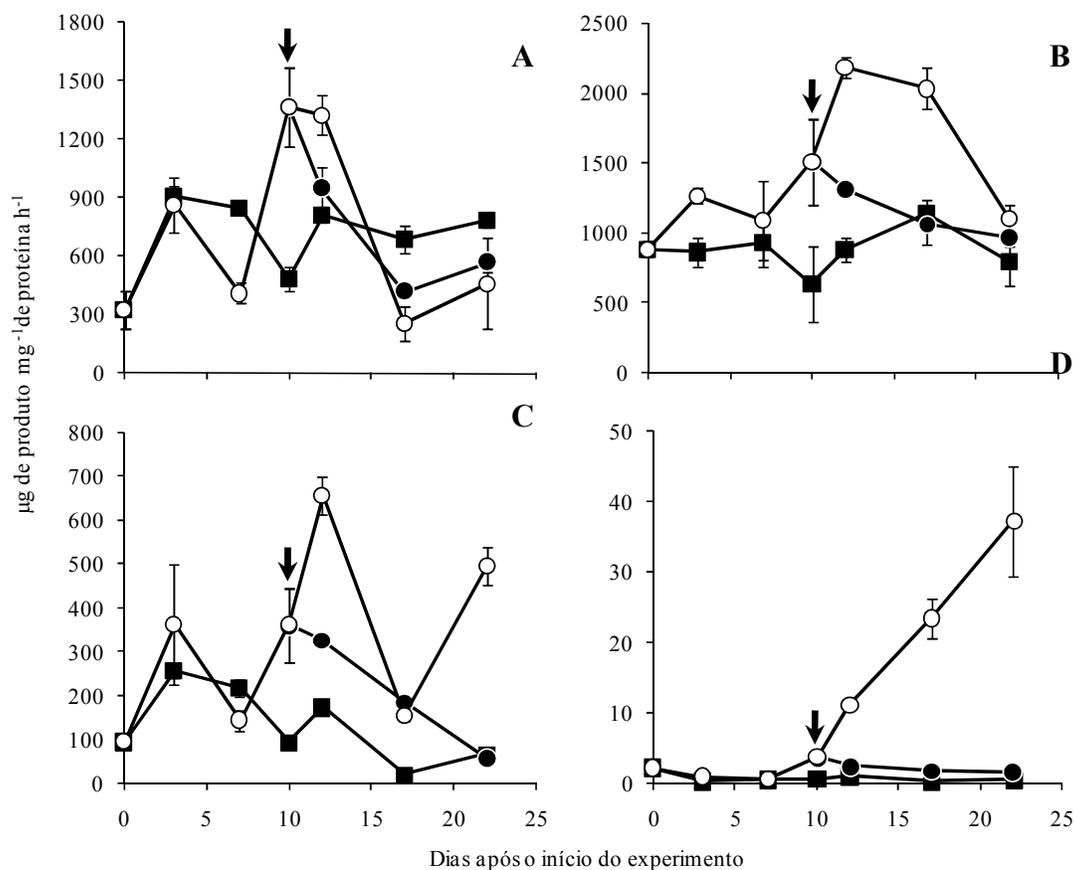


Figura 11 - Atividade da SST (A), FFT (B), FEH (C) e invertase (D) em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* nos rizóforos de plantas de *V. herbacea* submetidas à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

O conteúdo de frutano total apresentou, em geral, uma diminuição tanto nos rizóforos de plantas tratadas quanto nos de plantas controle durante o período experimental (Figura 12A). Os fruto-oligossacarídeos (Figura 12B) apresentaram uma diminuição inicial em ambos os grupos de plantas, mas após o 3º dia, e até o 12º dia, as plantas controle apresentaram teores mais elevados do que as tratadas. Após a re-irrigação ocorreu um aumento e os teores mantiveram-se acima dos teores de plantas controle e das submetidas à suspensão total de rega. Ao final do período experimental as plantas sob suspensão total e as re-irrigadas apresentaram teores semelhantes entre si e superiores aos de plantas controle. O conteúdo de fruto-polissacarídeos (Figura 12C) aumentou nas plantas controle e naquelas sob suspensão de rega, até o 7º dia, a partir do qual sofreu decréscimo nos rizóforos das plantas sob déficit hídrico, mas manteve-se relativamente constante nos de plantas controle. Após a re-irrigação as plantas apresentaram uma tendência de

aumento desta fração, semelhantemente às plantas controle, uma diminuição acentuada no 17º dia e novamente um aumento no 22º dia.

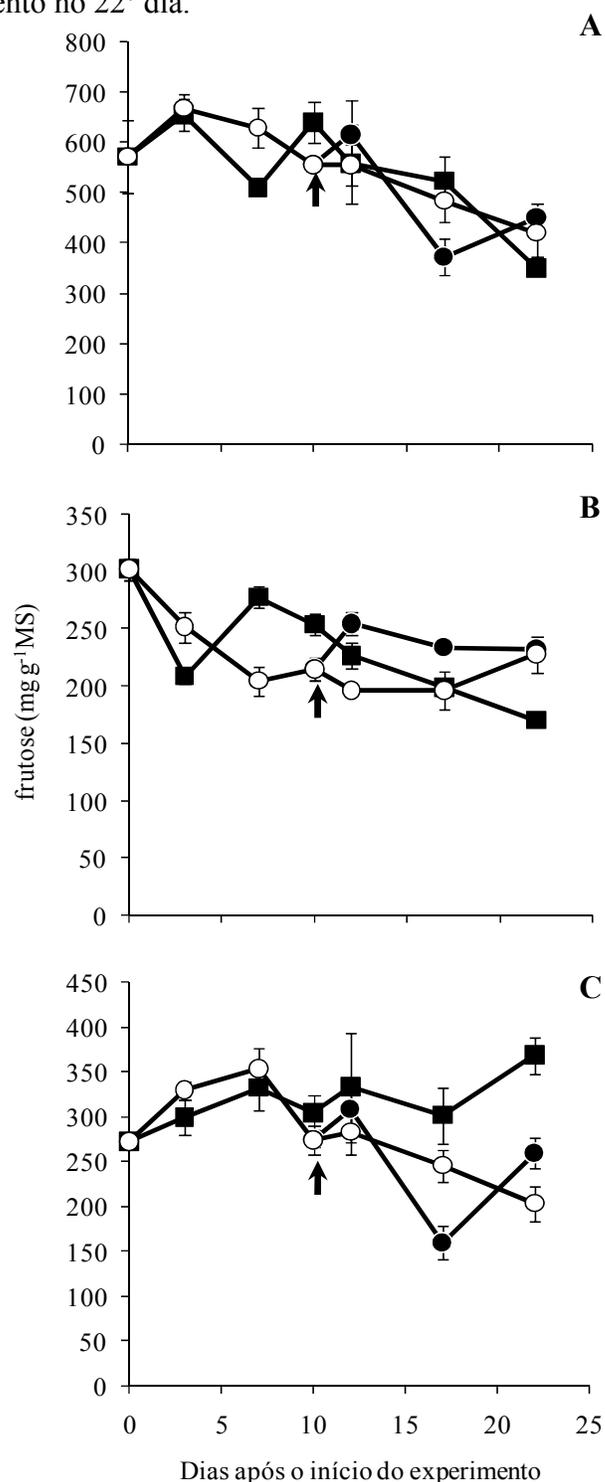


Figura 12 - Conteúdo de frutano total (A), fruto-oligosacarídeos (B) e fruto-polissacarídeos (C) em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Com relação à razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos (Figura 13), houve uma diminuição nas plantas controle no 3º dia seguido de uma diminuição nas plantas tratadas, no 7º dia. Nestas últimas, verificou-se um aumento desta razão entre o 12º e 22º dia. As plantas re-irrigadas apresentaram um nítido aumento desta razão 7 dias após a re-irrigação, seguido de queda aos 22 dias.

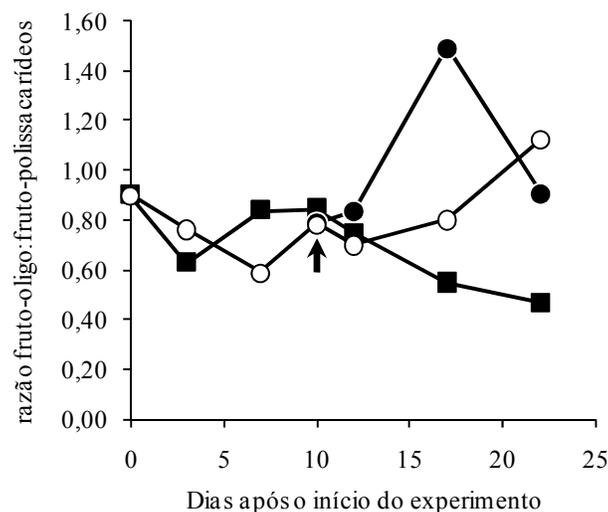


Figura 13 – Razão fruto-oligossacarídeos:fruto-polissacarídeos em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). A seta indica o dia da re-irrigação.

O conteúdo de açúcar redutor nos rizóforos das plantas controle diminuiu ao longo do período experimental, especialmente até o 17º dia. Já nos rizóforos das plantas submetidas à suspensão de rega, o conteúdo aumentou gradualmente até o 10º dia e apresentou pequenas variações até o final do período experimental. Após o 10º dia, as plantas que foram re-irrigadas apresentaram diminuição no conteúdo de açúcar redutor, acompanhando a diminuição apresentada pelas plantas controle (Figura 14).

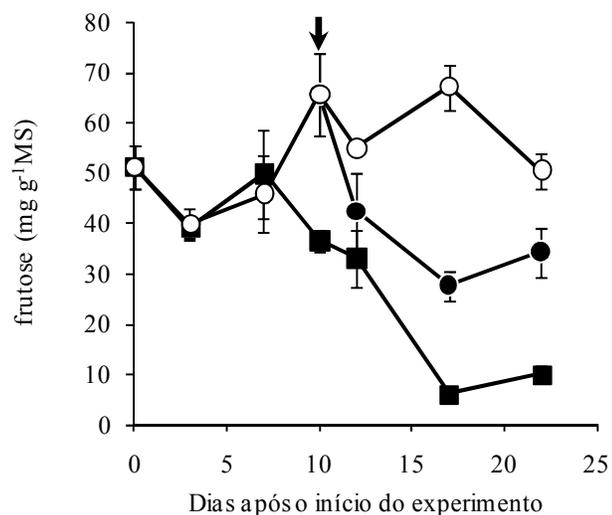


Figura 14 – Conteúdo de açúcar redutor em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

As análises qualitativas das frações de fruto-oligossacarídeos por cromatografia de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD) são mostradas na figura 15. Observa-se que nas plantas controle não houve diferenças notáveis no perfil dos oligossacarídeos. Entretanto, nas plantas mantidas sob deficiência hídrica, a partir do 10º dia, houve um nítido aumento na proporção dos monossacarídeos glucose e frutose em relação aos demais membros da fração de fruto-oligossacarídeos. Nas plantas submetidas à re-irrigação, observa-se um retorno gradual aos perfis encontrados nas plantas controle, 2 dias após a re-irrigação.

O teor de glucose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose obtidos pela HPAEC/PAD são apresentados na figura 16. Nas plantas mantidas sob déficit hídrico, houve um aumento conspícuo do conteúdo de glucose entre o 7º e 10º dias e outro entre o 17º e 22º dias do experimento. Após a re-irrigação, o conteúdo de glucose diminuiu rapidamente, alcançando valores baixos, semelhantes aos das plantas controle. O padrão observado nas mudanças no conteúdo de frutose foi semelhante ao da glucose, mas as concentrações de frutose foram mais elevadas. Nas plantas submetidas à suspensão de rega a sacarose diminuiu até o 10º dia, após o qual ocorreu um aumento gradual até o 22º dia. Por outro lado, logo após a re-irrigação as plantas apresentaram um aumento conspícuo até o 12º dia, seguido de pequena diminuição. Os conteúdos de sacarose, 1-cestose e nistose das plantas controle apresentaram aumento conspícuo no 10º dia, seguido de diminuição até o final do experimento. Nas plantas tratadas, os conteúdos de 1-cestose

e nistose diminuíram gradualmente até o 12º dia, após o que mantiveram-se até o final. Nas plantas re-irrigadas houve aumento de ambos, 2 dias após a re-irrigação.

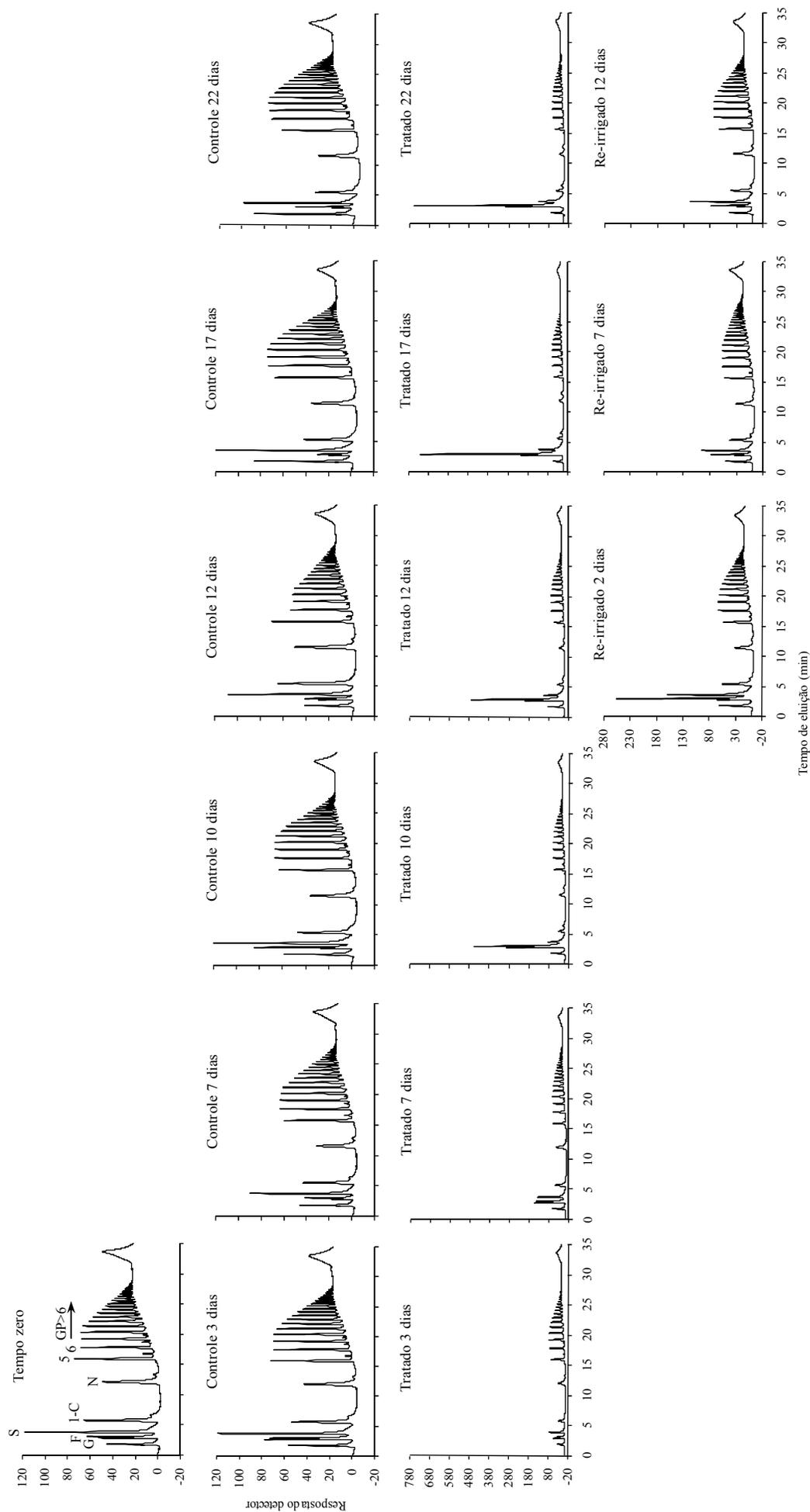


Figura 15 - Cromatografia de troca aniônica de alta resolução dos fruto-oligosacarídeos de rizôforos de plantas de *Venonia herbacea* submetidas ou não à deficiência hídrica por meio da suspensão de rega. G: glicose; F: Frutose; I-C: 1-C; N: Nistose, os números correspondem ao grau de polimerização dos oligossacarídeos e GP>6 aos frutanos com grau de polimerização maior que 6.

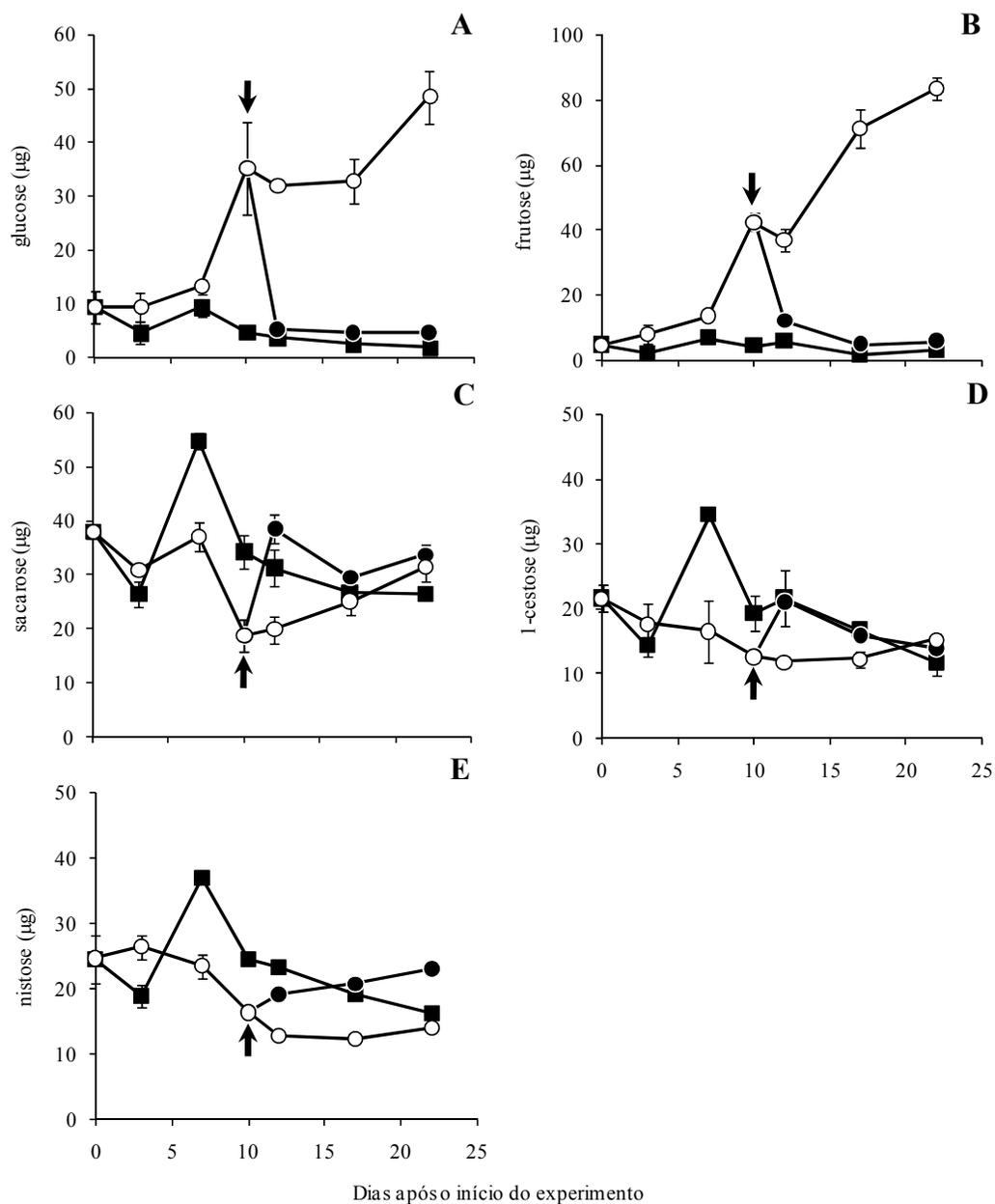


Figura 16 – Quantificação de glucose (A), frutose (B), sacarose (C), 1-cestose (D) e nistose (E) da fração de fruto-oligossacarídeos por HPAEC/PAD nos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (controle - ■), à suspensão de rega (tratado - ○) e à re-irrigação (re-irrigado - ●). As setas indicam o dia da re-irrigação. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Discussão

O método de indução ao estresse hídrico nesse experimento permitiu o desenvolvimento gradual do déficit hídrico na planta e no solo, como indicado pelas medidas de potencial hídrico e teores de umidade. De modo geral, o déficit hídrico imposto foi suficiente para gerar alterações no conteúdo e no estado termodinâmico da água no solo e nas plantas, que por sua vez afetaram os processos fisiológicos e bioquímicos como a fotossíntese, a síntese de prolina e o metabolismo de frutanos nas plantas de *V. herbacea*.

Em uma análise conjunta dos parâmetros de teor de umidade e potencial hídrico do solo e das plantas pode-se observar que pequenas variações quantitativas de água, isto é, no teor de umidade do solo, causaram grandes variações no potencial hídrico dos solos, da parte aérea e dos rizóforos, principalmente a partir do 7º dia de experimento. É possível também observar que, até o 7º dia, as reduções no potencial hídrico se deveram mais às diminuições no conteúdo de água e, deste período em diante, tais reduções se deveram mais às alterações no estado termodinâmico da água nos tecidos vegetais, provavelmente causados pelo acúmulo de solutos compatíveis osmoticamente ativos, aspecto que será mais bem discutido juntamente com os resultados do conteúdo de prolina e metabolismo de carboidratos.

No solo, a manutenção do teor de umidade na faixa de 5 a 3% a partir do 10º dia de suspensão de rega sugere o alcance do ponto de murcha permanente (Kramer 1995). A partir deste mesmo período, observou-se, também, que o teor de umidade dos rizóforos foi mantido em cerca de 40% até o final do experimento; no entanto as reduções no potencial hídrico da parte aérea e dos rizóforos persistiram, indicando que outro fator além da perda de água estaria influenciando esta redução.

Dentre as primeiras mudanças que ocorrem em plantas expostas a condições de seca está a redução da perda de água durante a transpiração, através da regulação da abertura dos estômatos, sendo este um dos principais fatores que determinam a assimilação de CO₂ e o crescimento das plantas (Burgess 2006). De fato, nas plantas de *V. herbacea* mantidas em suspensão de rega, os decréscimos na condutância estomática ($r=0,88$ $P=0,019$), em resposta à deficiência hídrica imposta, parece ter sido o principal fator limitante da fotossíntese. Com efeito, aumentos na condutância estomática e, por extensão, na transpiração e taxas fotossintéticas foram observados após a re-irrigação das plantas.

As taxas fotossintéticas observadas nas plantas irrigadas diariamente foram semelhantes às obtidas por Cuzzuol *et al.* (2008), que, sob condições de alta umidade do solo, demonstraram

que o suprimento de nitrogênio afeta significativamente a fotossíntese e a produção de frutanos em *V. herbacea*. Este experimento também demonstra que, a exemplo do nitrogênio, a baixa disponibilidade hídrica afeta a fotossíntese ($r=0,91$ $P=0,013$) e que essa limitação se dá principalmente pela limitação estomática ($r=0,96$ $P=0,003$). A eficiência do uso da água (EUA) manteve-se praticamente constante nas plantas irrigadas diariamente, porém com maior variação nas plantas submetidas ao déficit hídrico. A manutenção de 50% das taxas fotossintéticas pelas plantas sob déficit hídrico até o 7º e 10º dias após a suspensão da rega, associada às reduções de aproximadamente 84% na condutância estomática, favoreceram o aumento da EUAi. Tais aumentos podem ser considerados circunstanciais, visto que a partir do 12º dia as folhas das plantas sob déficit hídrico senesceram e a EUA decresceu nas plantas re-irrigadas.

A síntese de osmoprotetores é um dos mecanismos de adaptação à deficiência de água. Essas moléculas, que agem no balanço osmótico, são acumuladas nas células em resposta ao estresse da seca e são degradadas quando a água torna-se disponível novamente (Tabaeizadeh 1998).

No presente estudo, as plantas sob déficit hídrico apresentaram um conteúdo elevado de prolina tanto nas folhas como nos rizóforos. Esse aumento de prolina foi suave no início e, após o 7º dia houve um aumento exponencial desse conteúdo, que continuou nos rizóforos até o final do experimento e estabilizou-se nas folhas após a senescência das mesmas a partir do 10º dia.

A prolina desempenha um papel importante na proteção de plantas expostas a estresses abióticos, conferindo ajuste osmótico junto ao aumento no conteúdo de outros osmólitos. Como sua quantidade muitas vezes representa uma porção muito pequena do ajuste osmótico, outras funções sugeridas para a prolina são a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e interação com resíduos de proteínas hidrofóbicas. Além disso, a prolina e outros osmólitos podem atuar como moléculas sinalizadoras ou reguladoras, capazes de ativar múltiplas respostas do processo de adaptação a estresses ambientais (Maggio *et al.* 2002). O conteúdo de prolina encontrado no presente estudo foi elevado, com valores semelhantes observados nas folhas ($\sim 20 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS) e nos rizóforos ($\sim 25 \mu\text{mol g}^{-1}$ MS). Tais valores sugerem a atuação deste aminoácido no ajustamento osmótico das plantas, principalmente nos rizóforos, nos quais os teores de umidade e a diminuição do potencial hídrico foram correlacionados com o aumento desse aminoácido ($r=-0,97$ $P=0,002$). No entanto, o papel da prolina nas respostas de *V. herbacea* ao déficit hídrico deve ser mais bem investigado, uma vez que, ao contrário dos rizóforos, na parte aérea, mesmo

apresentando alto teor de prolina, não houve manutenção do teor de umidade e ocorreu a senescência das folhas.

Estudos realizados em plantas intactas e fragmentos de rizóforos isolados de *Vernonia herbacea* mostraram que a deficiência de água promoveu um aumento de frutose livre e de oligossacarídeos com baixo peso molecular nos tecidos (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004).

No presente estudo, ocorreu um aumento na proporção de oligossacarídeos, evidenciado pela maior razão fruto-oligo: fruto-polissacarídeos nas plantas sob suspensão de rega verificado após o 12º dia de experimento. Na análise das frações de fruto-oligossacarídeos em HPAEC/PAD, observou-se um nítido aumento na proporção de monossacarídeos em relação aos demais oligossacarídeos da série da inulina já a partir do 10º dia.

Segundo Spollen & Nelson (1994), os carboidratos mais eficientes na diminuição do potencial osmótico são as hexoses e a sacarose. Como os frutanos podem ser rapidamente mobilizados a frutose e sacarose, produtos de sua despolimerização, estes compostos podem atuar na sobrevivência de plantas mantidas sob deficiência hídrica e, portanto, na tolerância à seca. Neste trabalho, o aumento da razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos foi correlacionado à diminuição gradual do potencial hídrico dos rizóforos ($r=-1,00$ $P=0,000$), cujo teor de umidade manteve-se inalterado após o 10º dia de suspensão de rega, indicando a ocorrência de ajuste osmótico. Além disso, os valores de potencial hídrico dos rizóforos foram correlacionados negativamente com o aumento do conteúdo de glucose ($r=-0,85$ $P=0,031$) e de frutose ($r=-0,95$ $P=0,003$), sugerindo a ocorrência de ajuste osmótico na presença de produtos de degradação dos futas.

A diminuição do conteúdo de açúcar redutor e da prolina observada após a re-irrigação é consistente com a idéia de que esses solutos orgânicos são utilizados como fonte de energia pelas plantas mantidas sob déficit hídrico durante sua recuperação após o fornecimento de água, conforme proposto por Mohammadkhani & Heidari (2008).

Dias-Tagliacozzo *et al.* (2004) sugeriram que o aumento de carboidratos de baixo grau de polimerização poderia estar relacionado à atuação da FEH dos tecidos, através da qual ocorre liberação de frutose. As medidas das atividades enzimáticas das plantas que ficaram sob deficiência hídrica mostraram que a hidrólise dos frutanos foi devida ao aumento da atividade da FEH. Em trigo (Virgona & Barlow 1991, Yang *et al.* 2004), chicória (Van den Ende *et al.* 1998) e gramíneas do gênero *Festuca* (Spollen & Nelson 1994, Clark *et al.* 2004) sob déficit hídrico,

também ocorreu hidrólise dos frutanos, ocasionando um aumento no conteúdo de açúcares de baixo peso molecular, principalmente a frutose.

O aumento da atividade de FEH verificado em plantas submetidas ao déficit hídrico sugere que nesta condição esta enzima também desempenha uma função de sobrevivência para a planta, conforme havia sido sugerido por De Roover *et al.* (1999) para chicória sob seca e por Asega & Carvalho (2004) para plantas de *V. herbacea* submetidas à desfolhação, quando a FEH é ativada por um aumento da demanda de energia.

Aos 17 dias de experimento, 7 dias após a re-irrigação, ocorreu um aumento da razão fruto-oligo: fruto-polissacarídeos. Supõem-se que esse aumento tenha ocorrido, pelo menos em parte, devido à rebrota de novos ramos aéreos nessas plantas após a recuperação do status hídrico, tendo como substrato especialmente os frutanos de cadeias mais longas.

Assim como no experimento anterior, apresentado no capítulo I, as enzimas de síntese, SST e FFT, apresentaram, no decorrer do experimento, aumento de atividade antes da FEH nas plantas mantidas sob déficit hídrico. Em geral, a expressão gênica de frutossiltransferases parece ser principalmente controlada pelo nível de sacarose, que as induz positivamente, do que diretamente pela seca ou frio (Van den Ende & Van Laere 2007). Segundo De Roover (2000), uma seca suave diminui o crescimento, mas não a fotossíntese, levando a um excesso de sacarose, que age tanto na indução da biossíntese de frutanos quanto como substrato para a ação dessas enzimas.

Apesar de ter ocorrido diminuição da fotossíntese nas plantas tratadas logo no início do experimento, o conteúdo de sacarose permaneceu estável até o 7º dia, a partir do qual as enzimas de síntese passaram a atuar. Houve, então, a diminuição desse carboidrato, que voltou a aumentar provavelmente devido à ação da FEH e/ou translocação dos açúcares provenientes da senescência dos ramos aéreos a partir do 10º dia de deficiência hídrica. Esses resultados corroboram a hipótese de que, sob condições de seca, os carboidratos solúveis são necessários para manter a turgescência e a parte subterrânea da planta se torna um forte dreno, especialmente para a sacarose (Sharp 1990).

Entretanto, um efeito direto do frio e/ou seca na expressão de frutossiltransferases não pode ser excluído. Kawakami & Yoshida (2002) verificaram que o conteúdo de açúcares solúveis em trigo aumentou com o estresse hídrico. Adicionalmente, Xue *et al.* (2008) observou que o nível de RNA mensageiro das enzimas de síntese de frutanos foi correlacionado com o conteúdo desses carboidratos e a concentração de frutanos em trigo sob condições de seca, demonstrando

que a síntese de frutanos está intimamente associada a estresses abióticos. Em plantas jovens de chicória, De Roover *et al.* (2000) observaram que a seca induziu a atividade de SST.

A SST é a enzima que dá início à síntese de frutanos (Van den Ende & Van Laere 1996) e a FFT é responsável pelo padrão de distribuição do comprimento das cadeias de inulina (Hellwege *et al.* 1998). O aumento da atividade dessas enzimas observado nas plantas tratadas sugere sua atuação na síntese de frutanos de baixo peso molecular que, por sua vez, atuam na diminuição do potencial hídrico e na manutenção do teor de umidade nos tecidos do rizóforo.

Embora se saiba que a FEH e a SST apresentam atividades aumentadas em fases diferentes do desenvolvimento das plantas, há relatos na literatura da participação da FEH durante o processo de biossíntese de frutanos. Em trigo (Van de Ende *et al.* 2003), a FEH atua na diminuição do comprimento das ramificações das moléculas de frutanos durante a sua biossíntese (*triming process*). Em *Lolium temulentum* L. (Cairns *et al.* 1997) e *Smallanthus sonchifolius* (Poep.) H. Rob. (Itaya *et al.* 2002) também foram encontradas atividades concomitantes de FEH e SST durante o seu cultivo. Desse modo, podemos sugerir que, no presente trabalho, que a ação da FEH, junto às frutossiltransferases, tenha favorecido a redistribuição das moléculas de frutanos, permitindo a atuação desses compostos no ajuste osmótico das plantas.

A presença de frutanos nos rizóforos e as alterações verificadas no metabolismo destes carboidratos durante a imposição do déficit hídrico fornece evidências do seu papel na proteção das plantas durante a seca e também indica que este possa ser um dos fatores que diferenciam a resposta dos rizóforos e dos órgãos aéreos à seca nesta planta, conforme mencionado acima com respeito ao conteúdo de prolina.

Como *Vernonia herbacea* é uma espécie de cerrado, o qual está sujeito a períodos de seca durante o inverno (Eiten 1972), as mudanças no metabolismo de frutanos, nos teores de prolina e no status hídrico em plantas submetidas à deficiência de água constituem fortes indicadores do papel desses compostos na tolerância à seca e na adaptação dessas plantas a estresses ambientais, em especial, à restrição de água.

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., Nascimento, J.R.O., Schroeven, L., Van den Ende, W. & Carvalho, M.A.M.** 2008. Cloning, Characterization and Functional Analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Cell Physiology* 49: 1185–1195.
- Bajji, M., Lutts, S. & Kinet, J.** 2001. Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf age in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Science* 160: 669-681.
- Bates, L.S., Waldes, R.P. & Teare, I.D.** 1973. Rapid determination of proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207
- Blake, G.R.** 1965. Bulk density. *In*: C.A. Black, D.D. Evans, J.L. White, L.E. Ensminger & F.E. Clark, (eds.). *Methods of soil analysis* American Society of Agronomy, Madison, pp. 374-390.
- 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.
- Burgess, S.S.O.** 2006. Facing the challenge if seasonally dry environments. *Physiologia Plantarum* 127: 339-342.
- Cairns, A.J., Bonnett, G.D., Gallacher, J.A., Simpsons, R.J., Pollock, C.J.** 1997. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum*. VII. Sucrose and fructan hydrolysis by a fructan-polymerizing enzyme preparation. *New Phytologist* 136: 61-72.
- Carvalho, M.A.M., Asega, A.F. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2007. Fructans in Asteraceae from the Brazilian cerrado. *In*: N. Shiomi, N. Benkeblia & S. Onodera (eds.). *Recent advances in fucto-oligosaccharides research*. Research Signpost. Trivandrum, Índia, pp. 69-91.
- Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.C.** 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., 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: 281-285.
- 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.
- Clark, G.T., Zuther, E., Outred, H.A., McManus, M.T. & Heyer, A.G.** 2004. Tissue-specific changes in remobilization of fructan in the xerophytic tussock species *Festuca novae-zelandiae* in response to a water deficit. *Functional Plant Biology* 31: 377-389.

- Cuzzuol, G.R.F., Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P.** 2008. Fructan production in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby is related to adequate nitrogen supply and period of cultivation. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 95-103.
- De Roover, J., 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., Vandenbranden, K. Van Laere, A. & Van den Ende, W.** 2000. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Chicorium intybus* L.). *Planta* 210: 808-814.
- Delzenne, N.M. & Kok, N.** 2001. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *American Journal of Clinic Nutrition* 73: 456-458.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Itaya, N.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 Biology and Technology* 47: 363-373.
- Edelman, J. & Jefford, T. G.** 1968 The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* 67: 517-531.
- Eiten, G.** 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38: 201-341.
- 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 carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. *Revista Brasileira de Botânica* 9: 156-166.
- Funkhouser, E.A., Cairney, J., Chang, S., Dias, M.A.D.L & Newton, R.J.** 1994. Cellular and molecular responses to water deficits stress in woody plants. *In: M. Pessarakli (ed.) Handbook of plant and crop stress.* Marcel Dekker Inc., New York, pp. 347-362.
- Goudriaan, J. & Van Laar, H.H.** 1994. Modelling potential crop growth processes. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.
- Hanson, A.D. & Hitz W.D.** 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annual Review of Plant Physiology* 33:163-203.
- 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., Raap, M., Gritscher, D., Willmitzer, L., and Heyer, A.G.** 1998 Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. *FEBS Letters* 427: 25–28.

- 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.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. & Buitink, J.** 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends in Plant Science 6: 431-438.
- Iljin, W.S.** 1957. Drought resistance in plants and physiological processes. Plant Physiology 8: 257-274.
- Itaya, N.M., Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). Physiologia Plantarum 116: 451-459.
- Jermyn, M.A.** 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. Nature 177: 38-39.
- Jones, M.M. & Rawson, H.M.** 1979. Influence of the rate of development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency, and osmotic potential in sorghum. Physiologia Plantarum 45:103-111.
- Kawakami, A. & Yoshida, M.** 2002. Molecular characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyl transferase and sucrose:fructan 6-fructosyl transferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 66: 2297-2305.
- Kobata, T., Palta, J.A. & Turner, N.C.** 1992. Rate of development of postanthesis water deficits and grain filling in spring wheat. Crop Science 32:1238-1242.
- Koch, K.** 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. Annual Review of Plant Physiology 47: 509-540.
- 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
- Kramer, P.J.** 1995. Water relations of plants and soils. Academic Press, London.
- Lawlor, D.W. & Leach, J.E.** 1985. Leaf growth and water deficits: Biochemistry in relation to biophysics. *In* R.N. Baker, W.J. Davies & C.K. Ong (eds.). Society for Experimental Biology. Seminar Series, 27. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 267-294.
- 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., Bollert, T. & Wiemkem, A.** 1996. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus*. FEBS Letters 385: 39-42.

- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J.I., Damsz, B., Narasimhan, M.L., Hasegawa, P.M., Joly, R.J. & Bressan, R.A.** 2002. Does proline accumulation play a active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal* 3: 699-712.
- Mahajan, S. & Tuteja, N.** 2006. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139-158
- Mohammadkhani, N. & Heidari, R.** 2008. Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal* 3: 448-453.
- Morgan, J.M.** 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 299-319
- Munns, R.** 1988. Why measure osmotic adjustment? *Australian Journal of Plant Physiology* 15: 717-726.
- Palta, J.A., Kobata, T., Turner, N.C. & Fillery, I.R.** 1994. Remobilization of carbon and nitrogen in wheat as influenced by postanthesis water deficits. *Crop Science* 34:118-124.
- Pollock, C. J., Cairns, A.J., Sims, I.M. & Housley, T.L.** 1996. Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. *In: E. Zamski & A.A. Shaffer (eds.). Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source - Sink Relationships*, Marcel Dekker Inc, New York, pp. 97-113.
- Ramanjulu, S. & Bartels D.** 2002. Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environment* 25: 141-151.
- Ritsema, T. & Smeekens, S.** 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 223-230.
- Sharp, R.E.** 1990. Growth of the maize primary root at low water potentials. II. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiology* 93: 1337-1346.
- Smeekens, S.** 2000. Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 51: 49-81.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-63.
- Spollen, W.G. & Nelson, C.J.** 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* 106: 329-336.
- Tabaeizadeh, Z.** 1998. Drought-induced responses in plant cells. *International Review of Cytology* 182: 193-247.
- 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.
- Turner, N.C.** 1986. Adaptation to water deficits: a changing perspective. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 175-190.
- Valluru, R. & Van den Ende, W.** 2008. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany* 59: 2905-2916.

- 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., Van Hoenacker, G., Moors, S. & Van Laere, A.** 1998. Effect of osmolytes on the fructan pattern in feeder roots produced during forcing of chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology* 153: 290-298.
- 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. & Van Laere, A.** 2007. Fructans in dicotyledonous plants: occurrence and metabolism. *In*: N. Shiomi, N. Benkeblia & S. Onodera (eds.). Recent advances in fucto-oligosaccharides research. Research Signpost. Trivandrum, India, pp. 1-14.
- Van den Ende, W., Yoshida, M., Clerens, S., Vergauwen, R & Kawakami, A.** 2005. Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolase (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum* L.) *New Phytologist* 166: 917-932.
- Virgona, J.M. & Barlow, E.W.R.** 1991. Drought stress induces changes in the non-structural carbohydrate composition of wheat stems. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 239-247.
- Xue, G.P., McIntyre, C.L., Jenkins, C.L.D., Glassop, D., van Herwaarden, A.F. & Shorter, R.** 2008. Molecular dissection of variation in carbohydrate metabolism related to water-soluble carbohydrate accumulation in stems of wheat. *Plant Physiology* 146: 441-454.
- Yang, J., Zhang, J, Wang, Z., Zhu, Q. & Liu, L.** 2004. Activities of fructan and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* 220: 331-343.
- Zidenga, T.** 2006. Progress in molecular approaches to drought tolerance in crop plants. ISB News Report.

CAPÍTULO III

**Efeito do déficit hídrico em plantas submetidas a
diferentes regimes de rega**

Resumo

Frutanos são polímeros de frutose que atuam como carboidratos de reserva localizados no vacúolo de cerca de 15% das angiospermas. O metabolismo de frutanos tem um papel importante na tolerância de plantas ao frio e à seca. Como esses compostos são solúveis, eles atuam no ajuste osmótico das células variando o grau de polimerização das suas moléculas. Frutanos do tipo inulina são os principais carboidratos de reserva presentes nos órgãos subterrâneos das espécies de Asteraceae do cerrado. *Vernonia herbacea* encontra-se entre essas espécies e acumula aproximadamente 80% da massa seca dos órgãos subterrâneos em frutanos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo de frutanos por meio da análise da sua composição e da atividade das enzimas de síntese e mobilização destes compostos em plantas submetidas a diferentes regimes de rega (rega diária - controle, rega a cada 7 dias, rega a cada 14 dias e rega a cada 28 dias). As coletas foram realizadas no início do experimento e após 28 e 56 dias. Sob os diferentes regimes de rega, as plantas apresentaram diminuição do potencial hídrico (Ψ_w) na parte aérea e nos rizóforos e manutenção da turgescência e da fotossíntese, principalmente após o segundo ciclo de rega (56 dias). As plantas tratadas apresentaram maior razão fruto-oligossacarídeos:fruto-polissacarídeos, sugerindo que os frutanos de cadeias curtas estejam associados à redução do Ψ_w das células e manutenção da turgescência. A habilidade de sintetizar frutanos correlaciona-se com a sobrevivência das plantas sob condições de seca, indicando um papel importante desses carboidratos em plantas sob condições ambientais adversas.

Palavras-chave: aclimatação, cerrado, frutanos, regime de regas.

Abstract

Fructans are polyfructose molecules that act as reserve carbohydrates and are located in the vacuoles of 15% of the angiosperms. Fructan metabolism plays a significant role in drought and cold tolerance in plants. Because these compounds are soluble, they might play a role in the osmotic adjustment of cells by varying the degree of polymerization of the fructan pool. Fructans of the inulin type are the main reserve carbohydrates present in the underground organs of Asteraceae species from the cerrado. *Vernonia herbacea* is one of this species and the plants accumulate about 80% of inulin-type fructans in the underground organs (rhizophores). The aim of this work was to analyze the fructan composition and metabolism in plants submitted to different irrigation frequencies (daily watering – control and watering every 7, 14 and 28 days). Samplings were done at the beginning of experiment and after 28 and 56 days. Plants kept under different watering frequencies showed a decrease in water potential (Ψ_w) of shoots and rhizophores and maintenance of turgor and photosynthesis, mainly after the second irrigation cycle (56 days). Treated plants presented a higher ratio oligosaccharides:polysaccharides, suggesting that short chain fructans act in Ψ_w reduction and in turgor maintenance. The ability of plants to synthesize fructans correlates with their survival in drought conditions, indicating a significant role for fructans under these harsh conditions.

Key words: acclimation, cerrado, fructans, irrigation frequencies.

Introdução

Depois do amido e da sacarose, os frutanos são os carboidratos de maior ocorrência nos vegetais superiores (Hendry & Wallace 1993). Entre as angiospermas esses polímeros são encontrados em cerca de 15% da flora contemporânea, especialmente em plantas de ordens mais evoluídas (Hendry 1993).

Frutanos são polímeros de frutose, sintetizados a partir da adição de unidades de frutose à sacarose. Os frutanos do tipo inulina, encontrados comumente em espécies de Asteraceae, são baseados no trissacarídeo 1-cestose e apresentam unidades de frutose unidas por ligações do tipo β (2,1), e os frutanos do tipo levano ou fleano, 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. Além destes dois tipos, 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), nos quais a glucose é interna à molécula (Pollock *et al.* 1996).

Nas células, os frutanos e as enzimas envolvidas em seu metabolismo são encontrados na forma solúvel no vacúolo (Frehner *et al.* 1984), embora existam evidências da ocorrência destes carboidratos nos tecidos do xilema e floema (Vieira & Figueiredo-Ribeiro 1993, Wang & Nobel 1998, Ernst & Pfenning 2000) e no fluido apoplástico (Livingston & Henson 1998, Van den Ende *et al.* 2000), no qual detectou-se, também, a presença de exoidrolases (Livingston & Henson 1998, Van den Ende *et al.* 2005).

A síntese de inulina inicia-se com a formação do trissacarídeo 1-cestose e a liberação de uma molécula de glucose a partir de duas moléculas de sacarose, pela ação da sacarose:sacarose frutossiltransferase (SST). Em seguida, a frutano:frutano frutossiltransferase (FFT) catalisa o alongamento da cadeia pela transferência de resíduos de frutose de uma molécula doadora para uma receptora. A FFT também atua na redistribuição das unidades de frutose podendo promover a diminuição do comprimento das cadeias. A hidrólise de frutanos ocorre pela remoção seqüencial dos resíduos terminais de frutose por uma frutano-exohidrolase (FEH). Esta enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose, sendo a enzima fortemente inibida por este dissacarídeo (Edelman & Jefford 1968, Koopes & Jonker 1996, Lüscher *et al.* 1996, Van den Ende & Van Laere 1996).

A maioria das espécies ricas em frutanos encontra-se fora da região tropical, sendo estas mais abundantes em áreas onde o crescimento das plantas é sazonal (Hendry & Wallace 1993).

Estes autores sugeriram que a ocorrência de quantidades apreciáveis deste carboidrato em plantas consideradas evoluídas indica que os frutanos não constituem apenas mais uma diversificação biológica, mas também que existe um significado evolutivo para o seu aparecimento.

Os frutanos são armazenados quando a produção de fotoassimilados excede a demanda e são mobilizados em geral quando há necessidade de energia (Ritsema & Smeekens 2003). Em tecidos fotossintéticos, os frutanos armazenados nos vacúolos servem como uma reserva transitória de sacarose, prevenindo a inibição da fotossíntese induzida por açúcares. Em tecidos dreno, a polimerização da sacarose em frutanos é importante para a manutenção do gradiente de sacarose entre os tecidos de armazenamento e o floema, garantindo sua translocação para esses tecidos (Pollock & Cairns 1991). Os frutanos são acumulados durante o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Contudo, alterações em sua concentração e composição, bem como nas atividades das enzimas do seu metabolismo podem estar associadas a variações no ambiente. Sob condições de déficit hídrico, por exemplo, plantas de trigo e chicória apresentaram síntese desses carboidratos (Kerepesi *et al.* 1998, De Roover *et al.* 2000), em gramíneas forrageiras ocorreram alterações no tamanho de suas cadeias (Volaire *et al.* 1998, Thomas & James 1999) e em festuca alta houve diminuição em seu conteúdo (Spollen & Nelson 1994).

Portanto, além de seu papel de reserva, os frutanos possuem outras funções fisiológicas, favorecendo o crescimento e o desenvolvimento das plantas mesmo sob condições limitantes no ambiente, como o frio e a seca (Pilon-Smits *et al.* 1995, 1999, Van den Ende *et al.* 2000). Nessas condições, estes polímeros parecem atuar na regulação osmótica da célula, através da variação do grau de polimerização de suas moléculas (Pontis & Del Campillo 1985, Pilon-Smits *et al.* 1995, Van den Ende *et al.* 2002), além de prevenir danos à membrana celular, mantendo sua integridade e o funcionamento celular (Demel *et al.* 1998, Vereyken *et al.* 2001).

O estresse hídrico por falta de água é um dos fatores ambientais mais importantes que podem regular o crescimento e desenvolvimento, limitando a produção (Jones & Corlett 1992) e levando também a alterações nas características fisiológicas e bioquímicas das plantas (Zobayed *et al.* 2007). Desse modo, a sobrevivência das plantas sob tais condições estressantes depende em grande extensão da habilidade que as mesmas têm de perceber o estímulo, gerar e transmitir o sinal e iniciar várias alterações fisiológicas e bioquímicas (Bohnert & Jansen 1996; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 1997).

O déficit hídrico se estabelece quando a absorção de água pelo sistema radicular não atende às demandas da planta (Fan *et al.* 2006). Entre as principais demandas estão a fotossíntese

e a transpiração da parte aérea, dois processos essenciais ao crescimento da planta. Antes que o déficit hídrico se estabeleça, as raízes devem comunicar a ocorrência do estresse à parte aérea, o que gera uma resposta integrada da planta permitindo sua sobrevivência até que a disponibilidade de água aumente. Esta sinalização é feita por vários meios além da redução no fluxo ascendente de água (Davies & Zhang 1991). Segundo esses mesmos autores, muitas dessas respostas envolvem a ação de genes, mas os avanços na biologia molecular de resposta a seca serão insuficientes se não estiverem associados ao entendimento da bioquímica e fisiologia de plantas sob déficit hídrico. Entender as alterações fisiológicas e bioquímicas induzidas pelo déficit hídrico é primordial, portanto, para entender as respostas da planta ao estresse e como essas alterações influenciam o crescimento e o desenvolvimento da planta.

Cumprido ressaltar que, de modo geral, tais respostas levam primeiro à aclimatação e, posteriormente, quando o estresse hídrico torna-se mais severo ocorrem danos funcionais e perdas de parte das plantas (Chaves *et al.* 2003). Durante a fase de aclimatação, o déficit hídrico tipicamente resulta em diminuições nas taxas de crescimento devido à inibição da expansão celular e reduções na assimilação do carbono (Osorio *et al.* 1998), bem como, na utilização dos carboidratos, por alterar, basicamente, a eficiência com que os fotoassimilados são convertidos para o desenvolvimento de partes novas na planta, ocasionando mudanças na partição dos carboidratos (Hsiao & Xu 2000) e condicionando as plantas a desenvolverem mecanismos de adaptação e tolerância à seca (Jordan 1983).

Um dos mecanismos de controle do potencial de água é a geração de solutos osmoticamente ativos. Entre esses solutos, os carboidratos são elementos-chave, pois podem ser armazenados tanto na forma de polissacarídeos com baixa atividade osmótica como o amido, quanto na forma de açúcares altamente solúveis e higroscópicos como a sacarose e hexoses (Buckeridge *et al.* 2000).

Conforme já descrito nos capítulos anteriores, 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.

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby é uma espécie perene, de ampla ocorrência nesta área de cerrado, que apresenta crescimento sazonal e órgãos subterrâneos, de origem caulinar,

denominados rizóforos. Estes órgãos são responsáveis pela reprodução vegetativa da espécie, além de atuarem como órgãos de reserva para a planta, acumulando até 80% de sua massa seca em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich 1993).

Experimentos de suspensão de rega realizados com *V. herbacea* mostraram que essas plantas são capazes de reter água nos seus órgãos subterrâneos de reserva por longos períodos enquanto a umidade do solo diminui (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004). Os autores verificaram um aumento da razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos, paralelamente ao aumento da concentração de frutose nessas condições, sugerindo que a tolerância das plantas ao déficit hídrico deve-se à mobilização dos frutanos nessas condições e ao ajuste osmótico efetuado por esses carboidratos.

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. Como os mecanismos pelos quais os frutanos desempenham esses papéis ainda não foram completamente elucidados, o estudo da influência do déficit hídrico no metabolismo desses açúcares em uma planta nativa do cerrado torna-se importante para a sua compreensão. Neste contexto, uma abordagem combinada de parâmetros ecofisiológicos e bioquímicos pode fornecer informações novas e valiosas que facilitem o entendimento dos processos de regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições de déficit hídrico. Tais informações serão também relevantes na criação de modelos de distribuição das espécies nativas em resposta a alterações climáticas.

Material e Métodos

Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby com aproximadamente um ano de idade, obtidas por propagação vegetativa a partir de fragmentos de rizóforos de plantas adultas, coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, SP (22° 18' S, 47° 11' W) (Carvalho *et al.* 1997). As plantas foram cultivadas em vasos individuais de 3 litros contendo terra de cerrado e mantidas em casa de vegetação durante todo o período experimental. Foram efetuadas medidas diárias das temperaturas máxima e mínima, com as quais calculou-se a temperatura média compensada ($T_D = (0,29.T_{\min}) + (0,71.T_{\max})$), conforme Goudriaan & Laar 1994, assim como medidas da umidade relativa do ar, calculada com base nas leituras dos termômetros de bulbo úmido e seco realizadas as 07:00 e 14:00 h.

Tratamento e amostragem

As plantas foram divididas em 4 lotes que foram irrigados diariamente (controle) e a cada 7, 14 e 28 dias durante 56 dias. As coletas foram realizadas no início do experimento (T0) e aos 28 e 56 dias após o início da aplicação dos diferentes regimes de rega.

Em cada ponto de amostragem foram coletadas 3 amostras de cada tratamento, sendo que cada amostra foi constituída de 3 plantas. Após lavagem e congelamento em nitrogênio líquido, amostras de rizóforos foram armazenadas a -80 °C até a realização das extrações de carboidratos, enzimas e prolina. Foram feitas determinações da massa de matéria fresca (MF) e seca (MS) da parte aérea, rizóforos e raízes, assim como medidas de potencial hídrico das folhas e do solo em cada ponto de amostragem. As coletas foram realizadas entre 7:00 e 9:00 h, aproximadamente.

Umidade do solo (U_{solo}) e potencial hídrico do solo ($\Psi_{\text{w solo}}$)

A cada amostragem de plantas para as análises bioquímicas, a umidade do solo nos vasos foi determinada por gravimetria (Blake 1965). Para tal, amostras de solo foram obtidas de cada vaso utilizando-se anéis volumétricos de 80 cm³, sendo determinados o peso fresco imediatamente após a coleta e o peso seco após 72 h de secagem da amostra em estufa ventilada a 70°C. A umidade do solo (U_{solo}) foi calculada a partir da fórmula:

$$U_{\text{solo}}(\%) = \frac{MF - MS}{MS - Ta} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

MF = massa fresca da amostra de solo;

MS = massa seca da amostra de solo;

Ta = tara do anel volumétrico.

Nas mesmas amostras coletadas conforme descrito anteriormente para determinação da U_{solo} , foram realizadas medidas pontuais do $\Psi_{w \text{ solo}}$. Para tal, utilizou-se um psicrômetro de ponto de orvalho (Modelo Decagon WP4). As medidas foram realizadas entre 9:00 e 11:00 h.

Conteúdo de água (%)

O conteúdo de água da parte aérea e do rizóforo foi determinado a partir da fórmula:

$$TU(\%) = \frac{MF - MS}{MF} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

MF = massa fresca da amostra, determinada imediatamente após a coleta;

MS = massa seca da amostra após secagem em estufa a 60 °C (parte aérea) e após liofilização (rizóforos).

Potencial hídrico da parte aérea (Ψ_{wpa}) e do rizóforo (Ψ_{wrz})

Foram realizadas medidas do Ψ_{wpa} das plantas no período da antemãhã, entre 4:00 e 5:00 h. Para tal foi utilizada uma bomba de pressão tipo Scholander, Modelo 1000 (PMS Instrument Co., UTAH, EUA).

O Ψ_{wrz} foi medido no suco celular extraído dos rizóforos, utilizando-se um microvoltímetro de ponto de orvalho modelo HR-33T (Wescor, Logan-UTAH) e câmaras psicrométricas modelo C-52 (Weser) com o aparelho trabalhando no modo higrométrico, no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto Agrônômico. O suco celular previamente coletado dos rizóforos foi armazenado em tubos tipo *ependorf* e congelado até o momento das medidas. Para cada medida foram utilizados 10 μ L de suco celular.

Taxas de assimilação líquida de CO₂ (A), condutância estomática (g_s) e transpiração (E)

Medidas instantâneas de assimilação líquida de CO₂(A) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s) ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e transpiração (E) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram realizadas entre 09:00 e 12:00 h, sob condições saturantes de luz (PAR= 450 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e temperatura controlada de 28 ± 2 °C, (Cuzzuol *et al.* 2008), utilizando-se um analisador de gases no infravermelho (IRGA; CIRAS-2, PP Systems). As medidas foram realizadas na primeira folha totalmente expandida, a partir do ápice, em 3 plantas de cada tratamento. A eficiência do uso da água (EUA) foi calculada como a relação entre a assimilação líquida e a transpiração (EUA = A/E).

Dosagem de prolina livre

A estimativa do teor de prolina livre foi realizada conforme a metodologia de Bates *et al.* (1973). Amostras de tecido vegetal previamente liofilizadas foram maceradas em ácido sulfossalicílico 3%. Após centrifugação a 3000 g, o sobrenadante foi coletado e alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio contendo ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina; 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico 6 M) e ácido acético glacial concentrado. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e os tubos hermeticamente fechados foram acondicionados em banho-maria, a 100 °C, durante 1 hora. A reação foi interrompida por meio de uma redução imediata da temperatura em banho de gelo. Em seguida, tolueno foi adicionado ao meio de reação e, após agitação vigorosa por aproximadamente 15 s, duas fases foram formadas: a fase aquosa superior, de coloração avermelhada (cromóforo + tolueno) foi recuperada e submetida a uma leitura em espectrofotômetro, a 520 nm. Os teores de prolina foram estimados com base em uma reta padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de L-prolina.

Extração enzimática

A extração e determinação das atividades enzimáticas foram realizadas conforme descrito em Asega & Carvalho (2004). Os rizóforos foram homogeneizados em tampão citrato-fosfato (McIlvaine) 50 mM pH 5,5, contendo 2 mM de EDTA, 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β -mercaptoetanol e 10% de polivinil polivinilpolipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi mantido em repouso por 30 min e, em seguida, filtrado em nylon duplo. Ao filtrado foi

adicionado sulfato de amônio a 20% de saturação, sendo a mistura mantida em repouso por uma noite. Após centrifugação a 12000 g por 20 min a 5 °C, o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 80% de saturação. A mistura foi mantida em repouso por 1 hora. Após centrifugação por 20 min a 17000 g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado no tampão de extração. O extrato foi dessalinizado em colunas de Bio Gel P-6 DG e submetido aos ensaios de atividade enzimática. Toda a manipulação do material durante a extração foi realizada a 5 °C. O conteúdo de proteína nos extratos foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (Sigma) ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) como padrão.

Ensaio Enzimático

As misturas de incubação foram constituídas de extrato enzimático e substratos na proporção de 1:1 (v/v). Os substratos foram preparados em tampão Mc Ilvaine 50 mM, pH 4,5. Os extratos foram incubados a 30 °C utilizando-se substratos nas concentrações finais de 200 mM de sacarose (Sigma) para a atividade de SST, 50 mM de sacarose (Sigma) para a atividade de invertase, 200 mM de 1-cestose para a atividade de FFT e 5% de inulina de *Helianthus tuberosus* (Sigma) para a atividade de FEH. O tempo de incubação foi de 1 hora para a atividade da SST e da FFT, 4 h para a invertase e de 30 min para a FEH. As misturas de incubação foram submetidas à fervura para interrupção da reação.

Análise das Atividades Enzimáticas

Para a determinação das atividades da SST e FFT, amostras das misturas de incubação foram diluídas (200x) em água deionizada e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema de cromatografia Dionex modelo ICS-3000, utilizando-se coluna CarboPac PA-1 (2 x 250 mM). A eluição dos carboidratos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH) com a seguinte programação: 0 - 2 min, 25 mM; 2,1 - 8 min, 50 mM; 8,1 - 10 min, 350 mM; 10,1 - 12 min, 500 mM; 12,1 - 17 min, 25 mM. Os potenciais aplicados ao PAD para 0 - 0,4 s, 0,41 - 0,6 s, 0,61 - 1 s foram 0,05, 0,75 e -0,15, respectivamente e o fluxo aplicado foi de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$. A quantificação foi feita através da área do pico da 1-cestose e nistose, para atividades da SST e

FFT, respectivamente, utilizando padrão externo. A atividade de FEH foi determinada pela quantidade de frutose liberada na mistura de incubação, por quantificação do açúcar redutor (Somogyi 1945), utilizando frutose (Sigma) como padrão. Para a determinação da atividade da invertase, as misturas de incubação foram analisadas por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo ICS-3000, utilizando-se coluna CarboPac PA-1 (2 X 250 mm) e programa isocrático de 100 mM de hidróxido de sódio. Os potenciais aplicados ao PAD para 0 - 0,4 s, 0,41 - 0,6 s, 0,61 - 1 s foram 0,05, 0,75 e -0,15, respectivamente e o fluxo aplicado foi de 0,25 mL min⁻¹. A atividade de invertase foi determinada pela área do pico da frutose, utilizando-se padrão externo.

Extração de carboidratos solúveis

Amostras liofilizadas de rizóforos foram pesadas para a determinação da massa de matéria seca e, então, submetidas à extração de carboidratos conforme Carvalho *et al.* (1998) modificado. As amostras foram pulverizadas em almofariz, colocadas em etanol 80% e mantidas em banho-maria a 80 °C por 15 min, sendo então centrifugadas a 700 g por 15 min. Os precipitados foram re-extraídos duas vezes. Os sobrenadantes etanólicos foram reunidos e reservados. Os resíduos finais foram extraídos duas vezes em água a 60 °C por 30 min e filtrados a vácuo em tecido de algodão. Os sobrenadantes etanólicos e os filtrados aquosos foram reunidos, concentrados em evaporador rotatório e o extrato final (extrato bruto) foi submetido à precipitação a frio com três volumes de etanol, para separação das frações de fruto-oligo (sobrenadante) e polissacarídeos (precipitado) após centrifugação a 2900 g por 10 min a 5 °C. O sobrenadante, contendo a fração de fruto-oligossacarídeos, foi concentrado em evaporador rotatório para a retirada de etanol, e o precipitado que consistiu da fração de polissacarídeos foi ressuspendido e solubilizado em água.

Análise quantitativa e qualitativa dos frutanos

Os conteúdos de frutose livre e ligada foram determinados no extrato bruto e nas frações de fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos, separadamente, pelo método de antrona modificado (Jermyn 1956) para cetoses. Os teores de frutanos foram estimados com base em uma reta padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de frutose.

Para as análises qualitativas, as amostras de fruto-oligossacarídeos foram submetidas à deionização em colunas de troca iônica contendo resinas nas formas catiônicas (Dowex 50 WX8 - 100) e aniônica (Dowex 1 X 8 - 100) (Carvalho & Dietrich 1993). Em seguida foram filtradas

em membranas de 0,45 μm e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex modelo ICS 3000 utilizando coluna CarboPac PA1 (2 X 250 mm) e concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em equivalentes de frutose, conforme Asega *et al.* (2008). O gradiente para separação dos componentes da série homóloga da inulina 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) na 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. O conteúdo de glucose, frutose, sacarose, 1-kestose e nistose foi estimado pelas respectivas áreas dos picos referentes a cada um destes açúcares, utilizando-se padrões externos.

Resultados

Na figura 1 são apresentados os dados de temperatura e umidade relativa do ar durante os 56 dias de experimento. Cada ponto do gráfico representa a média semanal dos dados obtidos. Pode-se observar que a umidade relativa do ar das quatro últimas semanas do período experimental (equivalentes ao período de 28 a 56 dias) foi mais elevada do que nas primeiras quatro semanas (equivalentes ao período anterior à coleta realizada aos 28 dias).

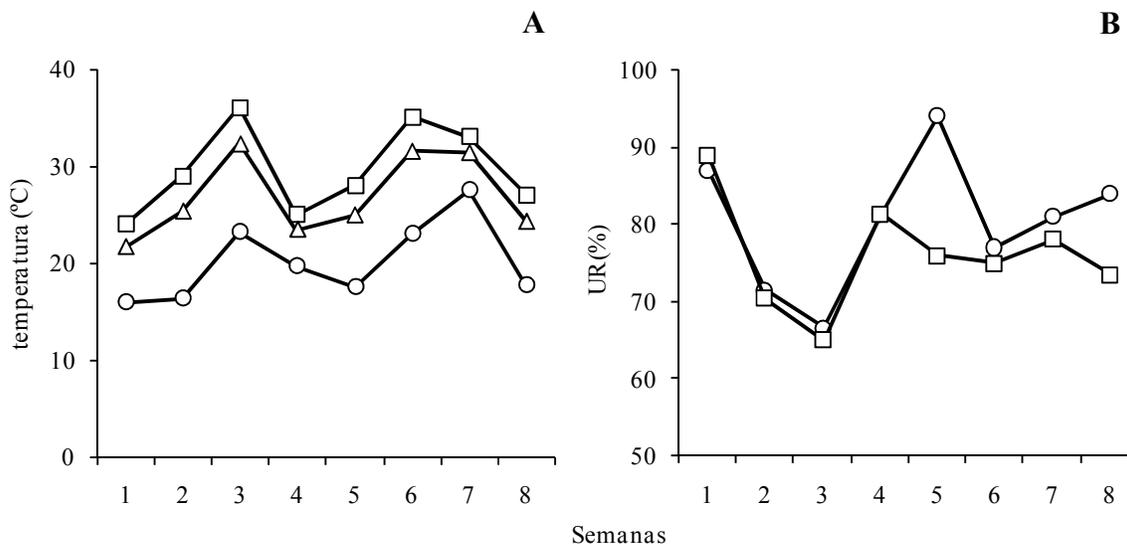


Figura 1– (A) medidas semanais da temperatura máxima (□), mínima (○) e média (Δ) do ar e (B) medidas da umidade relativa do ar observadas nos períodos da manhã (○) e da tarde (□).

O regime de rega de 28 dias gerou um potencial hídrico inferior a -15 MPa e umidade inferior a 5% no solo, nas coletas de 28 e 56 dias (Figura 2). Observa-se que os valores obtidos na coleta realizada aos 56 dias foram mais elevados em todos os regimes de rega (Figura 2).

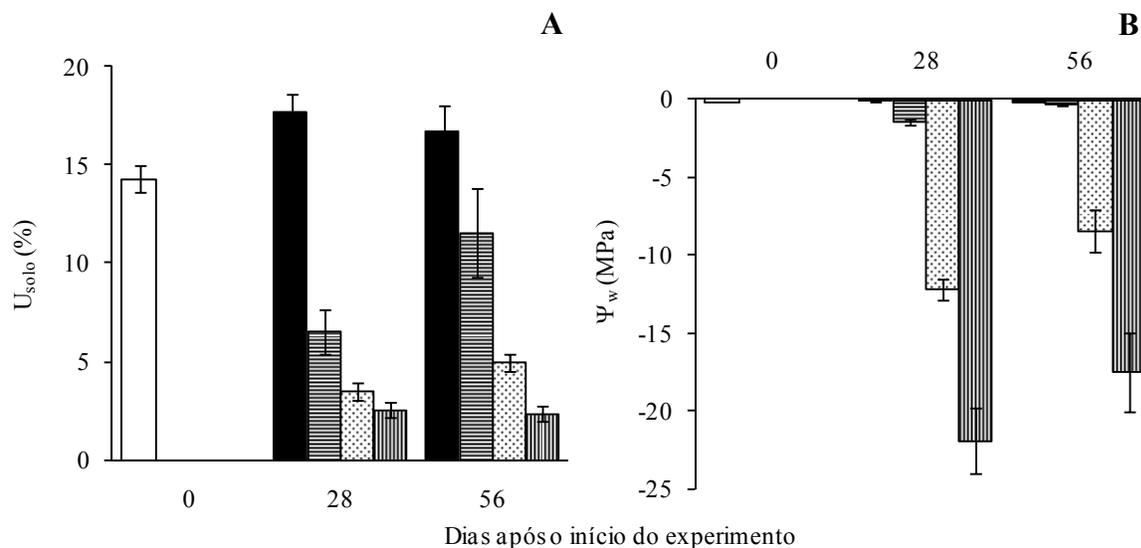


Figura 2 – Umidade (A) e potencial hídrico do solo (B) dos vasos submetidos a diferentes regimes de rega (tempo zero □, controle - rega diária ■, e rega a cada 7 ▨, 14 ▩ e 28 dias ▧). As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

As plantas mantidas sob os regimes de rega de 14 e 28 dias sofreram senescência da parte aérea antes da primeira coleta, realizada 28 dias após o início do experimento. Na segunda coleta, aos 56 dias, as plantas mantidas sob o regime de rega de 14 dias apresentaram rebrota da parte aérea (Figura 3). Já as plantas em regime de rega de 28 dias não rebrotaram e seus rizóforos apresentaram um grau elevado de desidratação, tornando-se inviáveis para realização das análises bioquímicas.



Figura 3 - Plantas de *Vernonia herbacea* mantidas sob regime de rega a cada 14 dias com rebrota de novos ramos aéreos (setas) aos 50 dias de experimento.

Aos 28 dias de experimento, as plantas apresentaram uma diminuição do teor de umidade tanto da parte aérea quanto do rizóforo (Figura 4). Essa diminuição foi mais acentuada em plantas mantidas sob o regime de rega de 14 e 28 dias do que nas mantidas sob regime de rega de 7 dias. Neste mesmo período, os rizóforos apresentaram uma diminuição mais acentuada do teor de umidade quanto maior foi o período de deficiência hídrica (ou quanto menor a frequência de rega) (Figura 4B). Aos 56 dias, o teor de umidade da parte aérea diminuiu apenas sob regime de rega de 14 dias enquanto o do rizóforo não sofreu alterações (Figura 4A).

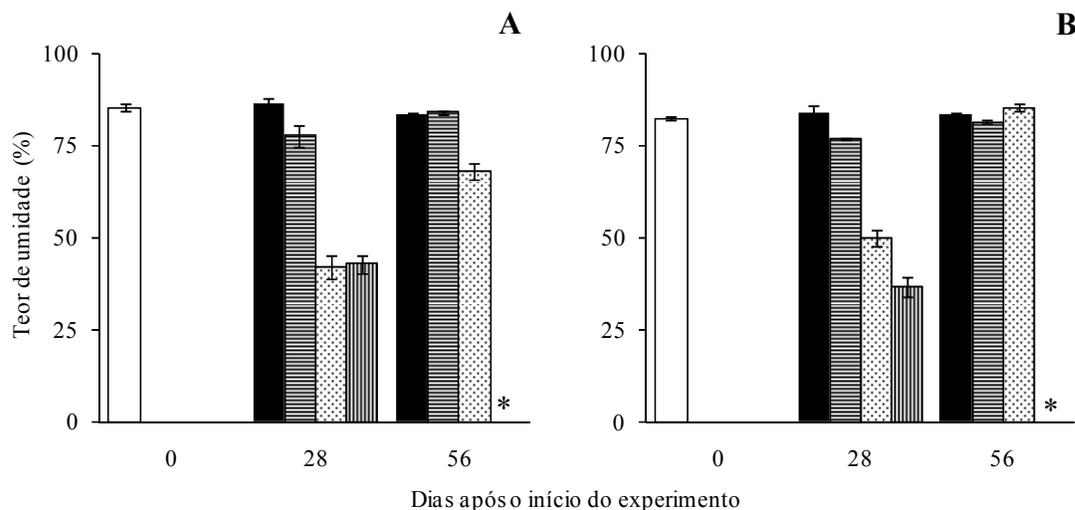


Figura 4 – Teor de umidade (%) da parte aérea (A) e dos rizóforos (B) de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes regimes de rega (tempo zero □, controle - rega diária ■, e rega a cada 7 dias ▨, 14 dias ▩ e 28 dias ▪). As barras indicam o erro padrão da média (n=3). * - n.d. devido à senescência dos tecidos.

Os períodos de deficiência hídrica impostos às plantas pela aplicação de diferentes regimes de rega foram suficientes para gerar um gradiente de potencial hídrico nas folhas (Figura 5A). Em plantas regadas a cada 14 dias, o potencial hídrico foi cerca de -1,0 MPa nas folhas coletadas aos 56 dias. O regime de rega a cada 28 dias gerou um potencial hídrico de aproximadamente -7,0 MPa na seiva dos rizóforos coletados aos 28 dias (Figura 5B). Medidas de potencial hídrico da parte aérea das plantas regadas a cada 14 e 28 dias na primeira coleta, aos 28 dias e das regadas a cada 28 dias na segunda coleta, aos 56 dias, não foram realizadas devido à senescência. Da mesma forma, medidas de potencial osmótico dos rizóforos das plantas regadas a cada 28 dias na segunda coleta, aos 56 dias, não foram realizadas devido à senescência dos mesmos.

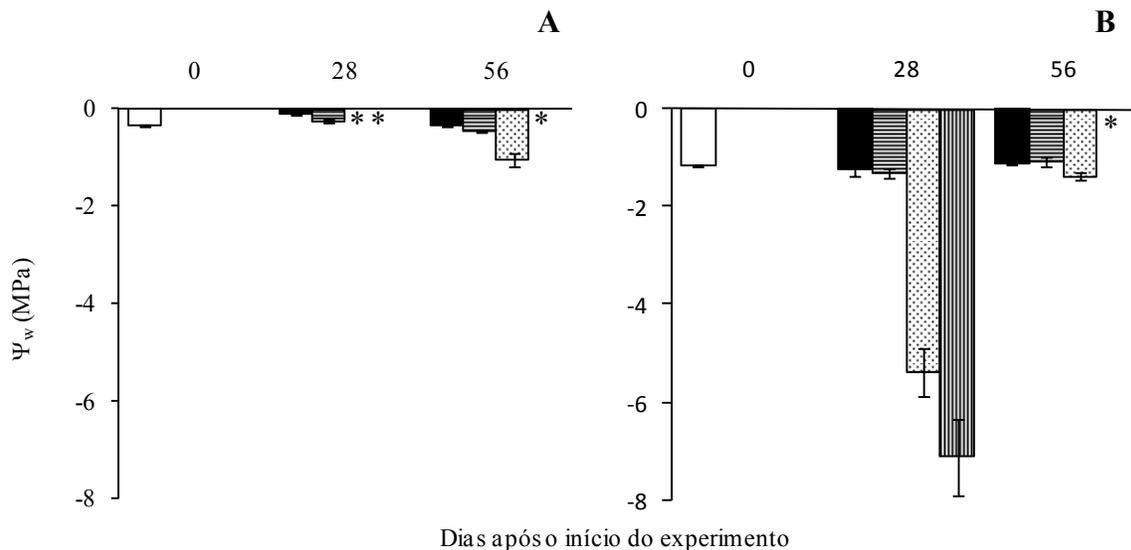


Figura 5 – Potencial hídrico (Ψ_w) da parte aérea (A) e dos rizóforos (B) de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes regimes de rega (tempo zero □, controle - rega diária ■, e rega a cada 7 ≡, 14 ▨ e 28 dias ▩). As barras indicam o erro padrão da média (n=3). * - n.d. devido à senescência dos tecidos.

Mesmo com valores baixos de potencial hídrico e umidade do solo (Figura 2), as plantas sob os regimes de rega de 7 e 14 dias, que foram coletadas aos 56 dias, mantiveram a turgescência tanto da parte aérea quanto do rizóforo (Figura 4) e valores de potencial hídrico da parte aérea mais negativos quando comparados aos obtidos aos 28 dias de experimento (Figura 5A).

Aos 28 dias, as plantas mantidas sob o regime de rega de 7 dias apresentaram diminuição da taxa fotossintética quando comparadas com as plantas controle (Figura 6A). A mesma resposta ocorreu nos dados de transpiração e condutância estomática (Figura 6B e C). Por outro lado, essas plantas apresentaram uma eficiência do uso da água semelhante à das plantas controle (Figura 6D). Ainda aos 28 dias, as plantas mantidas sob o regime de rega de 14 dias apresentaram valores de taxa fotossintética, transpiração, condutância estomática e eficiência do uso da água bastante inferiores aos verificados sob regime de 7 dias (Figura 6).

Aos 56 dias, as plantas mantidas sob o regime de rega de 7 dias não apresentaram diferenças em suas taxas fotossintéticas quando comparadas às plantas controle (Figura 6A). Entretanto, apresentaram redução da transpiração (Figura 6B), provavelmente pela diminuição da abertura estomática, confirmada pelos menores valores de condutância estomática (Figura 6C) e uma maior eficiência do uso da água (Figura 6D).

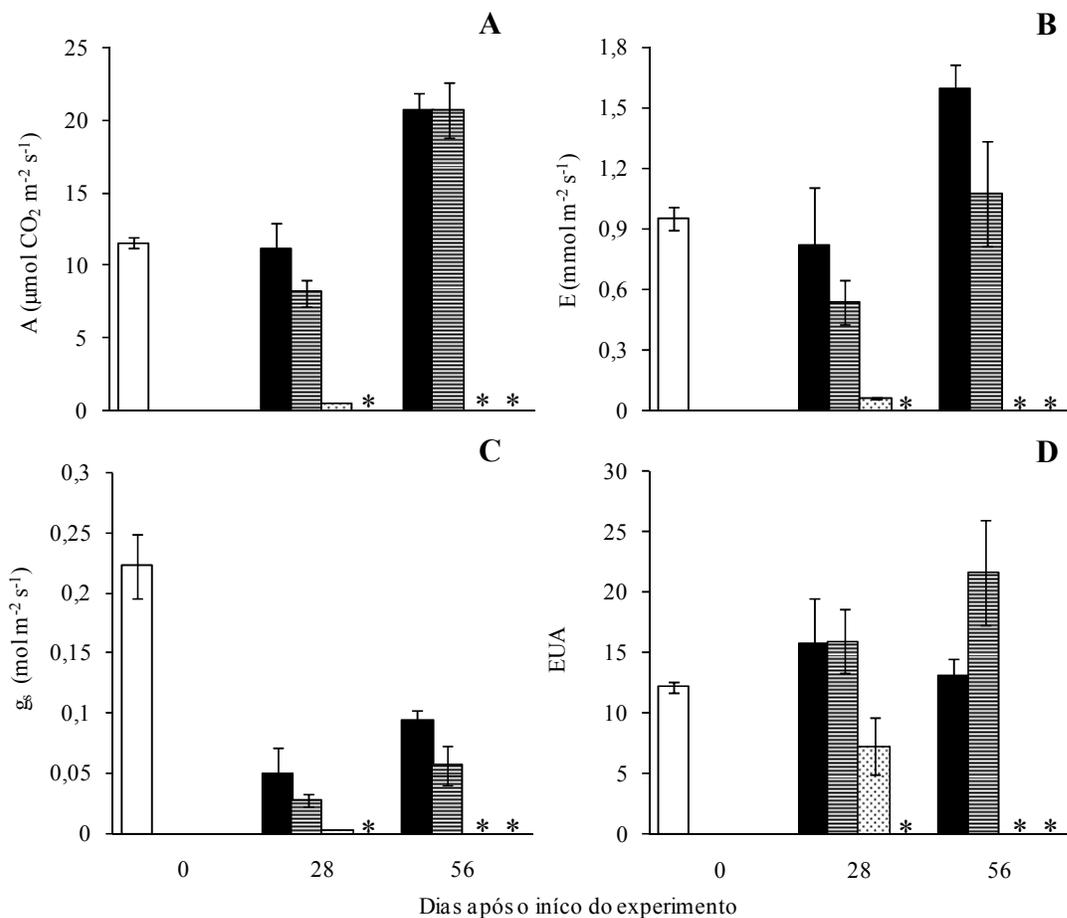


Figura 6 – Assimilação fotossintética (A), condutância estomática (B), transpiração (C) e eficiência do uso da água (EUA) (D) de folhas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes regimes de rega (tempo zero □, controle - rega diária ■, e rega a cada 7 ≡, 14 ▤ e 28 dias ▨). As barras indicam o erro padrão da média (n=3). * - n.d. devido à senescência dos tecidos.

Aos 28 dias do início do experimento, o conteúdo de prolina tanto das folhas como do rizóforo foi mais elevado nas plantas mantidas sob deficiência hídrica e aumentou com o aumento de intervalo entre as regas (Figura 7A). Observou-se, porém, que nas folhas o conteúdo foi, em geral, mais elevado do que nos rizóforos (Figura 7B). Aos 56 dias, o teor de prolina foi bem inferior ao detectado aos 28 dias e os teores mais elevados foram detectados em rizóforos de plantas regadas a cada 14 dias (Figura 7B) e em folhas de plantas regadas a cada 7 e 14 dias (Figura 7A).

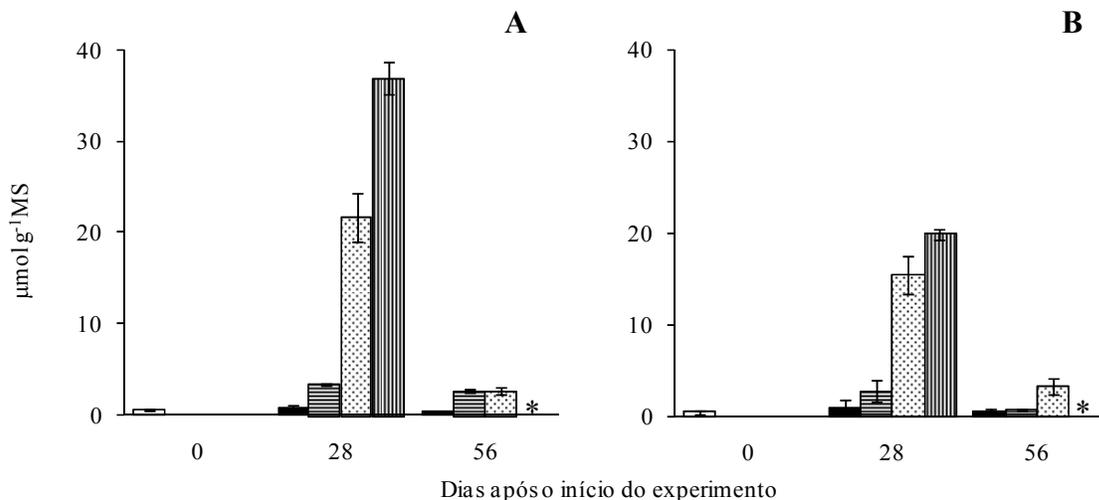


Figura 7 – Conteúdo de prolina das folhas (A) e rizóforos (B) de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes regimes de rega (tempo zero □, controle - rega diária ■, e rega a cada 7 dias ▨, 14 dias ▩ e 28 dias ▧). As barras indicam o erro padrão da média (n=3). * - n.d. devido à senescência dos tecidos.

A figura 8 mostra a atividade das enzimas do metabolismo de frutanos. A atividade mais elevada foi a da FFT, seguida da SST, FEH e invertase. No primeiro ciclo de regas (28 dias), a atividade da SST nas plantas tratadas foi inferior a de plantas controle. No segundo ciclo de rega (56 dias), a atividade dessa enzima aumentou nas plantas sob regime de rega de 14 dias (Figura 8A). Aos 28 dias, a FFT apresentou redução de sua atividade com o aumento do intervalo entre as regas, enquanto aos 56 dias não houve alterações entre os tratamentos (Figura 8B). A FEH apresentou aumento aos 28 dias em plantas regadas a cada 14 e 28 dias e, aos 56 dias, um aumento pronunciado da atividade foi observado em plantas regadas a cada 7 e 14 dias. Aos 28 dias, não se detectou atividade de invertase nas plantas controle. Esta atividade foi observada em plantas submetidas aos 3 regimes de rega aplicados, porém com valor mais elevado naquelas regadas a cada 14 dias. Aos 56 dias, a atividade apresentada foi muito inferior a encontrada aos 28 dias.

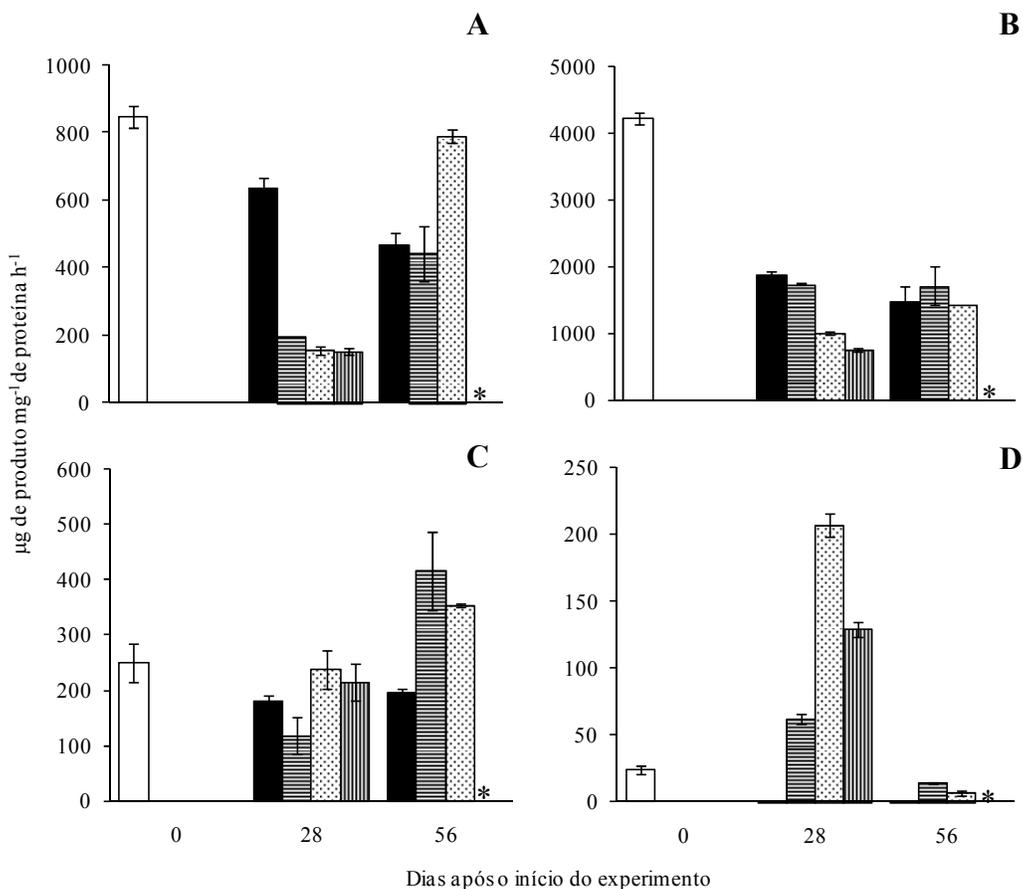


Figura 8 - Atividade da SST (A), FFT (B), FEH (C) e invertase (D) em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes regimes de rega (tempo zero □, controle - rega diária ■ e rega a cada 7 ▨, 14 ▩ e 28 dias ▧). As barras indicam o erro padrão da média (n=3). * - n.d. devido à senescência dos tecidos.

O conteúdo de frutanos totais diminuiu nas plantas mantidas sob regime de 14 e 28 dias na primeira coleta (28 dias). Aos 56 dias não foram detectadas variações nesses teores (Figura 9A). Os oligossacarídeos, em geral, diminuíram gradualmente com o aumento de intervalo de regas em ambas as coletas (Figura 9B). Já os polissacarídeos apresentaram um perfil de variação diferente dos oligossacarídeos, aumentando em plantas regadas a cada 7 dias e diminuindo naquelas regadas a cada 14 dias (Figura 9C).

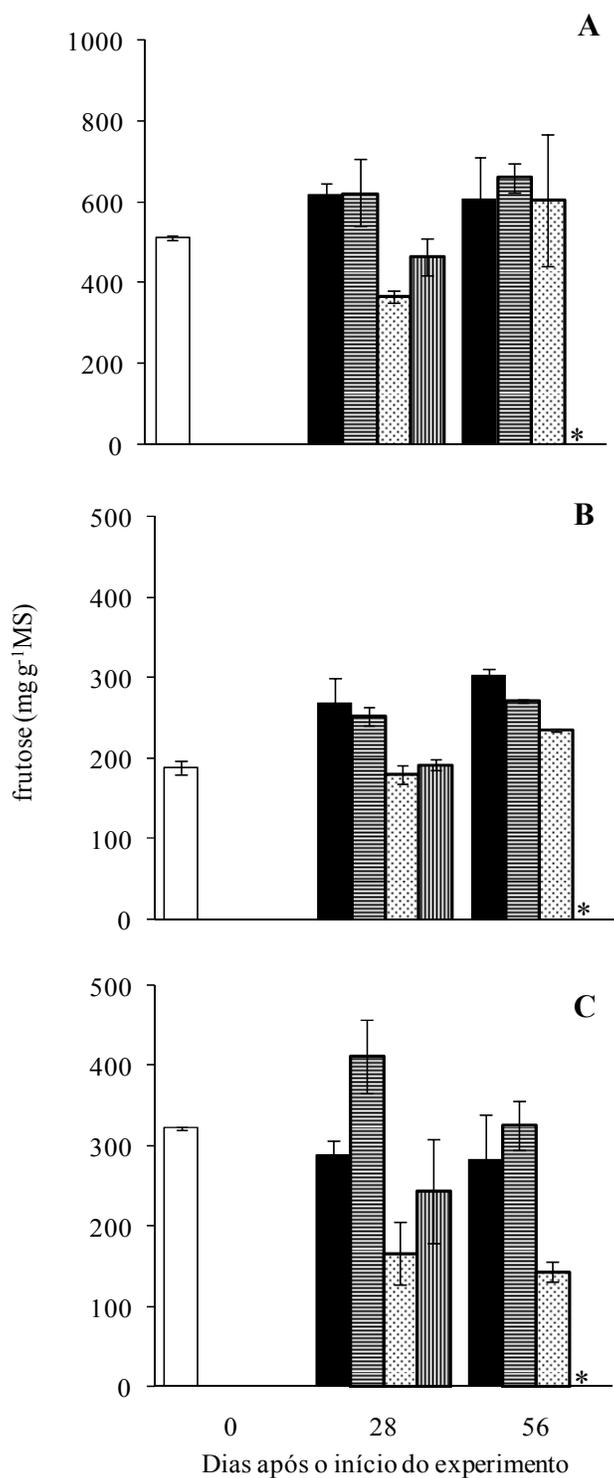


Figura 9 - Conteúdo de frutano total (A), fruto-oligosacarídeos (B) e fruto-polissacarídeos (C) de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes regimes de rega (tempo zero □, controle - rega diária ■, e rega a cada 7 ▨, 14 ▩ e 28 dias ▧). As barras indicam o erro padrão da média (n=3). * - n.d. devido à senescência dos tecidos.

A razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos foi mais elevada nas plantas mantidas sob o regime de rega de 14 dias, principalmente nas plantas coletadas aos 56 dias (Figura 10).

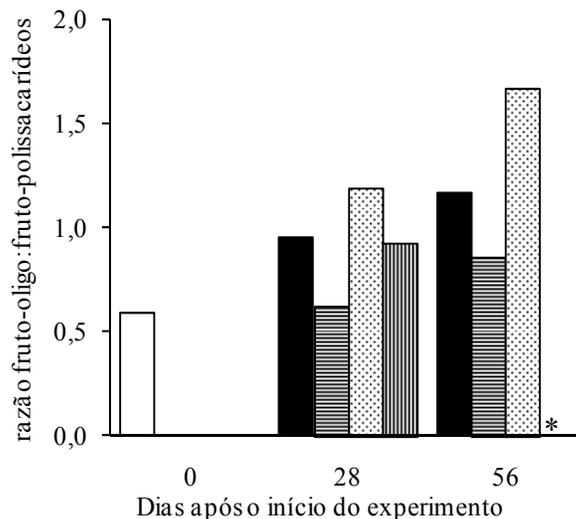


Figura 10 - Razão entre os fruto-oligosacarídeos e fruto-polissacarídeos extraídos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes regimes de rega (tempo zero □, controle - rega diária ■, e rega a cada 7 ▨, 14 ▩ e 28 dias ▧). As barras indicam o erro padrão da média (n=3). * - n.d. devido à senescência dos tecidos.

Nas plantas coletadas aos 28 dias, o conteúdo de açúcar redutor aumentou gradualmente com o aumento de intervalo entre as regas (Figura 11). Aos 56 dias, o aumento só ocorreu nas plantas mantidas sob regime de rega de 14 dias (Figura 11).

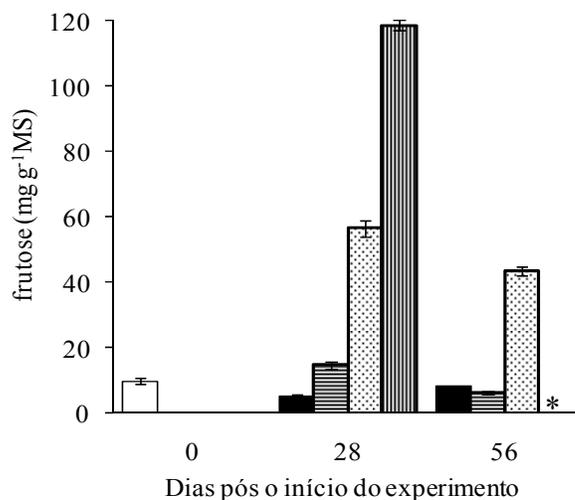
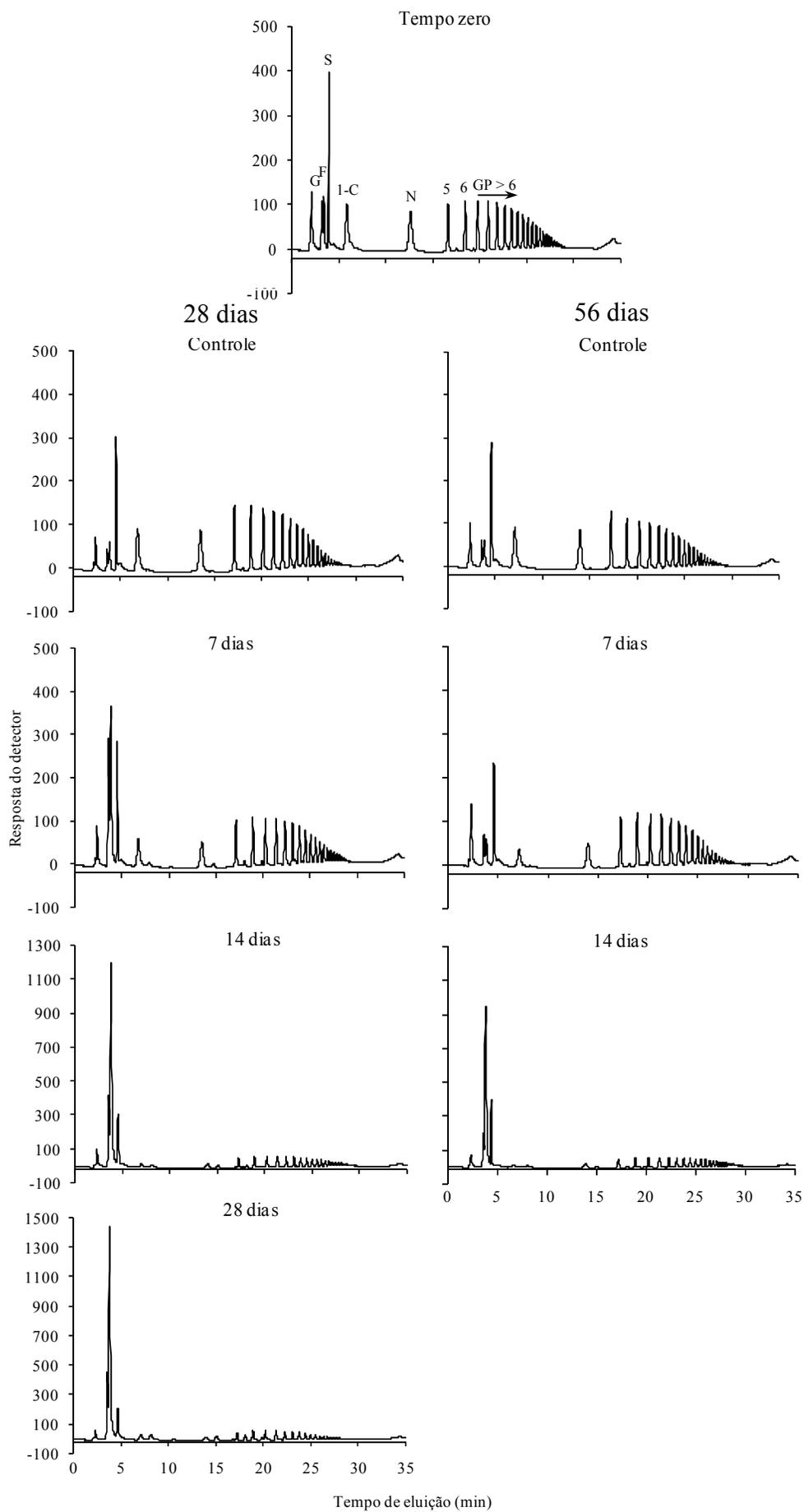


Figura 11 - Conteúdo de açúcar redutor nos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes regimes de rega (tempo zero □, controle - rega diária ■, e rega a cada 7 ▨, 14 ▩ e 28 dias ▧). As barras indicam o erro padrão da média (n=3). * - n.d. devido à senescência dos tecidos.

As análises qualitativas das frações de fruto-oligossacarídeos por cromatografia de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD) são mostradas na figura 12. Além da glucose, frutose e sacarose, todos os membros da série da inulina foram detectados em todos os extratos analisados. Nas plantas controle não foram observadas diferenças notáveis no perfil dos cromatogramas quando comparados às plantas do tempo zero. Aos 28 dias, nas plantas mantidas sob os diferentes regimes de rega, houve um nítido aumento na proporção dos monossacarídeos, glucose e frutose, em relação aos demais membros da fração de fruto-oligossacarídeos. Esse aumento ocorreu gradualmente em relação ao aumento do intervalo entre as regas. Na coleta realizada aos 56 dias de experimento, confirmando a dosagem de açúcares redutores, houve um aumento na proporção dos monossacarídeos apenas nas amostras de plantas mantidas sob o regime de rega a cada 14 dias.

A figura 13 mostra a quantificação dos açúcares por HPAEC/PAD. Aos 28 dias, observa-se o nítido aumento do conteúdo de glucose e frutose, manutenção do conteúdo de sacarose e diminuição de 1-cestose e nistose concomitante ao aumento de deficiência hídrica imposto por cada tratamento. Aos 56 dias, o conteúdo de glucose não sofreu alterações entre os tratamentos, a frutose apresentou nítido aumento nas plantas mantidas sob regime de 14 dias e a sacarose, a 1-cestose e a nistose diminuíram com o aumento de intervalo de regas.



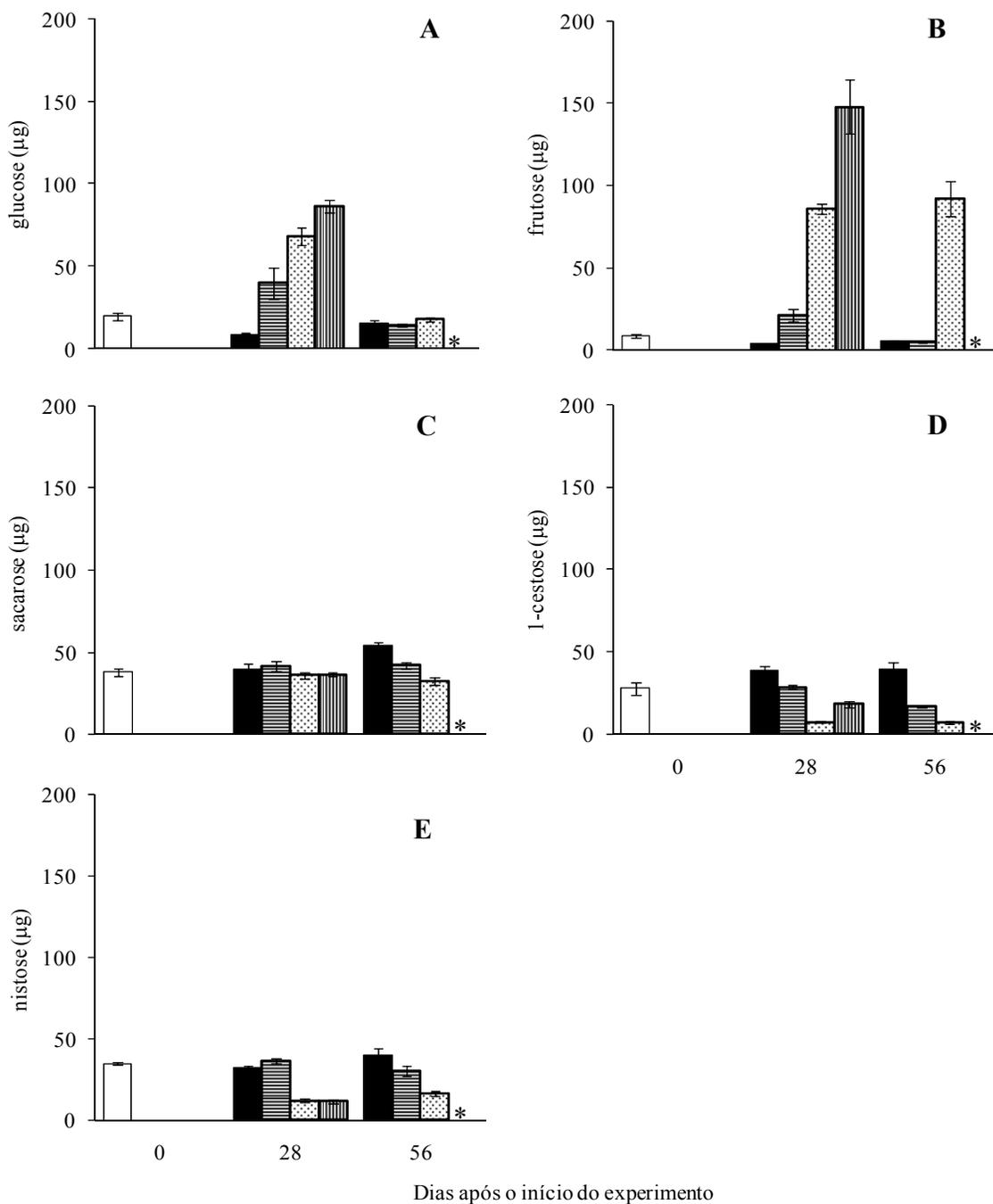


Figura 13 – Quantificação de glucose (A), frutose (B), sacarose (C), 1-kestose (D) e nistose (E) na fração de fruto-oligossacarídeos por HPAEC/PAD de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes regimes de rega (tempo zero □ controle - rega diária ■, e rega a cada 7 ▨, 14 ▩ e 28 dias ▧). As barras indicam o erro padrão da média (n=3). * - n.d. devido à senescência dos tecidos.

Discussão

O intervalo de rega de 28 dias foi suficiente para gerar um potencial hídrico inferior a -15 MPa e umidade inferior a 5% no solo, observado nas coletas de 28 e 56 dias. Esse valor de umidade do solo está abaixo do teor de água indicado para solos em ponto de murcha permanente (Kramer 1995).

Interessante observar que os valores obtidos na coleta realizada aos 56 dias foram mais elevados em todos os regimes de rega, provavelmente devido aos maiores valores de umidade relativa do ar durante o período

Mesmo com valores baixos de potencial hídrico e umidade do solo, as plantas coletadas aos 56 dias de experimento mantiveram a turgescência tanto da parte aérea quanto do rizóforo e valores de potencial hídrico da parte aérea mais negativos quando comparados aos obtidos aos 28 dias de experimento. Aparentemente, ocorreu uma adaptação às condições impostas às plantas durante os diferentes ciclos de rega.

De acordo com Burgess (2006), em resposta ao déficit hídrico, as plantas minimizam a perda de água através da regulação da abertura dos estômatos enquanto continuam absorvendo quantidades suficientes de carbono para a fotossíntese e o crescimento. No presente estudo, aos 28 dias de experimento, as plantas mantidas sob regime de rega de 7 dias apresentaram redução da fotossíntese devido, pelo menos em parte, à limitação da abertura estomática, ocasionando diminuição da transpiração e manutenção da eficiência do uso da água. Ainda aos 28 dias, as plantas regadas a cada 14 dias apresentaram diminuição em todos os parâmetros fotossintéticos mencionados acima, provavelmente devido ao início da senescência de seus ramos aéreos.

Já, aos 56 dias, as plantas não apresentaram diferenças em suas taxas fotossintéticas quando comparadas às plantas controle, regadas diariamente. Entretanto, apresentaram redução da transpiração, provavelmente pela diminuição da abertura estomática, confirmada pelos menores valores de condutância estomática e uma maior eficiência do uso da água. Aparentemente, diferente dos resultados observados no capítulo II, o déficit hídrico imposto por diferentes regimes de rega permitiu uma aclimatação do aparato fotossintético, principalmente no tratamento de regime de rega de 7 dias, enquanto que regimes de rega mais longos como 14 e 28 dias ocasionaram danos irreversíveis, com senescência da parte aérea, não permitindo a continuidade das avaliações das taxas de assimilação fotossintética.

Segundo Loreto & Centritto (2008), a limitação da fotossíntese ocorre quando o estresse é rápido e suave, enquanto um estresse lento e progressivo induz um rearranjo completo das

reações metabólicas e estruturas do mesófilo. Aos 56 dias de experimento, provavelmente as plantas já haviam apresentado mudanças adaptativas ao déficit hídrico imposto. Neste período, as plantas mantidas sob as diferentes frequências de rega apresentaram valores de potencial hídrico mais negativos e manutenção da turgescência da parte aérea. Sabe-se que a manutenção da turgescência pelo ajuste osmótico permite a manutenção da abertura estomática e a fotossíntese sob condições de baixo potencial hídrico do solo (Chaves-Filho & Stacciarini-Seraphin 2001), porém, as plantas regadas a cada 14 dias apresentavam, aos 56 dias, ramos aéreos rebrotados ainda muito pequenos para realização das medidas de fotossíntese.

A síntese de osmoprotetores é um dos mecanismos de adaptação à deficiência hídrica. Esses compostos são acumulados nas células em resposta ao estresse da seca e são degradados quando a água torna-se disponível novamente (Tabaeizadeh 1998). Atuam no ajuste osmótico das células, diminuindo seu potencial hídrico, promovendo resistência contra a desidratação celular e sustentando a atividade metabólica do tecido (Hoekstra *et al.* 2001, Mahajan & Tuteja 2006, Chaves *et al.* 2008).

As plantas mantidas sob as diferentes frequências de rega apresentaram conteúdo de prolina crescente com o aumento de intervalo entre as regas. Devido à sua alta solubilidade em água, esse aminoácido contribui para o ajuste osmótico da célula enquanto promove o aumento nos níveis de outros osmólitos. Pode, ainda, atuar na remoção de diferentes espécies reativas de oxigênio e interagir com resíduos hidrofóbicos de proteínas, protegendo-as da degradação e agregação (Valliyodan & Nguyen 2006). Como as folhas coletadas das plantas regadas a cada 14 e 28 dias apresentaram senescência, o alto conteúdo de prolina pode ser apenas um indicador de estresse (Becker & Fock 1986) ou um marcador bioquímico de alterações metabólicas geradas por diferentes tipos de estresse (Lima *et al.* 2004).

A diminuição da fração de fruto-polissacarídeos nas plantas regadas a cada 14 dias ocasionou um aumento da razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos, principalmente na coleta realizada aos 56 dias. Adicionalmente, as plantas mantidas sob deficiência hídrica apresentaram altos teores de açúcar redutor, carboidratos mais eficientes na diminuição do potencial osmótico (Spollen & Nelson 1994) e proteção contra a desidratação (Wardlaw & Willenbrink 2000).

Aos 56 dias, os ramos aéreos das plantas regadas a cada 14 dias haviam apenas rebrotado e já apresentavam teor de umidade elevado. Ao mesmo tempo, os rizóforos dessas plantas apresentavam altos teores de açúcar redutor e frutose e manutenção do teor de umidade nesses órgãos. Mesmo com valores mais elevados de umidade relativa do ar, as plantas apresentaram

valores mais negativos de potencial hídrico, confirmando a hipótese inicial deste trabalho sobre o papel osmorregulador desses carboidratos.

A manutenção da turgescência dos rizóforos das plantas regadas a cada 14 dias, na coleta aos 56 dias, deveu-se mais aos frutanos de baixo grau de polimerização do que ao conteúdo de prolina, já que esses carboidratos apresentavam-se em grande quantidade nesses tecidos. Houve, então, a diminuição do potencial hídrico dos rizóforos, sugerindo a possível ocorrência de ajuste osmótico possibilitado pelos frutanos e o possível papel de indicador de estresse ou marcador bioquímico da prolina.

Estudos anteriores realizados com rizóforos isolados de *V. herbacea* mostraram que a deficiência de água promoveu um aumento de frutose livre e de oligossacarídeos com baixo peso molecular nos tecidos (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004), sugerindo aumento da atividade da FEH, liberando resíduos de frutose e, possivelmente, atuação da FFT na redistribuição das moléculas de frutose entre os frutanos de baixo grau de polimerização.

No presente estudo, as atividades enzimáticas das plantas que ficaram sob deficiência hídrica mostraram que o aumento dos frutanos de baixo grau de polimerização ocorrido nas plantas mantidas sob os diferentes regimes de rega foi acompanhado pelo aumento das atividades tanto da FEH como da invertase. Nas plantas mantidas sob deficiência hídrica, houve hidrólise dos frutanos, ocasionando um aumento no conteúdo de açúcares de baixo peso molecular, principalmente a frutose, conforme observado nas dosagens por HPAEC/PAD. Respostas semelhantes foram verificadas em trigo (Virgona & Barlow 1991, Yang *et al.* 2004), em gramíneas do gênero *Festuca* (Spolen & Nelson 1994, Clark *et al.* 2004) e em chicória (Van den Ende *et al.* 1998) submetidos a esse estresse.

Embora se saiba que a FEH e a SST apresentam atividades aumentadas em fases diferentes do desenvolvimento das plantas devido a um provável controle temporal destas dentro do vacúolo (Frehner *et al.* 1984), há relatos na literatura da participação da FEH durante o processo de biossíntese de frutanos. Em trigo, por exemplo, a FEH controla o alongamento das ramificações das moléculas de frutanos durante a biossíntese desses compostos (*triming process*) (Van de Ende *et al.* 2003). Em *Lolium temulentum* L. que sofreram excisão das folhas (Cairns *et al.* 1997) e *Smallanthus sonchifolius* (Poep.) H. Rob. em crescimento (Itaya *et al.* 2002) foram encontradas atividades concomitantes de FEH e SST. Possivelmente a FEH atuou, junto às frutossiltransferases, na redistribuição das moléculas de frutanos além da ação hidrolítica para produção de frutose livre e frutanos de baixo peso molecular nas plantas sob deficiência hídrica.

Sob diferentes regimes de rega, as plantas apresentaram diminuição do potencial hídrico da parte aérea e do rizóforo, manutenção da turgescência e da fotossíntese, principalmente após a ocorrência de pelo menos um ciclo de rega, indicando a ocorrência de aclimação das plantas às condições de baixa disponibilidade de água.

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., Nascimenti, J.R.O., Schroeven, L., Van den Ende, W. & Carvalho, M.A.M.** 2008. Cloning, characterization and functional analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Cell Physiology* 49: 1185-1195.
- Becker, T.W. & Fock, H.P.** 1986. The activity of nitrate reductase and pool sizes of some amino acids and some sugars in water-stressed maize leaves. *Photosynthesis Research* 8: 267-274.
- Bates, L.S., Waldes, R.P. & Teare, I.D.** 1973. Rapid determination of proline for water stress studies. *Plant and soil* 39: 205-207
- Blake, G.R.** 1965. Bulk density. *In: C.A. Black, D.D. Evans, J.L. White, L.E. Ensminger & F.E. Clark* (eds.). *Methods of soil analysis American Society of Agronomy, Madison*, pp. 374-390.
- Bohnert, H.J. & Jansen, R.G.** 1996. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* 14: 89-97.
- 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.
- Buckeridge, M.S., Tiné, M.A.S. & Santos, H.P.** 2000. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 137-162.
- Burgess, S.S.O.** 2006. Facing the challenge if seasonally dry environments. *Physiologia Plantarum* 127: 339-342.
- Cairns, A.J., Bonnett, G.D., Gallacher, J.A., Simpsons, R.J., Pollock, C.J.** 1997. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum*. VII. Sucrose and fructan hydrolysis by a fructan-polymerizing enzyme preparation. *New Phytologist* 136: 61-72.
- Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.C.** 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., 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: 281-285.
- 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.
- Chaves, M.M., Flexas, J. & Pinheiro, C.** 2008. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanism from whole plant to cell. *Annals of Botany, AOB preview online*: 1-10.

- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S.** 2003. Understanding plant responses to drought – from genes to whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- Chaves-Filho, J.T. & Stacciarini-Seraphin, E.** 2001. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 199-204.
- Clark, G.T., Zuther, E., Outred, H.A., McManus, M.T. & Heyer, A.G.** 2004. Tissue-specific changes in remobilization of fructan in the xerophytic tussock species *Festuca novae-zelandiae* in response to a water deficit. *Functional Plant Biology* 31: 377-389.
- Coussement, P. & Franck, A.** 1998. New food applications for inulin. *Agro-food-Industry Hi-Tech* 9: 26-28
- Davies, W.J. & Zhang, J.** 1991. Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 42: 55-76.
- De Roover, J., Vandenbranden, K. Van Laere, A. & Van den Ende, W.** 2000. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Chicorium intybus* L.). *Planta* 210: 808-814.
- 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 – Biomembranes* 1375: 36-42
- 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 Biology and Technology* 47: 363-373.
- Edelman, J. & Jefford, T. G.** 1968 The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* 67: 517-531.
- Ernst, M. & Pfenning, J.** 2000. Fructan in stem exudates of *Helianthus tuberosus* L. In: A. Fuchs (ed.). *Proceedings of the Eighth Seminar on Inulin, EFA*, pp. 56–58.
- Fan L., Linker R., Gepstein S., Tanimoto E., Yamamoto R. & Neumann, P.M.** 2006. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. *Plant Physiology* 140: 603-612.
- Frehner, M., Keller, F. & Wienken, 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.
- Goudriaan, J. & Van Laar, H.H.** 1994. *Modelling potential crop growth processes*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.

- 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.
- Hidaka, H. & Hirayama, M.** 1991. Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. *Biochemical Society Transactions* 19: 561-565.
- Hsiao, T.C. & XU, L.K.** 2000. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of Experimental Botany* 51: 1595–1616.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. & Buitink, J.** 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431-438.
- Itaya, N. M., Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). *Physiologia Plantarum* 116: 451-459.
- Jermyn, M.A.** 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature* 177: 38-39.
- Jones, H.G. & Corlett, J.E.** 1992. Current topics in drought physiology. *Journal of Agricultural Science* 119: 291–296
- Jordan, W. R.** 1983. Whole plant response to water deficits: An overview. *In*: H.M. Taylor, W.R. Jordan & T.R. Sinclair (eds.). *Limitations to efficient water use in crop production*. Madison: ASA, CSSA, and SSA. pp. 289-317.
- Kerepesi, I., Galiba, G. & Bányai, E.** 1998. Osmotic and salt stresses induced differential alteration in water-soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 5347-5354.
- 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.
- Kramer, P.J.** 1995. *Water relations of plants and soils*. Academic Press, London.
- 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.
- Lima, G.P.P., Fernandes, A.A.H., Catâneo, A.C., Cereda, M.P. & Brasil, O.G.** 2004. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. *Bragantia* 63: 335-340.

- Loreto, F. & Centritto, M.** 2008. Leaf carbon assimilation in a water-limited world. *Plant Biosystems* 142: 154-161.
- Lüscher, M., Erdin C., Sprenger, N., Hochstrasser, U., Bollert, T. & Wiemkem, A.** 1996. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Letters* 385: 39-42.
- Mahajan, S. & Tuteja, N.** 2006. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444: 139158
- Mantovani, W.** 1983. Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú, Estado de São Paulo, São Paulo. 1983. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Nilsson, U., Öste, R., Jägerstad, M. & Birkhed, D.** 1988. Cereal fructans: *in vitro* and *in vivo* studies on availability in rat and humans. *The Journal of Nutrition* 118:1325-1330.
- Osorio, J., Osorio, M.L., Chaves, M.M. & Pereira, J.S.** 1998. Water deficits are more important in delaying growth than in changing patterns of carbon allocation in *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* 18: 363–373.
- 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.
- Pollock, C. J., Cairns, A.J., Sims, I.M. & Housley, T.L.** 1996. Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. *In: E. Zamski & A.A. Shaffer (eds.). Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source - Sink Relationships*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 97-113.
- Pontis, H.G. & Del Campillo, E.** 1985. Fructans. *In: P.M. Dey & R Dixon. (eds.). Biochemistry of storage carbohydrates in green plants.* Academic Press, London, pp. 205-227.
- Ritsema, T. & Smeekens, S.C.M.** 2003. Engineering fructan metabolism in plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 811-820.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K.** 1997. Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiology* 115: 327-334.
- Spollen, W.G. & Nelson, C.J.** 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* 106: 329-336.
- Tabaeizadeh, Z.** 1998. Drought-induced responses in plant cells. *International Review of Cytology* 182: 193-247.
- 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.

- Thomas, H., James, A.R.** 1999. Partitioning of sugars in *Lolium perenne* (perennial ryegrass) during drought and on rewatering. *New Phytologist* 142: 292–305.
- Tomomatsu, H.** 1994. Health effects of oligosaccharides. *Food Technology* 48:61-65.
- Valliyodan, B. & Nguyen, H. T.** 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 9:1–7.
- 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., 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-exohydrolyase isoforms. *Plant Physiology* 131: 621-631.
- Van den Ende, W.; Moors, S.; Van Hoenacker, G. & Van Laere A.** 1998. Effect of osmolytes on the fructan pattern in feeder roots produced during forcing of chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology* 153: 290-298.
- Van den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J., Verhaert, 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., 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., Yoshida, M., Clerens, S., Vergauwen, R & Kawakami, A.** 2005. Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolase (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum* L.) *New Phytologist* 166: 917-932.
- Vereyken, I.J., Chupin, V., Demel, R.A., Smeekens, S.C.M. & Kuijff, B.D.** 2001. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 1510: 307-320.
- Vieira, C.C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1993. Fructosecontaining carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae) at different phenological phases. *Plant Cell Environment*. 16: 919–928.
- Virgona, J.M. & Barlow, E.W.R.** 1991. Drought stress induces changes in the non-structural carbohydrate composition of wheat stems. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 239-247.
- Volaire F, Thomas H, Bertagne N, Bourgeois E, Gautier MF, Lelievre F.** 1998. Survival and recovery of perennial forage grasses under prolonged Mediterranean drought: water status, solute

accumulation, abscisic acid concentration and accumulation of dehydrin transcripts in bases of immature leaves. *New Phytologist* 140: 451–460.

Wang, N. & Nobel, P.S. 1998. Phloem transport of fructans in the Crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology* 116: 709–714.

Wardlaw, I.F., Willenbrink, J. 2000. Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernel filling. *New Phytologist* 148: 413-422.

Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Zhu, Q. & Liu, L. 2004. Activities of fructan and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* 220: 331-343.

Zobayed, S.M.A., Afreen, F. & Kozail, T. 2007. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St John's wort plants under a water stress condition. *Environmental and Experimental Botany* 59: 109-116.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A disponibilidade de água no solo é um fator importante para o crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo considerada a maior força seletiva na evolução e na distribuição geográfica das plantas. O estresse hídrico ocorre geralmente de maneira sazonal, de modo que as plantas desenvolveram mecanismos de adaptação à baixa disponibilidade de água.

De modo geral, no presente trabalho, o déficit hídrico imposto nos 3 experimentos realizados foi suficiente para gerar alterações no conteúdo e no estado termodinâmico da água, no solo e nas plantas, que por sua vez afetaram processos fisiológicos e bioquímicos como a fotossíntese, síntese de prolina e o metabolismo de frutanos nas plantas de *Vernonia herbacea*.

Nas plantas mantidas sob deficiência hídrica, os decréscimos na condutância estomática, em resposta à deficiência hídrica imposta, parece ter sido o principal fator limitante da fotossíntese. Com efeito, aumentos na condutância estomática e, por extensão, na transpiração e taxas fotossintéticas foram observados após a re-irrigação das plantas.

O alto teor de prolina presente nas plantas sob déficit hídrico sugere sua atuação na osmorregulação ou na sinalização e regulação de outras respostas. No entanto, o papel da prolina nas respostas de *V. herbacea* ao déficit hídrico deve ser mais bem analisado, uma vez que, ao contrário dos rizóforos, na parte aérea, mesmo apresentando alto teor de prolina, não houve manutenção do teor de umidade e ocorreu a senescência das folhas.

O aumento da concentração de frutose e da razão oligo:polissacarídeos verificado nos 3 experimentos, sugere que, sob condições de baixa disponibilidade de água, as hidrolases e as frutossiltransferases estão envolvidas na produção de frutanos de cadeias curtas. As análises dos fruto-oligossacarídeos por HPAEC/PAD evidenciaram que a seca promoveu um rápido aumento nos monossacarídeos, em relação aos oligossacarídeos.

No experimento descrito no capítulo I utilizou-se terra de canteiro como substrato para as plantas, enquanto no segundo experimento, do capítulo II, as plantas foram cultivadas em solo de cerrado. Como observado nas medidas de umidade do solo, o solo de cerrado apresenta uma capacidade de retenção água bem inferior se comparado à terra de canteiro. Ambos passaram a apresentar diminuição do teor de umidade e chegaram a alcançar os respectivos pontos de murcha permanente. A umidade da terra de canteiro alcançou esse estágio com cerca de 10% de umidade do solo, enquanto para o solo de cerrado esse valor foi de cerca de 5%.

Em resposta a essas condições de umidade do solo, observa-se que o teor de umidade dos rizóforos acompanhou a diminuição da água disponível no solo, sendo que no experimento do capítulo II observou-se que, após o alcance do ponto de murcha permanente do solo de cerrado,

os rizóforos mantiveram o seu teor de umidade. Provavelmente a mesma resposta ocorreria nas plantas cultivadas em terra de canteiro, mas como no solo de cerrado o ponto de murcha permanente foi alcançado mais rapidamente dentro do período experimental, essa resposta foi observada apenas nessas plantas.

Esses dois experimentos permitiram avaliar gradualmente as respostas de *V. herbacea* a déficits hídricos de diferentes intensidades. Nos capítulos I e II, a suspensão total da rega permitiu, portanto, o estabelecimento gradual do déficit hídrico e uma análise integrada ao longo do tempo das variações no status hídrico, na fotossíntese e no metabolismo de frutanos, com respostas em todos os parâmetros avaliados iniciando-se aproximadamente 7 dias após a suspensão da rega. A partir desses dois experimentos foi possível, então, estabelecer um protocolo para se estudar as respostas das plantas à outra forma de imposição do estresse hídrico, que foi a aplicação de diferentes regimes de rega (capítulo III), no qual foi possível observar, também, a aclimação à baixa disponibilidade de água tanto da parte aérea como dos rizóforos nos diferentes ciclos de rega.

A imposição do déficit hídrico por meio de diferentes regimes de rega permitiu às plantas a manutenção da fotossíntese e da turgescência nas plantas dos regimes de rega de 7 e 14 dias no segundo ciclo de regas. Provavelmente os osmoprotetores produzidos no primeiro ciclo foram utilizados no segundo, permitindo uma resposta semelhante àquelas observadas nas plantas que foram re-irrigadas nos experimentos de suspensão total da rega (capítulos I e II).

Apesar dessas diferenças nas condições experimentais, as plantas apresentaram respostas bem semelhantes, com o aumento de atividade das enzimas de síntese seguido da atuação das enzimas de degradação e/ou pela atuação concomitante destas na redistribuição do comprimento das moléculas de frutanos. Essas alterações no metabolismo enzimático resultaram em uma maior proporção de oligossacarídeos, conforme observado nos valores da razão oligo: polissacarídeos, e na produção de açúcar redutor nos rizóforos. É possível que essas enzimas estivessem atuando em diferentes regiões dos rizóforos ou em ação conjunta, porém com o mesmo resultado final, a produção de moléculas osmorreguladoras.

Pesquisas recentes tem demonstrado que as alterações no metabolismo de frutanos estão envolvidas não só no ajuste osmótico das células, mas também na manutenção da integridade de membranas e na sinalização para ocorrência de outras respostas fisiológicas. Entretanto, análises do efeito dos frutanos na membrana plasmática ou outras membranas de organelas celulares não

foram ainda realizadas com *Vernonia herbacea*, o que torna apenas especulativa esta função na espécie estudada.

A determinação do potencial hídrico dos rizóforos nos experimentos descritos nos capítulos II e III mostrou que a diminuição deste é concomitante ao aumento dos frutanos de cadeias curtas, reforçando a hipótese de que esses carboidratos atuam no ajuste osmótico nessa espécie. Porém, o efeito de outros solutos compatíveis não pode ser excluído, já que as plantas apresentaram conteúdos elevados de prolina.

A tolerância de *V. herbacea* ao déficit hídrico não se baseia na manutenção da turgescência da parte aérea para continuidade da fotossíntese e processos metabólicos, uma vez que ocorreu senescência da parte aérea quando o solo atingiu seu ponto de murcha permanente. Esta planta acumula frutanos quando a produção de fotoassimilados excede a demanda e passa a utilizar essas reservas para a manutenção da integridade dos rizóforos, permitindo a sua sobrevivência durante os períodos de estresse hídrico e uma rápida reabsorção quando a água é reposta, além de permitir a rebrota de novos ramos aéreos.

Resumo

A falta de água tem sido a maior força seletiva na evolução das plantas e a habilidade de enfrentar o déficit hídrico é um determinante importante na distribuição geográfica das plantas. Preservar uma porção dos produtos fotosintetizados em órgãos de reserva é uma estratégia de sobrevivência de todas as plantas. Os carboidratos de reserva mais comuns são o amido e a sacarose, porém, os frutanos são outra forma de carboidratos de reserva bastante comuns, que ocorrem em aproximadamente 15% das angiospermas. Os frutanos consistem de séries homólogas de oligo e polissacarídeos não redutores, formados por unidades de frutose ligadas a uma molécula de sacarose. A enzima que inicia a síntese de frutanos é a sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST), que catalisa a transferência da unidade de frutose de uma sacarose para outra. O alongamento da cadeia é feito pela frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT), que catalisa a transferência de unidades de frutose de uma molécula para outra. A degradação de frutanos em frutose e sacarose ocorre pela remoção seqüencial das unidades terminais de frutose pela ação da frutano exohidrolase (1-FEH). *Vernonia herbacea* é uma Asteraceae nativa da vegetação do cerrado que apresenta alto conteúdo de frutanos do tipo inulina em seus órgãos de reserva, denominados rizóforos. O conteúdo elevado de frutanos encontrado em órgãos subterrâneos de espécies do cerrado sugere que esses compostos atuam na adaptação de plantas que atravessam condições ambientais desfavoráveis durante o seu ciclo de desenvolvimento. Estes compostos atuam como reserva de energia, além da proteção contra a seca e o frio através da regulação osmótica e da estabilização de membranas e biomoléculas. O objetivo deste trabalho foi analisar a composição e o metabolismo de frutanos em plantas de *V. herbacea* submetidas à suspensão total e a diferentes regimes de rega. Sob regimes de rega diferentes, as plantas tratadas apresentaram diminuição do potencial hídrico na parte aérea e no rizóforo e manutenção da turgescência e da fotossíntese. Por outro lado, a suspensão total de regas causou diminuição da fotossíntese, sem muitas variações na turgescência dos rizóforos. O alto teor de prolina presente nas plantas sob déficit hídrico sugere sua atuação na osmorregulação ou na sinalização e regulação de outras respostas na planta. O aumento observado na concentração de frutose e na razão oligo:polissacarídeos indicam a ocorrência da hidrólise parcial dos frutanos em resposta ao déficit hídrico induzido e o envolvimento das enzimas do metabolismo de frutanos, contribuindo para a tolerância à seca nessas plantas. As análises dos fruto-oligossacarídeos por HPAEC/PAD evidenciaram que a seca promoveu um rápido aumento nos monossacarídeos. Sabe-se que o acúmulo de fruto-oligossacarídeos no vacúolo possibilita a diminuição do potencial hídrico, afetando o influxo de água do citoplasma e interferindo na sinalização da seca e que a FEH pode degradar seletivamente esses frutanos, produzindo uma mistura de hexoses, sacarose e fruto-oligossacarídeos, promovendo a proteção da membrana e de biomoléculas. Desse modo, o aumento da razão oligo:polissacarídeos, de frutanos de cadeias curtas e de açúcares redutores verificado em plantas submetidas ao déficit hídrico é consistente com a hipótese de que os frutanos atuam na tolerância à seca em *V. herbacea*, uma vez que alterações apresentadas em seu metabolismo possibilitaram aos rizóforos uma baixa perda de água durante a suspensão de rega.

Palavras-chave: estresse hídrico, frutanos, tolerância à seca.

Abstract

Lack of water has been the major selective force in the evolution of plants and the ability to endure the water deficit is an important determinant in the distribution of plants. Preserving a portion of photosynthesized products in storage organs is a survival strategy of all plants. The most prominent reserve carbohydrates are starch and sucrose, while fructans are another form of storage carbohydrate, occurring in 15% of angiosperm species. Fructans consist of homologous series of non-reducing oligo and polysaccharides, each containing fructose units bound to a sucrose molecule. The enzyme considered to initiate fructan synthesis is sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST), which catalyzes fructosyl transfer from one sucrose to another. Chain elongation is catalyzed by fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT), which catalyzes fructosyl transfer from one fructan molecule to another. Fructan breakdown into fructose and sucrose proceeds via a stepwise removal of terminal fructose residues, by the action of fructan exohydrolases (1-FEH). *Vernonia herbacea* is an Asteraceae native to the cerrado vegetation that presents high contents of inulin-type fructans in the underground storage organs, named rhizophores. The high fructan contents found in underground systems of the species from the cerrado suggest that these compounds play a role as a contributor to adaptative features in plants which undergo unfavorable environmental conditions throughout its developmental cycle. These compounds act as energy reserve, as protective agents against cold and drought stress through membrane and biomolecules stabilization and osmotic regulation. The aim of this work was to analyze the fructan composition and metabolism in plants of *V. herbacea* submitted to total water suspension and to different irrigation frequencies. Plants kept under different irrigation frequencies showed a decrease in water potential (Ψ_w) of shoot and rhizophores and maintenance of turgor and photosynthesis. Total water suspension caused a gradual decrease in photosynthesis, without significant variation of rhizophore turgor. The high content of proline present in plants under water deficit suggests its role in osmoregulation or in the signaling and regulation of other responses in plants. The observed increases in fructose concentration and in the ratio of oligo:polysaccharides indicate of partial hydrolysis of fructans in response to the induced water deficit and the involvement of enzymes of fructan metabolism, contributing to drought tolerance in these plants. The analyses of the fructooligosaccharides by HPAEC/PAD provided evidence that drought promoted a rapid increase in monosaccharide content. It is well known that accumulation of vacuolar fructan oligosaccharides lowers the osmotic potential, affecting water influx from the cytoplasm to the vacuole and putatively interferes with drought signaling. Additionally, FEH might selectively degrade these fructans, producing a mixture of hexoses, sucrose and oligo-fructans, providing optimal membrane and biomolecules protection. Thus, the increase in oligo:polysaccharides ratio, in short chain fructans and in reducing sugars detected in plants subjected to water water deficit is consistent consistent with the hypothesis that fructans act in drought tolerance in *V. herbacea*, since the plants showed changes in the metabolism of these carbohydrates, allowed rhizophores a low water loss during the water suspension treatments.

Key words: drought tolerance, fructans, water stress.