

MARCELINO JOSÉ DE SOUZA

**Distribuição espacial da atividade das enzimas
de síntese e mobilização de frutanos em
rizóforos de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby
induzidas à brotação e sob temperatura baixa**

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

2008

MARCELINO JOSÉ DE SOUZA

**Distribuição espacial da atividade das enzimas
de síntese e mobilização de frutanos em
rizóforos de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby
induzidas à brotação e sob temperatura baixa**

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: DRA. MARIA ANGELA M. CARVALHO

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Souza, Marcelino José de
S729d Distribuição espacial da atividade das enzimas de síntese e mobilização de frutanos em rizóforos de *Vernonia herbácea* (Vell.) Rusby induzidas à brotação e sob temperatura baixa / Marcelino José de Souza -- São Paulo, 2008.
79 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2008
Bibliografia.

1. Frutanos. 2. Rizóforos. 3. Asteraceae. I. Título

CDU : 547.458

DEDICATÓRIA

A Carla e Beatriz, com
todo amor do meu coração.

EPÍGRAFE

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

Agradecimentos

A Deus por criar uma natureza tão perfeita e repleta de desafios.

À minha família Nice e Manuel (*in memoriam*), Sonia e Beto, Carol, Luciano, Ricardo, Paulo, Doniseti, Cida, Elaine, Clarissa, Roberto, Isabel por me incentivarem a buscar meus objetivos, por assumirem a responsabilidade de dividir os esforços para que eu pudesse chegar aonde cheguei.

A Dra. Maria Angela Machado de Carvalho pela oportunidade, pela orientação, pela coragem, pelo esforço e respeito dedicados.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, especialmente à Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pela oportunidade.

À Dra Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro pela orientação extra-oficial e pelo incentivo.

Aos funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica, Ana Alice, Aparecida, Cida, Helena, Mary, também a Sirley e a D. Amélia.

A todos os funcionários da Pós-Graduação do Instituto de Botânica, em especial às coordenadoras Sonia M.C. Dietrich e Dra. Solange C. Mazzoni-Viveiro, pelas facilidades obtidas.

Ao grupo dos frutanos Amanda, Paola e Vanessa, por toda ajuda que me deram para a conclusão deste trabalho, pois tenho a certeza de que uma parte do que eu aprendi se deve ao auxílio que me prestaram.

Aos amigos Anderson, Amanda de Souza, Amanda P. Souza, Claudinha, Cyntia, Fernanda K., Fernanda Macedo, Fernanda Peroni, João Paulo, Kelly Simões, Ludmila Raggi (Sofia), Maria Luiza, Marco Tiné, Marília, Marina Martins, Michelle, Paulo Henrique, Roberta Moretto, Rodrigo, Tatiana Botelho, Vanessa Costa e Vanessa Rebouças pela convivência, comentário, dicas, por todo apoio que recebi.

Aos amigos das escolas Colégio Santa Inês e UME Therezinha de Jesus, por compreenderem e me ajudarem no que foi possível para que eu pudesse continuar minha qualificação, agradeço em especial ao corpo diretivo na pessoa da coordenadora pedagógica Márcia e da assistente de direção Cristiane, que me deu oportunidade de continuar lecionando.

Agradeço a todos que de alguma forma me auxiliaram durante o mestrado, a gratidão que tenho por vocês será eterna, que Deus lhes abençoe.

Sumário

Resumo	viii
Abstract	x
Introdução	1
1.1 Carboidratos como alimentos funcionais	2
1.2 Ocorrência de Frutanos	5
1.3 Localização dos Frutanos (órgãos e tecidos)	5
1.4 Estrutura dos Frutanos	7
1.5 Metabolismo de frutanos	9
1.6 Estresses abióticos	12
1.6.1 Estresse Térmico	14
1.7 Frutanos e a tolerância a estresses ambientais	18
1.8 O Bioma Cerrado	20
1.9 <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby	22
Objetivo	24
Material e Métodos	25
2.1 Material Vegetal	25
2.2 Tratamentos aplicados	26
2.3 Extração de Carboidratos Solúveis (Frutanos)	27
2.4 Análise Quantitativa dos Frutanos	27
2.5 Análise Qualitativa dos Frutanos	28
2.6 Extração Enzimática	28
2.7 Determinação das Atividades Enzimáticas	29
Resultados e Discussão	31
Considerações Finais e Conclusões	64
Referências Bibliográficas	66

Resumo

Os frutanos são fibras alimentares solúveis que, quando hidrolisados, liberam frutose, que pode ser usada como adoçante dietético. Os frutanos são polímeros de frutose sintetizados pela ação de duas frutossiltransferases: SST (sacarose: sacarose frutossiltransferase) responsável pela síntese do trissacarídeo 1-kestose e FFT (frutano: frutano frutossiltransferase), responsável pela transferência reversível de unidades de frutose entre uma molécula doadora e uma receptora. Sua mobilização se dá pela ação de uma frutano-exohidrolase (FEH). Além de carboidratos de reserva, esses polímeros podem ser relacionados à proteção das plantas contra o frio e a seca. *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby é uma espécie perene de Asteraceae do cerrado, que apresenta crescimento sazonal. Possui órgãos subterrâneos, rizóforos, que possibilitam a reprodução vegetativa e atuam como órgãos de reserva de frutanos do tipo inulina. Resultados anteriores mostraram que os frutanos e as enzimas do seu metabolismo apresentam uma distribuição espacial ao longo do eixo de crescimento do rizóforo caracterizada, em geral, por uma atividade mais elevada de SST na região do ápice (distal) na fase vegetativa e por um aumento da atividade da FEH durante a brotação, próximo à região do rizóforo onde ocorre a inserção dos ramos aéreos (proximal). O presente trabalho objetivou estudar o efeito da excisão e do frio na distribuição dos frutanos e na atividade da FEH, SST, FFT e Invertase nas regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos. Para tal, foram analisadas plantas induzidas à brotação pela remoção de ramos aéreos, plantas intactas e excisadas mantidas a 5°C por 21 dias, plantas intactas e plantas induzidas à brotação e em seguida submetidas a 5°C por 7 dias, e finalmente, plantas na fase vegetativa, como controle. A atividade da FEH ocorreu predominantemente na região proximal em plantas induzidas à brotação e em plantas submetidas ao frio. Entre essas, as excisadas apresentaram atividade mais elevada, sugerindo que duas isoformas de FEH estejam envolvidas no processo de mobilização de

frutanos, uma induzida pelo frio e outra pela excisão. Na região distal foram encontradas as atividades mais elevadas de SST e os teores mais altos de fruto-oligossacarídeos, enquanto as regiões mediana e proximal apresentam os teores mais elevados de fruto-polissacarídeos. O tempo de permanência no frio também influenciou as atividades da FEH e da SST, promovendo um maior aumento nas plantas mantidas por 21 dias consecutivos, em relação às plantas que foram mantidas por 7 d nestas condições, após permanência de 21 dias em temperatura ambiente. É sugerido que, nas plantas induzidas à brotação, os produtos da mobilização dos frutanos sejam utilizados para o restabelecimento da sua parte aérea, enquanto nas plantas submetidas aos tratamentos de frio, esses e mais os produtos de ação das frutossiltransferases, sejam utilizados no ajuste osmótico e na proteção das estruturas celulares, como uma estratégia de adaptação a essa condição ambiental.

Palavras-chave: inulina, *Vernonia herbacea*, brotação induzida, tolerância ao frio.

Abstract

Fructans are classified as non-digestible carbohydrates and thus considered dietary fibres and after hydrolysis, fructose yielded can also be used as a natural sweetener. Fructans are fructose polymers synthesized by action of two fructosyl transferases: SST (sucrose:sucrose fructosyl transferase), catalyses the synthesis of the trisaccharide 1-kestose and FFT (fructan:fructan fructosyl transferase), catalyses the reversible transfer of fructose units from a donor to an acceptor molecule. Breakdown occurs by action of a FEH (fructan exohydrolase), which catalyses the release of fructose moiety to water. Besides being a storage carbohydrate, fructans have been claimed to be involved in the protection of plants against cold and drought. *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby is a perennial Asteraceae of the cerrado, presenting seasonal growth, which accumulates inulin-type fructans in the rhizophores, the underground organs. Early results showed that the spacial distribution of fructans and the related enzymes throughout the rhizophore is characterized by a high biosynthetic activity in the distal region of the rhizophore in the vegetative stage of the plants and by a high fructan mobilization in the proximal region, near the insertion site of the aerial organs, mainly in sprouting plants. The present study aimed to evaluate the effect of excision and of low temperature on the spatial distribution of fructans and the enzymes FEH, SST, FFT and invertase in the rhizophore. The analyses were performed on plants induced to sprouting by excision of aerial organs, on intact and excised plants kept under 5°C for 21 days, on intact and induced plants kept at 5°C for 7 days, and in plants in the vegetative stage (control). FEH activity occurred predominantly in the proximal region in plants induced to sprouting and in plants under low temperature. Among these, the excised plants presented higher FEH activity, suggesting that two isoforms are involved in fructan mobilization, one induced by cold and the other induced by excision. The highest SST activities and fructo-oligosaccharide contents were found in the distal region of the

rhizophores while the highest fructo-polisaccharide contents were detected in the median and proximal regions. The number of days under low temperature also influenced FEH and SST activities. Higher activities of these enzymes were detected in plants kept in the cold for 21 days as compared to those which were kept for 7 days after 21 days under natural temperature. It is suggested that in plants induced to sprouting, fructan mobilization products are used for the reestablishment of the aerial organs while in plants under low temperature, these products, in addition to the products of fructosyltransferases, are used in osmotic adjustment and in the protection of cell membranes, as an strategy to undergo this unfavorable condition.

Key words: inulin, *Vernonia herbacea*, induced sprouting, cold tolerance.

Introdução

Os frutanos são compostos descritos inicialmente na literatura pelas suas propriedades nutricionais, uma vez que seu consumo pode contribuir para manutenção da saúde e no combate dos males associados à ingestão de diversos alimentos. Embora seja inegável a forte ligação entre dieta e saúde, divulgada há muito tempo, particularmente por populações orientais, esse conceito tem sido fortalecido e rapidamente propagado nos últimos anos, sob a égide dos chamados alimentos funcionais ou nutracêuticos.

Os frutanos são sintetizados a partir de moléculas de sacarose e está presente em aproximadamente 15% das angiospermas, inclusive em algumas de importância econômica como chicória, alcachofra, alho, aspargo, aveia, entre outras. As maiores fontes comerciais de inulina são raízes de *Dhalia sp.* e de *Cichorium intybus* e tubérculos de *Helianthus tuberosus*, todas da família Asteraceae e de regiões temperadas. Dentre essas espécies, *C. intybus* é a mais produtiva, podendo atingir até 12 t.ha⁻¹ de inulina (Verificar dados mais recentes de produtividade).

Estudos demonstraram que as plantas acumuladoras de frutanos apresentam resistência ao estresse térmico (frio) e ao estresse hídrico (seca), e que isso se dá em função da evolução dessas plantas que se adaptaram à sazonalidade do clima do planeta.

Na introdução deste trabalho, o primeiro item da revisão bibliográfica destaca alguns aspectos nutricionais dos frutanos. Em seguida é apresentada a ocorrência dos frutanos na natureza, seguido de informações sobre a localização desses carboidratos nos diferentes tecidos e órgãos vegetais. A estrutura molecular dos frutanos é apresentada no quarto item e dados sobre as enzimas do seu metabolismo, no quinto item.

Como neste trabalho foram aplicados tratamentos que alteraram o ciclo de desenvolvimento das plantas, o sexto item apresenta alguns conceitos sobre estresses

ambientais, dando ênfase ao estresse térmico por baixas temperaturas, e o sétimo relaciona a presença de frutanos com respostas de tolerância a baixas temperaturas.

O oitavo item apresenta dados sobre o Cerrado, um bioma tropical que apresenta diversas espécies de plantas acumuladoras de frutanos.

O nono item discorre sobre a planta utilizada neste experimento, *Vernonia herbacea*, que é uma espécie nativa do cerrado que, por acumular elevadas concentrações de frutanos em seus órgãos subterrâneos de reserva, apresenta potencial para a produção de inulina. Embora não seja ainda uma espécie cultivada, apresentou produtividade estimada em 0,522 t.ha⁻¹ em experimentos de cultivo em campo, figurando, portanto como alternativa para o uso sustentável deste ambiente em vista do crescente interesse por novas fontes de frutanos para uso na indústria alimentícia e farmacêutica.

1.1 O consumo de alimentos com frutanos e os benefícios para saúde

Os carboidratos são as principais fontes de energia para os seres vivos, além de serem importantes também em outros processos celulares como a transdução de sinais, interações celulares, constituição do citoesqueleto, etc. (Lehninger *et al.* 2002)

A função atribuída aos componentes nutricionais integra o conceito de alimento funcional, que foi criado em 1980 no Japão, sendo que o consumo destes alimentos contribui para a melhoria da qualidade de vida das pessoas. (Hidaka *et al.* 2007)

A preocupação em consumir alimentos funcionais aumentou também em função do relato de doenças associadas à ingestão de determinados compostos, como por exemplo, a ingestão de lipídios e sua associação com problemas circulatórios, ou a falta de fibras alimentares associada ao aparecimento de tumores intestinais. Da mesma maneira, o consumo humano de alguns produtos ricos em carboidratos como amido ou sacarose está associado a problemas como obesidade, cáries infantis, etc. (Hidaka *et al.* 2007)

Em vista do aumento excessivo do consumo de produtos adocicados e sua relação com o aumento de distúrbios glicêmicos, outras formas de adoçantes foram pesquisadas e, nesta linha os frutanos do tipo inulina passaram a ser utilizados a partir de 1979. Por hidrólise, os frutanos liberam frutose que é um adoçante 1,3 mais doce que a sacarose, podendo ser utilizado na composição de alimentos tornando-os menos calóricos pela menor adição de açúcar e dietético porque não exige insulina para ser metabolizada (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro 2001). Na forma de fruto-oligossacarídeos (FOS), os frutanos promovem inúmeros benefícios à saúde humana (Yun 1996).

Os frutanos do tipo inulina são polímeros de frutose originados da sacarose (fruto-polissacarídeos), sintetizados pela ação de duas frutossiltransferases, nos quais as unidades de frutose estão unidas por ligações β (2-1), são comumente encontrados em Asteraceae (Edelman & Jefford 1968).

Os FOS, fruto-oligossacarídeos da série da inulina, atuam na prevenção de cáries dentárias, redução dos níveis séricos de colesterol total e lipídeos e como estimulantes do crescimento de bifidobactérias no trato digestório (Yamashita *et al.* 1984, Hidaka *et al.* 1986, Modler *et al.* 1994).

Os FOS são pouco digeridos pelo organismo humano, entretanto a maioria das bifidobactérias é capaz de fermentá-los (Hartemink *et al.* 1997). Bouhnik *et al.* (1999) demonstraram que a ingestão de 12,5 g dia⁻¹ por 3 dias destes compostos (dose tolerada clinicamente determinada), produziu efeitos significativos de queda de microorganismos anaeróbios totais nas fezes, diminuição de pH e das concentrações de bile ácida, entre outras alterações físico-químicas, que levaram ao aumento da colonização por bifidobactérias. Os ácidos graxos de cadeias curtas, liberados durante a fermentação dos FOS por essas bactérias, ao serem absorvidos pela mucosa intestinal, entram na circulação sanguínea, diminuem a glicemia, o conteúdo de triglicerídeos e de colesterol (Roberfroid *et al.* 1993) e aumentam o volume fecal (Spiegel & Roberfroid 1994). Além disso, os FOS

também estimulam a absorção de cálcio, magnésio e ferro no cólon (Roberfroid *et al.* 1995, Coussement & Frank 1998). Na forma de inulina não hidrolisada, os frutanos vêm sendo empregados na indústria alimentícia como aditivo, devido ao sabor suave e a alta solubilidade sob aquecimento (Dysseler & Hoffem 1995). Na indústria farmacêutica pode ser utilizada para determinar o ritmo de filtração glomerular, em testes de função renal (Aires 1991).

Os FOS são conhecidos como compostos prebióticos, pois promovem o crescimento de probióticos, como *Acidophilus*, *Bifidus* e *Faecium*, promovendo, estabilizando e aumentando a proliferação dessas bactérias benéficas no trato gastrointestinal do hospedeiro. A incorporação deste composto na dieta ou uma suplementação intensifica a viabilidade e adesão dessas bactérias benéficas mudando a composição da microbiota, reduzindo inclusive a quantidade de bactérias patogênicas, tais como *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* entre outras (Spiegel *et al.* 1994, Gibson & Roberfroid 1995, Gibson *et al.* 1995).

Sakai *et al.* (2000) compararam o efeito da ingestão de FOS, frutanos de cadeias curtas com o efeito da inulina, frutanos de cadeia longa, em ratos, após anemia decorrente de gastrectomia. Feitas as determinações de concentração de hemoglobina e hematócritos, a dieta com FOS favoreceu concentrações significativamente maiores que as dietas controle e dietas com inulina, sendo que os FOS foram mais eficientes na recuperação deste tipo de anemia que a inulina.

A inulina e os FOS ocorrem como compostos de reserva em 15% das angiospermas, incluindo espécies de famílias economicamente importantes, como Asteraceae e Poaceae (Hendry & Wallace 1993).

Apesar das pesquisas com inulina terem sido intensificadas apenas nas últimas décadas, este polímero de frutose foi isolado há duzentos anos de plantas de *Inula helenium* (Asteraceae). Em 1850 tubérculos de *Helianthus tuberosus* ricos em inulina

foram misturados à farinha de trigo e utilizados no preparo de pães de baixo custo para trabalhadores. A inulina, portanto, já possui uma história secular, mas as pesquisas sobre sua funcionalidade têm aumentado nos últimos anos em vista das descobertas sobre suas aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica.

1.2 Ocorrência de Frutanos

A inulina e outros frutanos são os carboidratos mais amplamente distribuídos entre os vegetais superiores depois do amido e da sacarose (Hendry & Wallace 1993). São comuns nas Liliopsida, principalmente nas ordens Liliales e Poales de clima temperado, nas Magnoliopsida, nas quais estão restritos a quatro das nove ordens Asterales, Campanulales, Dipsacales e Polemoniales e em alguns membros de Ericales. *Cichorium intybus* e *H. tuberosus* são as espécies mais usadas na produção comercial de frutanos. Ambas pertencem à família Asteraceae, assim como *Dahlia variabilis*, *I. helenium*, *Chrysanthemum parthenium*, e as espécies nativas do cerrado *Viguiera discolor* e *Vernonia herbacea*. Nas plantas os frutanos são encontrados em diferentes quantidades, graus de polimerização, e em órgãos e tecidos distintos. (Hendry & Wallace 1993, Baert & Van Waes 1998).

Além de sua ocorrência nas angiospermas, os frutanos também são encontrados em briófitas (Sulliman *et al.* 1979) fungos, bactérias e algas (Lewis 1984).

1.3 Localização dos Frutanos (órgãos e tecidos)

Os frutanos são acumulados principalmente em órgãos subterrâneos de reserva como raízes tuberosas, rizóforos, rizomas, tubérculos e bulbos, mas também podem ser encontrados em menores quantidades em caules, folhas, inflorescências, frutos e sementes,

especialmente em Poaceae como aveia, trigo, cevada e em espécies forrageiras (Meier & Reid 1982).

Utilizando células isoladas de tubérculos de *H. tuberosus*, Frehner *et al.* (1984) demonstraram que os frutanos e as enzimas relacionadas ao seu metabolismo encontram-se no vacúolo. Entretanto, apesar da síntese de frutanos ocorrer no vacúolo (Figura 1), a presença de oligossacarídeos e da enzima de despolimerização frutano exohidrolase (FEH) foi observada no fluido apoplástico de aveia (Livingston & Henson, 1998). Estudos histológicos realizados com diversas espécies de Asteraceae do cerrado mostraram que os frutanos encontram-se distribuídos no parênquima de reserva ou concentrados no parênquima do xilema secundário (Isejima *et al.* 1991, Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993).

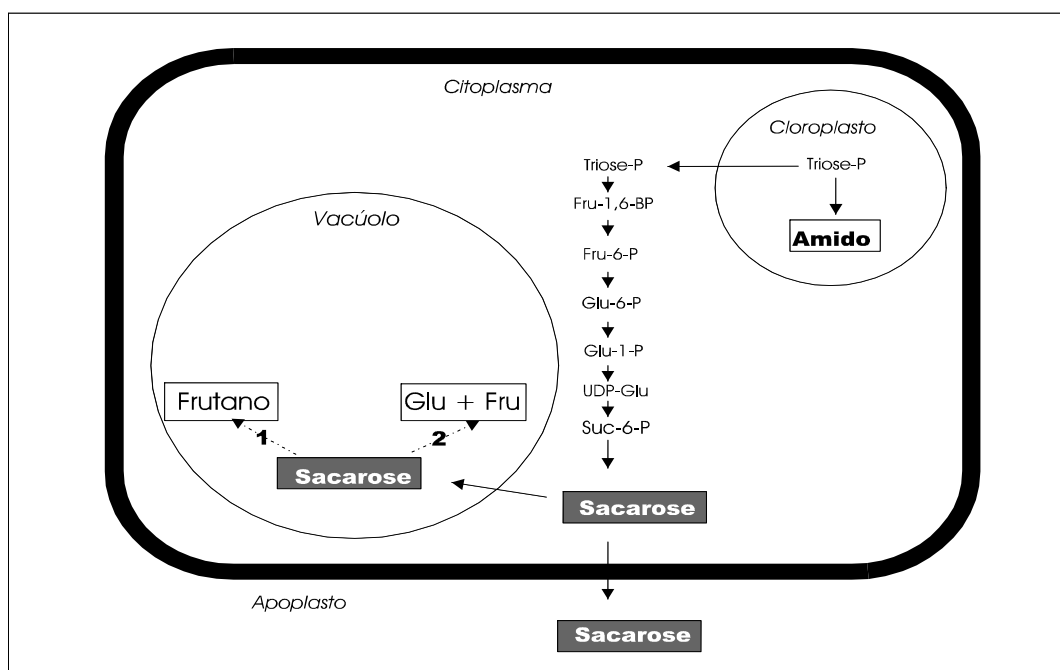


Figura 1. Representação esquemática do metabolismo de carboidratos em uma célula vegetal. A atividade fotossintética elevada é associada com taxas elevadas de exportação do carbono do cloroplasto para o citoplasma, tendo por resultado um aumento dos compostos intermediários para a síntese de sacarose. A sacarose sintetizada é distribuída para o vacúolo (armazenamento) ou para o apoplasto (exportação). No vacúolo, a sacarose pode ser convertida em frutanos por fructosiltransferases (1) ou hidrolizada a Glucose (Glu) e Frutose (Fru) pela invertase (2). Retirado de Vijn & Smeekens (1999).

O acúmulo de frutanos é influenciado pela sazonalidade, ciclo circadiano, ciclo fenológico, condições ambientais, etc., além de características intrínsecas da espécie.

1.4 Estrutura dos Frutanos

Os frutanos são polímeros de frutose sintetizados a partir da sacarose. Consistem de séries homólogas de oligo- e polissacarídeos não redutores, em que cada membro da série contém um resíduo a mais de frutose que o membro anterior. O frutano mais simples é um monofrutosil sacarose e três isômeros deste trissacarídeo foram isolados e caracterizados quimicamente, formando a base de séries homólogas com diferentes tipos de ligação (Carvalho *et al.* 2007 e referências ali contidas), conforme ilustra a Figura 2:

- Série da inulina, baseada no trissacarídeo 1-cestose (1-F-frutosil sacarose), comum nas Asterales e na qual predominam cadeias lineares com ligações do tipo β -(2,1) entre as unidades de frutose;
- Série dos fleanos ou levanos, baseada no trissacarídeo 6-cestose (6-F-frutosil sacarose) comum em Poales na qual predominam cadeias lineares com ligações do tipo β -(2,6) entre as unidades de frutose;
- Série baseada na neocestose com ligações do tipo β -(2,1) entre as unidades de frutose, comum nas Liliales, como o aspargo, alho e cebola.
- Série baseada na neocestose, com ligações do tipo β -(2,6) entre as unidades de frutose e presente em alguns membros de Poales, como *Avena*.
- Série do graminanos contendo ligações β -(2,1) e β -(2,6) em uma mesma molécula, comum em algumas Poaceae como *Lolium perene*.

Outra série composta somente por resíduos de frutose com ligações do tipo β -(2,1), sem a glucose terminal, é a inulo-n-ose, uma série redutora. Era tida como resultante da degradação de cadeias de frutanos por ação de endohidrolases ou β -glucosidase, porém em um estudo com *C. intybus*, foi demonstrado que esta série é sintetizada por uma 1-FFT que

catalisa a transferência de resíduos de frutose da inulina para a frutose livre (Van den Ende *et al.* 2002).

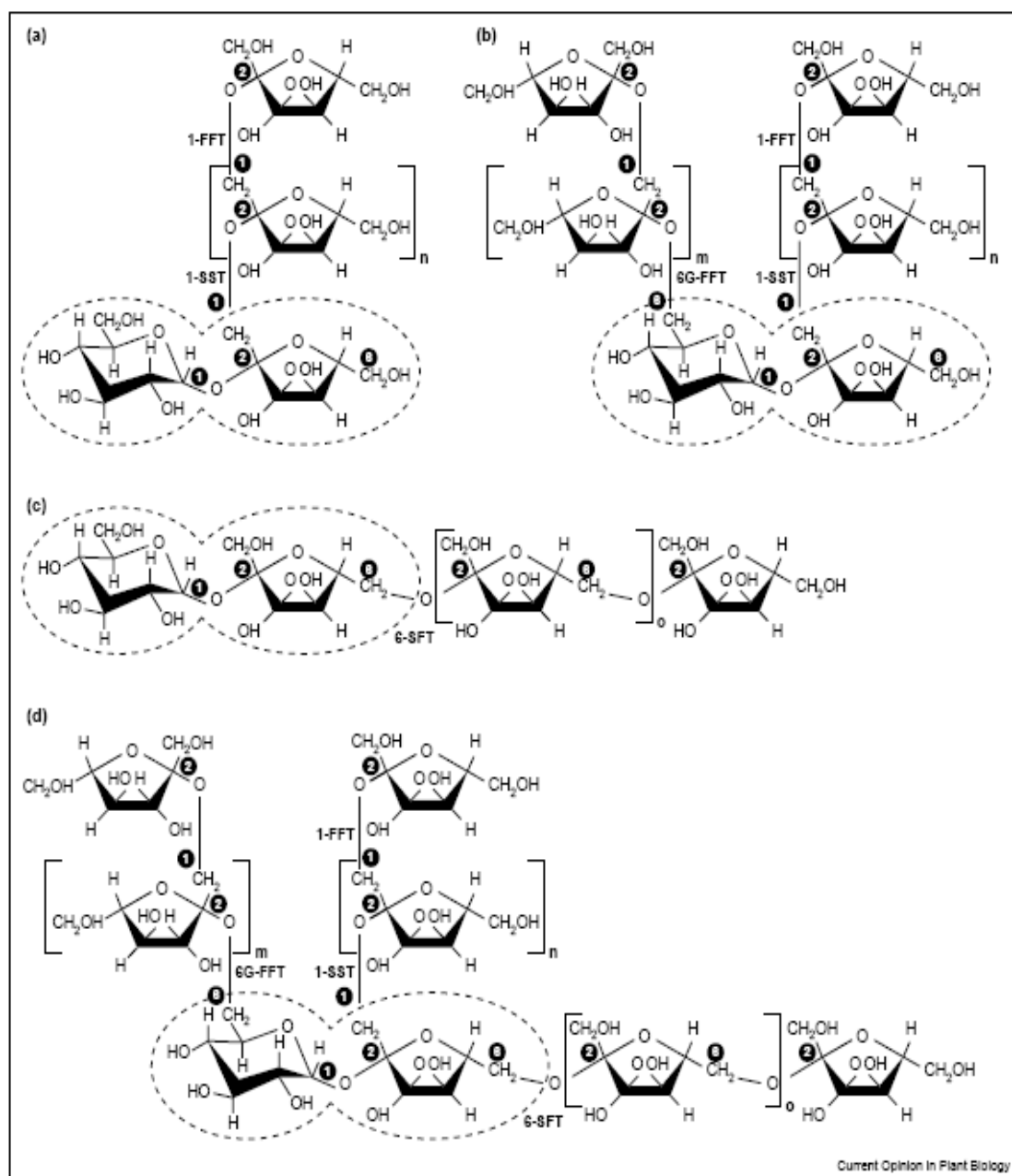
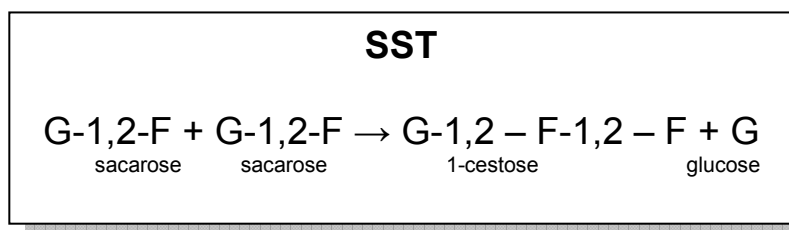


Figura 2. Exemplos de diferentes tipos de frutanos: (a) inulina; (b) neosérie da inulina; (c) levano; (d) graminano. Retirado de Ritsema & Smeekens (2003)

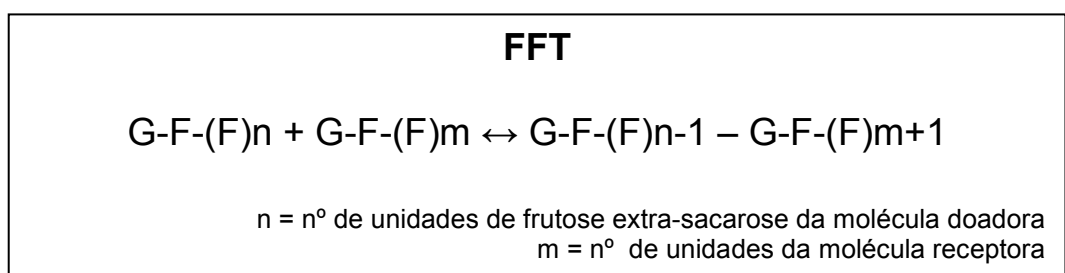
1.5 Metabolismo de frutanos

Os frutanos são sintetizados a partir da sacarose por ação de duas ou mais frutossiltransferases. O perfil de frutanos encontrado em grupos diferentes de plantas reflete a diversidade estrutural destes carboidratos e resulta da ação de múltiplas enzimas.

Segundo o modelo clássico proposto por Edelman & Jefford (1968) para tubérculos de *H. tuberosus*, duas enzimas atuam na síntese de frutanos da série da inulina, o mais simples frutano presente em plantas. A primeira enzima, 1-sacarose:sacarose frutossiltransferase (1-SST – EC 2.4.1.99), catalisa a transferência de uma unidade frutossil de uma molécula de sacarose para outra, produzindo o trissacarídeo 1-cestose, por uma reação irreversível.



A segunda enzima, 1 frutano:frutano frutossiltransferase (1-FFT – EC 2.4.1.100), catalisa a transferência reversível da unidade frutossil de uma molécula de frutano com GP ≥ 3 para outra molécula de frutano, ou para a sacarose, resultando em moléculas de frutanos com comprimentos de cadeias variáveis. Diferenças na afinidade da 1-FFT pelo substrato doador e receptor resultam em um padrão diferente de polímeros de inulina (Hellwege *et al.* 1998, 2000, Vergauwen *et al.*, 2003).



Este modelo foi confirmado por outros pesquisadores que verificaram para *H. tuberosus* (Koops & Jonker 1996, Lüscher *et al.* 1996) e *C. intybus* (Van den Ende & Van Laere 1996) que a incubação das enzimas purificadas 1-SST e 1-FFT com sacarose resultou na formação de cadeias de inulina com um comprimento de até 20 unidades de frutose.

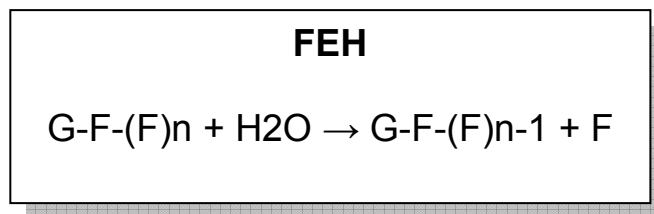
A validade deste modelo *in vivo* foi também confirmada pela expressão heteróloga simultânea de 1-SST e 1-FFT em batata (Hellwege *et al.* 2000) e em beterraba (Sévenier *et al.* 1998 in Vijn & Smeekeens, 1999) transformadas para sintetizar frutanos. Entretanto, baseado na concentração de frutanos produzidos por estas plantas transformadas, este modelo é ainda motivo de críticas (Cairns 2003).

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

O aumento nas atividades das enzimas de síntese foi demonstrado em plantas sob diferentes condições ambientais como: anóxia (Albrecht *et al.* 1993), baixas temperaturas (Jeong & Housley 1990, Prud'homme *et al.* 1993, Dionne *et al.* 2001, Chatterton & Harrison 2003) alta concentração de CO₂ (Smart *et al.* 1994, Livingston *et al.* 2000, Oliveira 2007), iluminação contínua das folhas (Simmen *et al.* 1993, Penson & Cairns 1994), alta irradiância (Cairns *et al.* 2000), exposição à seca (De Roover *et al.* 2000), fotoperíodo curtos (Legnani & Miller 2001).

Ainda, segundo Edelman & Jefford (1968) a degradação de frutanos à frutose e finalmente sacarose ocorre pela remoção sequencial das unidades terminais de frutose pela ação da frutano exohidrolase (FEH EC 3.2.1.153). Dois tipos principais de FEHs podem

ser distinguidos, dependendo do tipo de ligação que esta hidrolisa: a 1- frutano exohidrolase (1-FEH) que atua sobre ligações β -(2,1) e a 6-frutano exohidrolase (6-FEH EC 3.2.1.154) que atua sobre ligações β -(2,6).



Entretanto, uma FEH que hidrolisa ambas as ligações β -(2,1) e β -(2,6) foi purificada de *Hordeum vulgare* (Henson & Livingston 1998) enquanto FEHs que hidrolisam preferencialmente ligações β -(2,6) foram purificadas de *Avena sativa* (Henson & Livingston 1996) e de *Triticum aestivum* (Kawakami *et al.* 2005). Adicionalmente, a presença de isoformas de FEH atuando na mobilização de frutanos foi reportada para diferentes espécies, como exemplificado para *H. tuberosus* (Edelman & Jefford 1964), *C. intybus* (Claessens *et al.* 1990, Van den Ende *et al.* 2002), *Lolium rigidum* Gaud (Bonnett & Simpson, 1993), *T. aestivum* (Van den Ende *et al.* 2003, Van den Ende *et al.* 2005, Van Riet *et al.* 2006) e *V. herbacea* (Asega *et al.* 2004).

Além do seu papel na degradação de 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) atuando no controle do comprimento das ramificações.

O tamanho do polímero de frutose armazenado em órgãos de reserva varia entre as espécies. Em Asteraceae essas variações podem ser resultado de características enzimáticas diferentes de 1-FFTs e/ou de diferenças na atividade da FEH que definem o comprimento da inulina característico de uma dada espécie (Itaya *et al.* 2002, Van den Ende *et al.* 2003). Uma vez que a composição de frutanos pode variar dependendo do estágio de

desenvolvimento das plantas, bem como de fatores ambientais, a expressão temporal das enzimas ou isoenzimas poderia também ser responsável pelo comprimento do polímero (Hellwege *et al.* 1998).

A expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos parece ser regulada principalmente em nível de transcrição. Os efetores endógenos e exógenos para indução destes genes poderiam ser açúcares, hormônios ou mesmo diferentes tipos de estresses (Van den Ende *et al.* 2002).

1.6 Estresses abióticos

As plantas estão freqüentemente expostas a estresses ambientais que desempenham um papel chave na distribuição das plantas na Terra (Taiz & Zeiger 2004).

O estresse é um desvio significativo das condições ótimas para a vida das plantas, induz mudanças e respostas em todos os níveis funcionais e organizacionais, que são reversíveis a princípio, mas que podem tornar-se permanentes (Larcher 2004). A duração da severidade do estresse influencia diretamente a resposta das plantas, causando alterações na expressão gênica e no metabolismo celular, sendo importante a identificação dos mecanismos que mantêm os vegetais crescendo e se desenvolvendo durante um estresse (Buchanan 2000).

Levitt (1980) comparou o estresse à 3ª Lei de Newton (Ação e Reação), pois quando um corpo é submetido à uma força A este reagirá contra ela. Sendo assim, quando uma planta estiver sob um fator estressante (*stress*), o organismo reagirá ao estresse (*strain*). Para este autor, o *strain* pode ser reversível até certo ponto (*elastic strain*), após o qual esse estresse será irreversível (*plastic strain*) (Figura 3). O *strain* elástico é proporcional ao estresse e representa a capacidade do ser vivo de suportar uma situação de estresse.

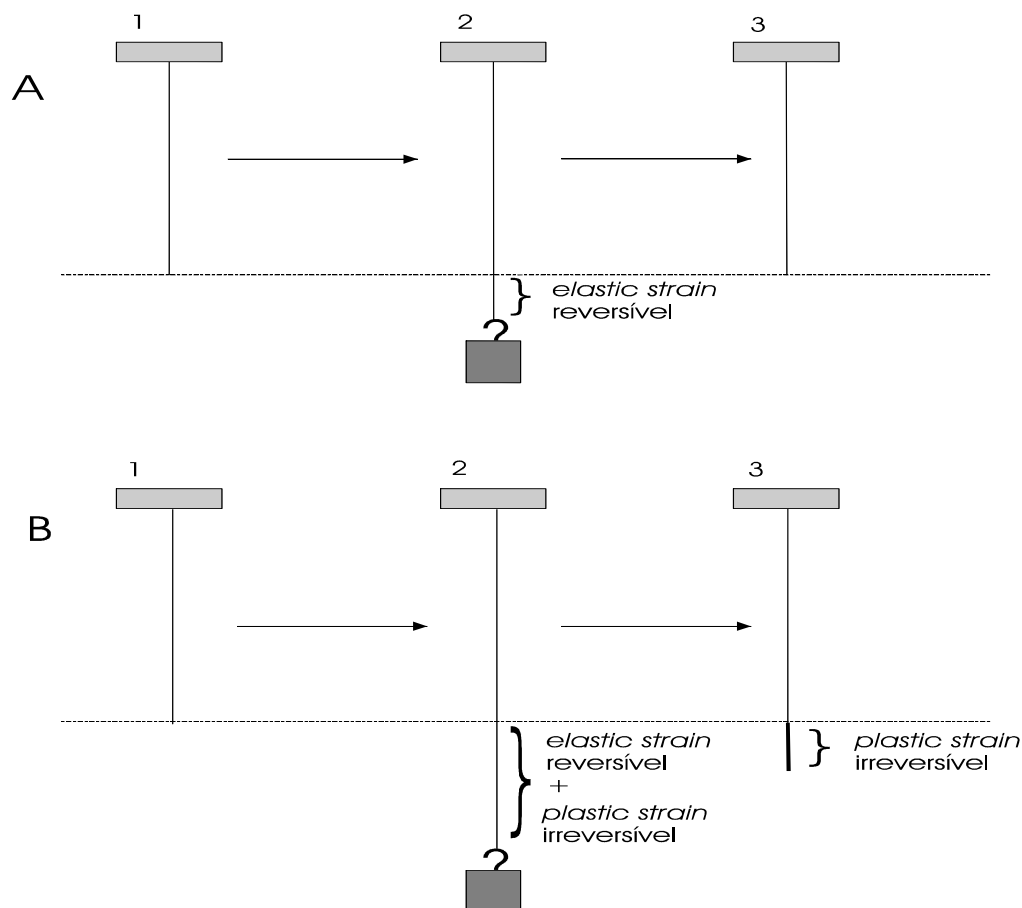


Figura. 3. (A) Um organismo (1) é submetido a uma força (2) (stress), mas apresenta uma capacidade de suportá-lo (*elastic strain*), retornando ao seu estado inicial quando essa força cessa.. B) se este organismo for submetido a uma força maior que a capacidade elástica (2) de seu metabolismo, este sofrerá alterações irreversíveis (*plastic strain*), que em muitos casos serão incorporadas à capacidade elástica do metabolismo (3). Retirado de Levitt (1980).

O estresse é um fator externo desvantajoso para as plantas que pode ser causado por fatores bióticos, como ervas daninhas, patógenos e predadores e abióticos, como déficit hídrico, temperaturas altas e baixas, salinidade, poluição e excesso ou falta de nutrientes do solo.

Alguns fatores como, por exemplo, a temperatura baixa do ar pode causar efeitos imediatos, como a murcha das folhas. Outros, como a salinidade do solo, podem causar efeitos a longo prazo, como o acúmulo de solutos osmorreguladores. A habilidade das plantas de enfrentar um ambiente desfavorável é denominada tolerância ao estresse (Taiz & Zeiger 2004). Se a tolerância aumentar como consequência da exposição anterior ao

estresse, diz-se que a planta está aclimatada. Esta tolerância é semelhante ao conceito de *strain* plástico de Levitt. A exposição ao estresse por um período de tempo menor, ou uma intensidade menor induz a planta a ativar seu metabolismo anti-estresse, e essa ativação a protege caso o estresse continue a exercer sua força, fazendo valer sua capacidade elástica (Taiz & Zeiger 2004).

A resposta ao estresse ocorre de forma a aclimatar ou a adaptar uma planta à força que o estresse lhe impõe. Se não houver a reação proporcional, pode ocorrer a morte da planta. Por isso, muitos fatores são determinantes para que as plantas possam responder ao estresse ambiental como tempo de exposição, intensidade do estresse, frequência de exposições ao estresse e exposição a fatores estressantes simultâneos (Levitt 1980, Buchanam 2000, Taiz & Zeiger 2004).

1.6.1 Estresse Térmico

Calor e frio são estados termodinâmicos, caracterizados pela alta ou baixa energia cinética das moléculas. O calor acelera o movimento das moléculas, enfraquecendo as ligações entre as macromoléculas e torna as camadas lipídicas das biomembranas mais fluídas. Contrastando com o calor, o frio torna as biomembranas mais rígidas, sendo necessário mais energia para ativar os processos bioquímicos. Os danos causados pelo estresse térmico podem ser diferentes dependendo da intensidade, duração, fase de crescimento, características intrínsecas da espécie, etc. (Figura 4) (Larcher 2004).

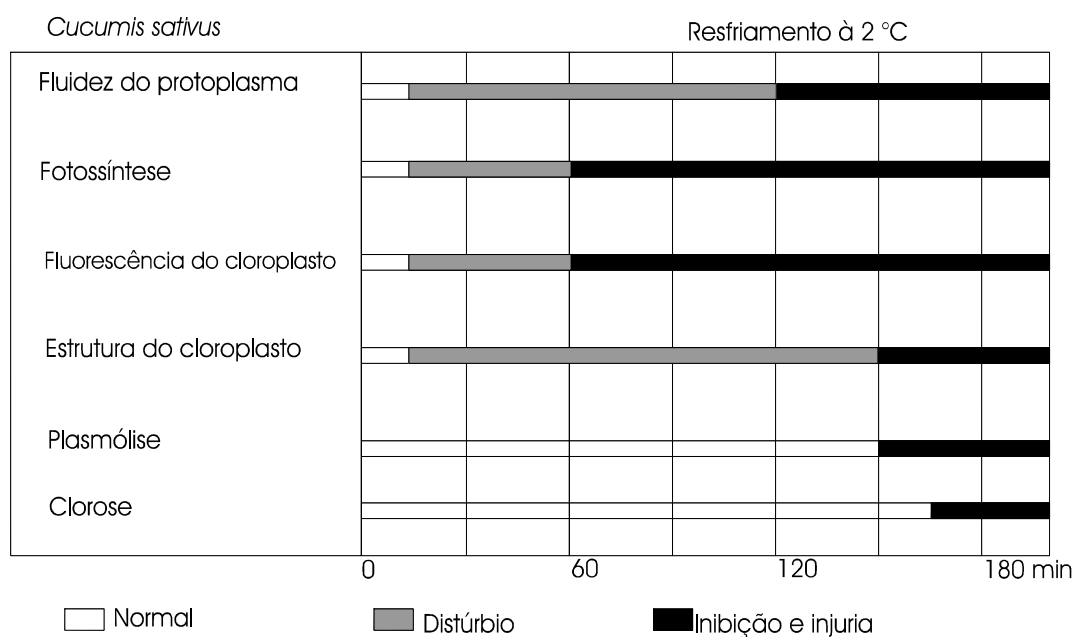


Figura. 4. Alterações em várias funções celulares sensíveis às baixas temperaturas em folhas de pepino expostas a 2 °C. Retirado de Larcher (2004)

Com a diminuição da temperatura, poderá ocorrer diminuição da velocidade das reações químicas e, portanto do metabolismo, redução do uso da água, decréscimo da biossíntese de compostos e parada do crescimento. Quanto mais freqüente, mais longos ou mais intensos forem os períodos de baixas temperaturas, mais severas serão as conseqüências para as plantas (Larcher 2004).

As baixas temperaturas podem causar alterações e degenerações nas funções celulares, como a perda da fluidez do protoplasma pelo decréscimo da respiração celular, alterações na fotossíntese e destruição de tecidos. As plantas sensíveis ao resfriamento sofrem injúrias letais sob temperaturas bem próximas ao ponto de congelamento da água, incluindo danos nas biomembranas e interrupção do suprimento de energia celular (Larcher 2004).

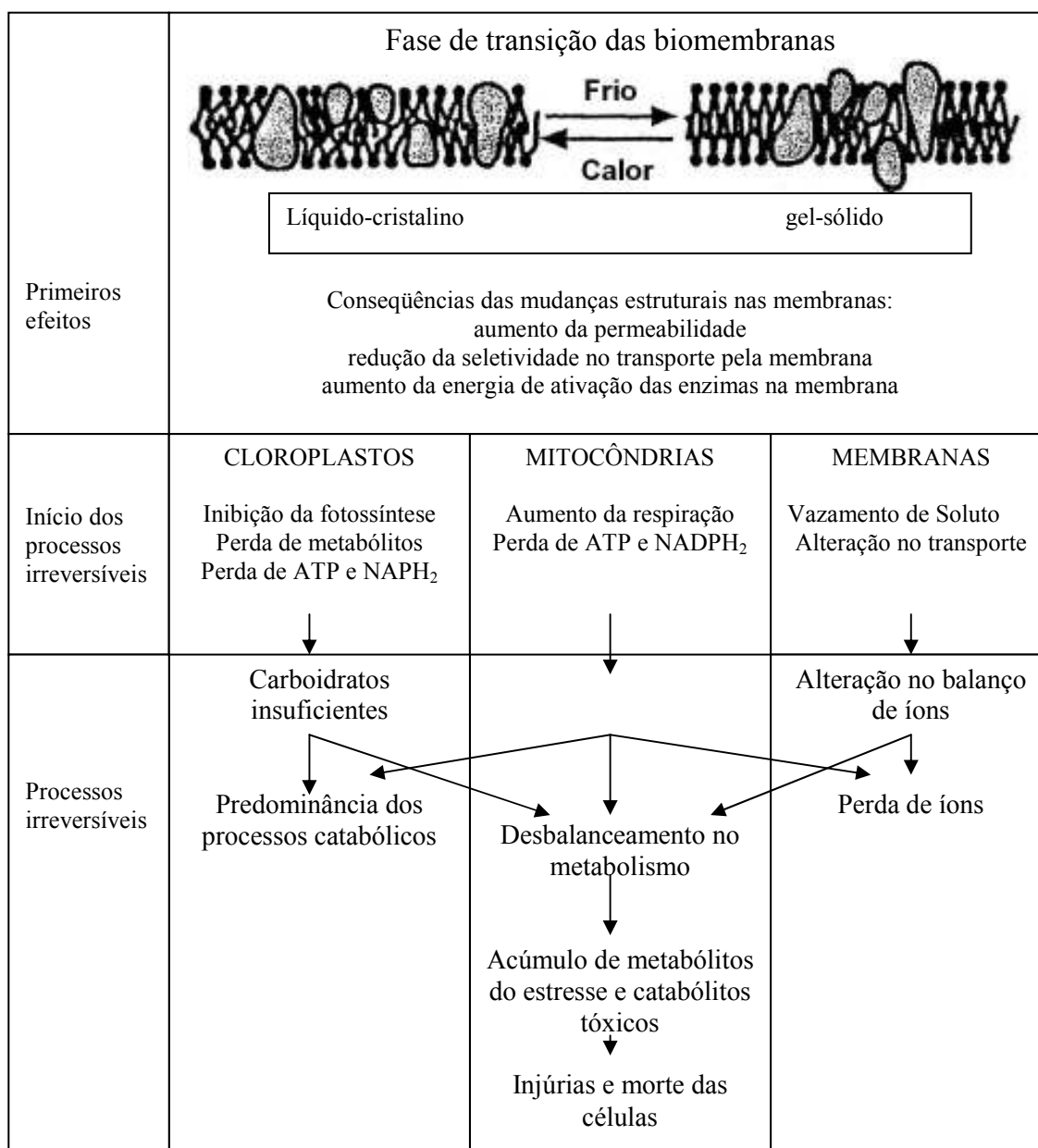


Figura 5. Sequência de eventos que ocorrem como conseqüência de alterações nas biomembranas Retirado de Larcher (2004).

A composição lipídica da membrana de plantas resistentes ao frio apresenta uma proporção maior de ácidos graxos não-saturados do que a de plantas sensíveis ao resfriamento. Essa modificação diminui a temperatura sob a qual ocorre a alteração dos lipídeos da fase fluída para a semi-cristalina, permitindo às membranas permanecerem fluídas sob temperaturas mais baixas. Plantas que são aclimatadas para as baixas temperaturas apresentam aumento da atividade das enzimas dessaturases, tornando a

proporção de lipídeos não-saturados maior e elevando a proteção que estes lipídeos conferem contra o resfriamento (Taiz & Zeiger 2004).

Com a diminuição da fluidez das membranas, seus componentes protéicos podem não funcionar adequadamente, ocorrendo a inibição da H^+ -ATPase, do transporte de solutos para dentro e para fora das células, da transdução de energia e do metabolismo dependente de enzimas (Taiz & Zeiger 2004).

As plantas podem ser classificadas em espécies totalmente sensíveis, em que qualquer parte da planta é suscetível ao dano causado pelo frio e espécies parcialmente sensíveis, nas quais alguns órgãos são mais sensíveis do que outros (Figura. 6). Variações na sensibilidade podem ocorrer em diferentes estágios do crescimento e desenvolvimento da planta (Larcher 2004).

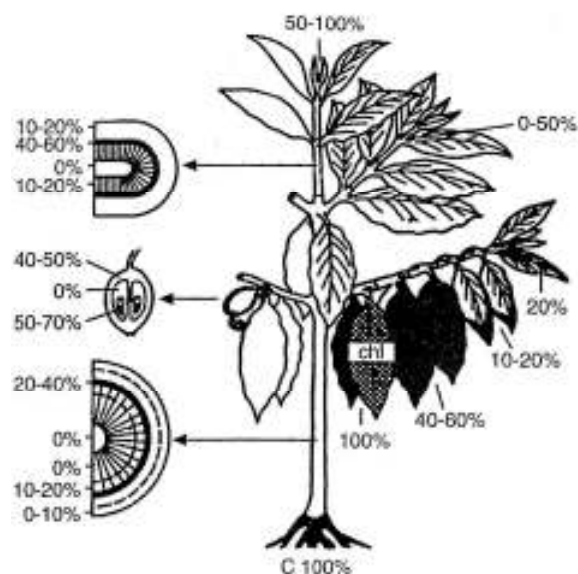


Figura 6. Sensibilidade ao frio de órgãos e tecidos de *Coffea arabica*. Porcentagem de injúrias quando expostas a temperatura de 1 °C: os órgãos e tecidos mais suscetíveis são raízes, câmbio, folhas senescentes, folhas com clorose e gemas abrindo e embriões em sementes. Retirado de Larcher (2004).

Espécies tropicais e subtropicais são mais suscetíveis a injúrias por resfriamento do que espécies de clima temperado. Quando submetidas a temperaturas entre 15 e 10 °C os

danos incluem crescimento mais lento, clorose, murcha no caso de resfriamento das raízes (Taiz & Zeiger 2004).

A proteção celular ao resfriamento pode ser feita por carboidratos e algumas proteínas, crioprotetores que estabilizam proteínas e lipídeos das membranas durante a desidratação induzida por temperaturas baixas. Por exemplo, plantas de trigo acumulam sacarose em resposta a temperaturas baixas; uma glicoproteína crioprotetora foi isolada das folhas de *Brassica oleraceae* (repolho) aclimatada ao frio; cereais de inverno durante a aclimação acumulam açúcares solúveis nas paredes celulares, inibindo a formação de cristais de gelo. Desta forma, açúcares como a sacarose, a rafinose, os frutanos, o sorbitol ou manitol, entre outros, contribuem para a proteção celular contra as baixas temperaturas (Taiz & Zeiger 2004).

1.7 Frutanos e a tolerância a estresses ambientais

O papel dos frutanos na tolerância ao frio e à seca vem sendo amplamente estudado (Pontis & Del Campillo 1985, Puebla *et al.* 1997, Konstantinova *et al.* 2002, Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004), e a sua atuação na regulação osmótica sugerida (Spollen & Nelson 1994). Segundo Hendry e Wallace (1993), as teorias de sobrevivência a baixas temperaturas e regulação osmótica se unem em um único aspecto, o crescimento sazonal das plantas. Como já mencionado, as espécies que contém frutanos são mais abundantes em regiões onde o crescimento ocorre primordialmente em determinadas fases do ciclo anual da planta, por exemplo, em regiões que apresentam regime sazonal de chuvas. Plantas acumuladoras de frutanos crescem em regiões áridas e muito quentes do México, como por exemplo, *Agave* spp. (Agavaceae) (Mancilla-Margalli & Lopez 2006) e em regiões muito frias da Antártica, como por exemplo, *Deschampsia antarctica* Desv.

(Poaceae) e *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl (Cariophyllaceae), as duas únicas angiospermas que colonizaram as ilhas Antárticas (Bravo *et al.* 2001).

Em várias espécies, o acúmulo de frutanos durante o período de menor crescimento coincide com o aumento da tolerância ao frio (Eagles 1967, Babenko & Gevorkyan 1967, in Livingston *et al.* 2007, Pontis 1989). Este acúmulo ocorre em muitas plantas como resposta ao frio e é comum em plantas de regiões que passam parte do seu ciclo anual de desenvolvimento sob baixas temperaturas. Já nos trópicos, o acúmulo de frutanos ocorre comumente em plantas com crescimento sazonal, como por exemplo em plantas do cerrado (Carvalho *et al.* 2007).

O acúmulo de frutanos leva a uma alteração na concentração de solutos e suas propriedades coligativas internas da célula. Johanssen (1970) observou uma diminuição no ponto de congelamento com o aumento da concentração de solutos em plantas de aveia. Do ponto de vista fisiológico, conforme mencionado acima, os frutanos estariam associados à proteção das plantas contra o frio e a seca, por atuarem na regulação osmótica da célula (Van den Ende *et al.* 2002 e referências ali contidas).

Embora o mecanismo molecular envolvido nesses processos ainda não esteja completamente esclarecido, os frutanos parecem atuar também na estabilização das membranas durante o dessecamento ou congelamento (Hinch *et al.* 2000, 2002, 2007).

O envolvimento dos frutanos na tolerância à seca também foi sugerido a partir de experimentos com plantas de tabaco transgênicas para a síntese de frutanos que demonstraram maior tolerância à seca quando comparadas com as plantas selvagens (Pilon-Smits *et al.* 1995, Konstantinova *et al.* 2002).

As membranas são as primeiras estruturas afetadas pelo efeito do congelamento e da dessecação, causando injúria nas células e os frutanos parecem atuar na sua estabilização sob essas condições estressantes (Demel *et al.* 1998). Experimentos mostraram para *C. intybus* que durante a seca causada pelo frio, a aplicação de inulina

associada à fosfatidilcolina dos lisossomos, reduziu o grau de ligação entre os lipídeos, diminuindo a porcentagem de injúrias e vazamentos na membrana após a reidratação (Hincha *et al.* 2000). Estudos posteriores mostraram que no caso da chicória, a crioproteção ocorreu pela atuação dos fruto-oligossacarídeos ($GP \leq 10$), por se tratarem de moléculas mais solúveis do que os fruto-polissacarídeos também presentes na planta (Hincha *et al.* 2002, Vereyken *et al.* 2003).

Para o *Bacillus subtilis* (bactéria), a crioproteção é o resultado da ação dos frutanos com massa molecular de aproximadamente 25000 (Vereyken *et al.* 2003). Os levanos destas bactérias são mais solúveis em água do que a inulina de chicória, e atua da mesma forma na proteção das membranas, pela diminuição da temperatura de passagem do estado de líquido cristalino para gel dos lipídeos, mantendo a mobilidade dos ácidos graxos (Vereyken *et al.* 2003). Assim, os frutanos promovem a manutenção da flexibilização das membranas mantendo sua função mesmo sob estresse (Hincha *et al.* 2006).

1.8 O Bioma Cerrado

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

O clima predominante no cerrado é o Tropical sazonal, de inverno seco. A temperatura média anual fica em torno de 22-23°C, as máximas absolutas mensais variam ao longo dos meses do ano, podendo chegar acima de 40°C. Já as mínimas absolutas

mensais variam bastante, atingindo valores próximos ou até abaixo de zero nos meses de maio, junho e julho. A ocorrência de geadas no cerrado não é fato incomum, ao menos em sua porção austral (Eiten 1972, Coutinho 2002).

A vegetação do cerrado pode ser definida como xeromorfa preferencialmente de clima estacional, com aproximadamente seis meses secos; não obstante poder ser encontrada também em ambiente ombrófilo. Reveste solos lixiviados aluminizados, apresentando sinúsias de hemicriptófitos, geófitos e fanerófitos oligotróficos de pequeno porte com ocorrência em toda a zona Neotropical (Eiten 1972, Mantovani & Martins 1988, Coutinho 2002).

A vegetação do estrato herbáceo-subarbustivo é formada também por espécies predominantemente perenes e cerca de 50% desta vegetação possui órgãos subterrâneos espessados como bulbos, rizóforos, xilopódios, etc., que lhes garantem sobreviver à seca e ao fogo. (Mantovani & Martins 1988, Coutinho 2002). A brotação das gemas subterrâneas ocorre na primavera, seguindo-se um rápido desenvolvimento floral desde o verão até o início do outono. O crescimento da parte aérea é interrompido, pois ao final do inverno, ocorre a quebra da dormência e a brotação das novas gemas.

No período de estiagem, o solo se desseca realmente, mas apenas em sua camada superficial (1,5 a 2 m de profundidade), provocando uma deficiência hídrica no estrato herbáceo-subarbustivo, cuja parte aérea se desseca e morre embora suas partes subterrâneas se mantenham vivas (Goedert 1985, Coutinho 2002).

A termoperiodicidade diária e estacional parece ser um fator de certa importância para a vegetação do cerrado, particularmente para o estrato herbáceo-subarbustivo. Geadas, todavia, prejudicam bastante as plantas matando suas folhas, que logo secam e caem, aumentando em muito a serrapilheira e o risco de incêndios (Eiten 1972, Coutinho 2002).

1.9 *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby

A presença de frutanos em Asteraceae foi documentada para a flora de regiões temperadas, que apresenta padrão sazonal de crescimento (Pollard & Amuti 1981) e para uma área subtropical do cerrado brasileiro, onde as plantas estão sujeitas a períodos de intensa seca no inverno (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993, Carvalho *et al.* 2007). Dentre as Asteraceae herbáceas desta área de cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (22° 35' S e 47° 44' W), encontra-se *V. herbacea*, com órgãos subterrâneos espessados, de origem caulinar, denominados rizóforos. Os rizóforos atuam como órgãos de reserva para a planta, armazenando até 80% da sua massa de matéria seca em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich 1993), além de serem responsáveis pela reprodução vegetativa da planta, pois apresentam gemas axilares que dão origem a ramos aéreos (Hayashi & Appezatto-da-Glória 2005). Em geral, as gemas localizadas na região do rizóforo mais próxima à zona de inserção do caule (região proximal) dão origem aos ramos aéreos, enquanto aquelas localizadas próximas ao ápice do rizóforo (região distal) dão origem a novas ramificações do rizóforo (Portes & Carvalho 2006).

V. herbacea apresenta um padrão bem definido de desenvolvimento sazonal característica de espécies do Cerrado, com um período de dormência no inverno, quando os ramos aéreos senescem, e a planta fica restrita aos órgãos subterrâneos (Carvalho & Dietrich 1993). No início da primavera ocorre a brotação de novos ramos aéreos a partir de gemas subterrâneas presentes nos rizóforos, seguida pela floração e por um período de crescimento da parte aérea que se estende até o início do outono.

Variações no conteúdo e na composição dos frutanos ocorrem durante o ciclo anual de desenvolvimento das plantas (Carvalho & Dietrich 1993). A biossíntese de frutanos ocorre principalmente no verão, quando os ramos aéreos encontram-se bem desenvolvidos

(fase vegetativa), enquanto sua mobilização ocorre na primavera, durante a brotação de novos ramos aéreos. A mobilização também pode ocorrer em outras épocas do ano, induzida pela remoção dos ramos aéreos e rebrota subsequente de novos ramos (Asega & Carvalho 2004). Essas autoras verificaram também que a indução da brotação promove a atividade da FEH e inibe a da SST. Assim, os rizóforos atuam como órgãos dreno na fase vegetativa e como órgãos-fonte durante a brotação.

Variações no conteúdo de frutanos e nas atividades das enzimas do seu metabolismo foram observadas também ao longo do eixo de crescimento dos rizóforos, entre as regiões proximal, mediana e distal (Portes & Carvalho 2006). Neste estudo foi verificado que de maneira geral, as enzimas SST e FFT apresentaram atividades mais elevadas em plantas na fase vegetativa, enquanto a FEH apresentou atividade mais elevada em plantas na fase de brotação natural ou induzida. A atividade da FEH foi intensificada em plantas armazenadas no frio (5 °C) após indução à brotação pela remoção dos ramos aéreos (Asega 2007). Com relação à distribuição espacial das atividades enzimáticas, Portes & Carvalho (2006) verificaram que a SST e a FFT apresentaram atividade mais elevada na região distal, que diminuiu no sentido proximal dos rizóforos. A FEH, por sua vez apresentou atividade mais elevada na região proximal, diminuindo no sentido distal. A proporção de fruto-oligossacarídeos, em relação aos polissacarídeos, foi maior em plantas submetidas ao frio, enquanto na fase vegetativa e naquelas induzidas à brotação, a proporção de fruto-polissacarídeos foi superior, sugerindo o envolvimento dos oligossacarídeos no ajuste osmótico de plantas ao frio (Portes *et al.* 2008).

Objetivo

Tendo em vista que as variações no teor e na composição de frutanos bem como nas atividades das enzimas do seu metabolismo ocorrem não apenas ao longo do ciclo fenológico das plantas, mas também ao longo do eixo de crescimento dos rizóforos e em plantas sob diferentes condições fisiológicas e a hipótese de que os frutanos atuam na tolerância das plantas ao frio, este trabalho teve como objetivo estudar a distribuição espacial dos frutanos e das enzimas do seu metabolismo em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby induzidas à brotação e submetidas à temperatura baixa.

Para atingir o objetivo, foram analisadas as atividades das enzimas SST, FFT, FEH e Invertase e a composição de frutanos nas regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de plantas, em fase vegetativa, em plantas induzidas à brotação pela remoção de ramos aéreos e em plantas intactas e excisadas mantidas a 5°C.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Foram utilizados rizóforos de plantas adultas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby com um ano de idade, em fase vegetativa de desenvolvimento, cultivadas em vasos individuais (3 L) contendo terra de canteiro como substrato e mantidos próximos aos canteiros da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo.

Após cada coleta os rizóforos foram lavados em água corrente e fragmentados (Figura 7). Amostras das regiões distal, mediana e proximal destes órgãos foram retiradas, pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até a realização das análises. As amostras foram submetidas à extração enzimática e de frutanos, em triplicata, sendo cada planta correspondente a uma repetição.

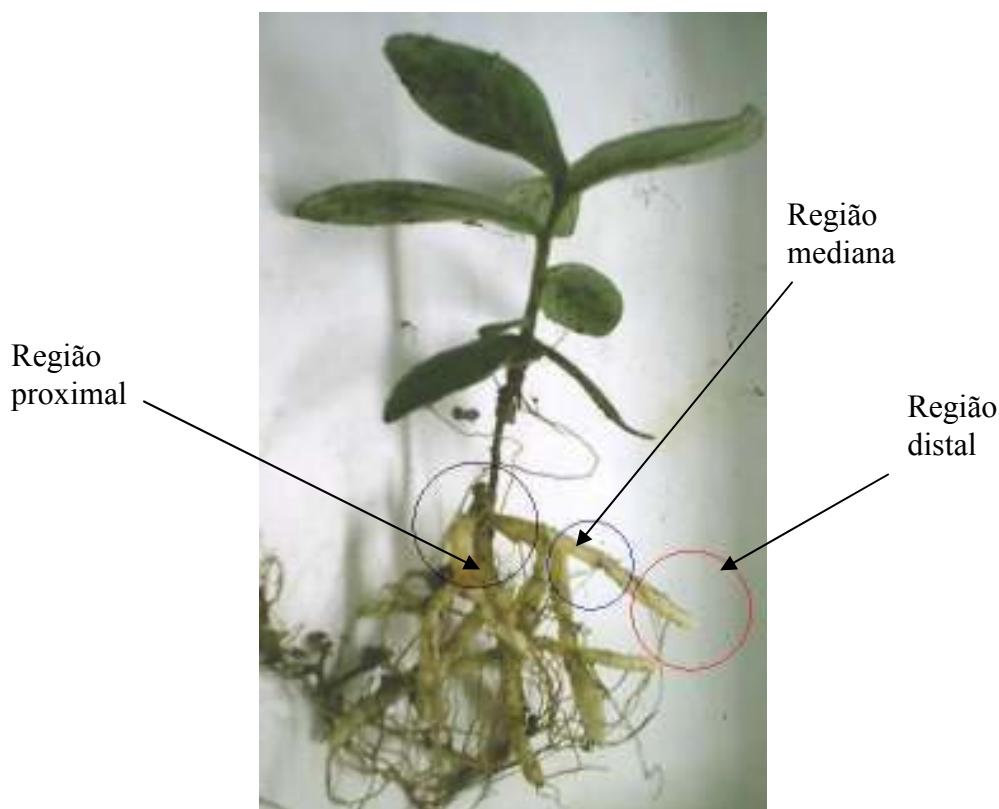


Figura 7. Aspecto geral de uma planta de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby em fase vegetativa e o padrão de fragmentação dos rizóforos.

2.2 Tratamentos aplicados

Parte das plantas em fase vegetativa e, portanto, com a parte aérea intacta foi coletada no início do experimento, constituindo as plantas do lote Vegetativo – Tempo 0 (**Veg – T 0**) e outra parte, mantida sob condições naturais de luz e temperatura em casa de vegetação, foi coletada após 21 dias, constituindo as plantas do lote Vegetativo – 21 d (**Veg – 21 d**). O restante das plantas foi submetido às seguintes condições experimentais por 21 dias e/ou 21+7dias:

- Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas sob condições naturais de luz e temperatura em casa de vegetação (**Brotação Induzida**);
- Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente, em câmaras de crescimento no escuro (**Intactas/TAmb**);
- Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas em temperatura ambiente, em câmaras de crescimento no escuro (**Exc/TAmb**);
- Manutenção de plantas intactas a 5°C, em câmara fria no escuro (**Intactas/5 °C**);
- Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas a 5 °C, em câmara fria no escuro (**Exc/5°C**);
- Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente em casa de vegetação (vegetativo – 21 d), seguido de 7 dias a 5 °C (**Intactas/7d 5 °C**) em câmara fria no escuro;
- Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos em casa de vegetação (Brotação Induzida), seguido de 7 dias a 5 °C em câmara fria no escuro (**Induzida/7d 5 °C**).

2.3 Extração de Carboidratos Solúveis (Frutanos)

Amostras de rizóforos previamente congeladas em nitrogênio líquido foram liofilizadas, pulverizadas em almofariz e submetidas à fervura por 5 min em etanol 80% para inativação das enzimas. Em seguida, os homogeneizados foram mantidos em banho-maria a 80 °C por 15 min e centrifugados por 15 min a 1000 g, em temperatura ambiente. Os precipitados foram re-extraídos mais duas vezes em etanol 80%, a 80 °C. Os resíduos finais foram submetidos duas vezes à extração em água por 30 min a 60 °C e filtrados a vácuo em tecido de algodão. Os sobrenadantes da extração etanólica e os filtrados foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório a 40 °C. O extrato final de frutanos totais foi submetido à precipitação a frio com três volumes de etanol comercial, para separação das frações de fruto -oligo e -polissacarídeos. A seguir, foram centrifugados a 700 g por 20 min a 5 °C. Os precipitados foram ressuspensos em água e constituíram as frações de fruto-polissacarídeos, e os sobrenadantes foram concentrados em evaporador rotatório a 40 °C até eliminação do etanol e constituíram as frações de fruto-oligossacarídeos (Carvalho *et al.* 1998).

2.4 Análise Quantitativa dos Frutanos

O conteúdo de frutose livre e ligada foi determinado nas frações de fruto-oligo e -polissacarídeos, pelo método de antrona modificado por Jermyn (1956) para cetoses, utilizando-se frutose ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma®) como padrão.

2.5 Análise Qualitativa dos Frutanos

Amostras de fruto-oligossacarídeos foram deionizadas utilizando-se resinas de troca iônica em tubos do tipo eppendorf. Na primeira etapa foi utilizada resina na forma catiônica (Dowex 50 x 40 x 200), sendo a mistura da resina e amostra, homogeneizada e centrifugada por 3 min a 12.000 g. O sobrenadante foi misturado, em seguida, com resina aniônica (Dowex 1 x 8 x 200), centrifugado a 12.000 g e o sobrenadante utilizado para análise.

As amostras deionizadas 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 e coluna Carbo Pac PA1 (2 x 250 mm) na concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A eluição dos fruto-oligossacarídeos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150 mM de NaOH) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio) com a seguinte programação: 0 – 2 min. 25 mM; 2,1 – 8 min., 50 mM; 8,1 – 28 min., 350 mM; 28,1 – 30 min., 500 mM; 30,1 – 35 min., 25 mM. Os potenciais aplicados ao PAD para 0 – 0,4 s, 0,41 – 0,6 s, 0,61 – 1 s foram 0,05, 0,75 e -0,15, respectivamente. O fluxo foi de 0,25 mL min.⁻¹.

2.6 Extração Enzimática

Os rizóforos foram homogeneizados em tampão citrato fosfato (Mc Ilvaine – citrato fosfato) 50 mM, pH 5,5, contendo 2 mM de EDTA, 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β -mercaptoetanol e 10% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:3 (w/v). O homogeneizado foi filtrado em nylon duplo e ao filtrado foi adicionado sulfato de amônia a

20% de saturação, sendo esta mistura mantida em repouso por uma noite em câmara fria (5 ± 2 °C). Após centrifugação a 12.000 g por 20 minutos, o precipitado foi descartado e, ao sobrenadante, foi adicionado sulfato de amônia a 80% de saturação. A mistura foi mantida em repouso por 1 hora seguindo-se uma centrifugação a 17.400 g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, constituído principalmente por proteínas, foi ressuspenso em tampão de extração na proporção de 10 gramas de massa fresca mL⁻¹ e submetido à dessalinização em colunas de Bio Gel P-6 DG, obtendo-se os extratos enzimáticos brutos. Toda a manipulação do material, durante a extração enzimática, foi realizada a 5 °C.

O conteúdo de proteína nos extratos enzimáticos foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o reagente da Bio Rad e albumina de soro bovino como padrão.

2.7 Determinação das Atividades Enzimáticas

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. Os tempos de incubação foram de 1 h para a atividade da SST, 2 h para a FFT e 4 h para invertase e da FEH.

Para a determinação das atividades da SST e da FFT, amostras das misturas de incubação foram diluídas 100X em água deionizada e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução e detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex modelo ICS - 3000, usando 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 hidróxido de sódio) na 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 $0,25 \text{ mL min}^{-1}$. 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 frutose (Sigma®) como padrão. A análise qualitativa dos produtos de incubação da FEH foi feita por HPAEC/PAD em sistema descrito anteriormente, utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio), conforme condições descritas para a análise de frutanos. Para essa análise as misturas de incubação foram diluídas 50 vezes.

Para a determinação da atividade da invertase, as misturas de incubação foram diluídas 50X em água deionizada e 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, respectivamente, e o fluxo aplicado foi de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$. A atividade de invertase foi determinada pela área do pico da frutose, utilizando-se padrão externo.

Resultados e Discussão

A atividade da FEH em plantas sob os diferentes tratamentos está apresentada na figura 8. A atividade desta enzima promove a remoção de unidades de frutose diminuindo o comprimento das cadeias de frutanos. O aumento da atividade da FEH é induzido quando há a remoção da parte aérea e brotação de novos ramos da planta (**Brotação Induzida**).

Conforme mostram os dados para o rizóforo inteiro (figura 8A), em todos os casos, exceto nas plantas que permaneceram no frio por 21 dias (**Intactas/5°C** e **Exc/5°C**) que apresentaram atividades semelhantes entre si, as plantas excisadas e submetidas aos diferentes tratamentos apresentaram atividade de FEH mais elevada do que as plantas intactas que receberam tratamento semelhante. Desse modo, plantas induzidas à brotação (**Brotação Induzida**) apresentaram atividade mais elevada do que as plantas intactas mantidas sob condições semelhantes de luz e temperatura (**Veg – 21 d**); plantas excisadas sob temperatura ambiente, no escuro (**Exc/TAmb**) apresentaram atividade mais elevada do que as plantas intactas sob essas mesmas condições (**Intactas/TAmb**); e, finalmente, as plantas excisadas, induzidas à brotação e submetidas em seguida por 7 dias a 5°C (**Induzida/7d 5°C**) apresentaram atividade mais elevada do que as plantas intactas do lote correspondente (**Intactas/7d 5°C**). As plantas intactas e em fase vegetativa no início do experimento (**Veg – T0**) e aos 21 dias (**Veg – 21 d**) apresentaram atividades baixas e inferiores ainda às apresentadas pelas plantas intactas submetidas aos diferentes tratamentos.

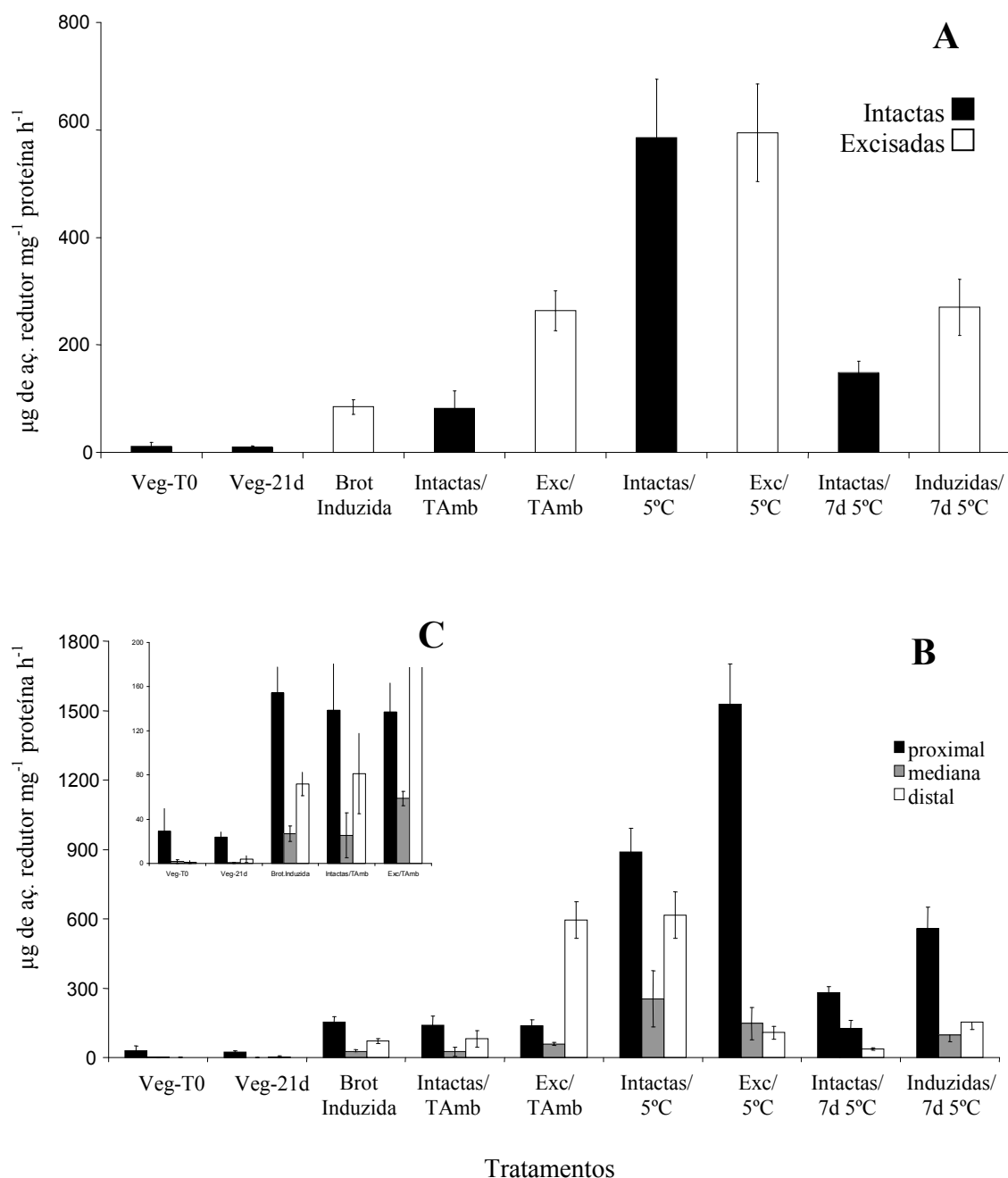


Figura 8. Atividade da FEH em rizóforos de *Vernonia herbacea* determinada após 4 horas de incubação. **A)** Atividade média da FEH nos rizóforos inteiros. **B)** Atividade da FEH nas regiões proximal, mediana e distal. **C)** Ampliação da escala para os cinco primeiros tratamentos. Tratamentos: Vegetativo – Tempo 0 (**Veg-T0**); Vegetativo – 21 d (**Veg-21d**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (**Brot Induzida**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente, no escuro (**Intactas/TAmb**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas em temperatura ambiente, no escuro (**Exc/TAmb**); Manutenção de plantas intactas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Intactas/5°C**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Exc/5°C**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Brotação Induzida), seguido de 7 dias a 5 °C (**Induzidas/7d 5°C**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente (vegetativo – 21 d), seguido de 7 dias a 5°C (**Intactas/7d 5°C**). As barras representam o erro padrão da média (n=3).

Plantas mantidas no frio, excisadas ou intactas, apresentaram em geral um aumento marcante na atividade da FEH em relação às demais, embora o aumento tenha sido maior nas plantas excisadas, conforme mencionado acima, e nas plantas mantidas no frio por 21 dias. Plantas mantidas sob 5°C por 7 dias (Intactas 7d/5°C e Induzidas 7d/5°C) apresentaram aumento de atividade em relação aos seus controles (Veg – 21d e Brot Induzida), porém inferior às atividades apresentadas pelas plantas mantidas a 5°C por 21 dias.

O aumento da atividade da FEH foi verificado anteriormente em plantas de *V. herbacea* (Asega & Carvalho 2004) e *V. discolor*, outra espécie nativa do cerrado (Degasperi *et al.* 2003), induzidas à brotação pela remoção de ramos aéreos. Em *V. herbacea* este aumento foi ainda maior em plantas induzidas à brotação e em seguida armazenadas a 5 °C por 7 dias (Asega 2007) e em plantas excisadas e mantidas a 5°C também por 21 dias (Portes *et al.* 2008). O aumento da atividade desta enzima já foi descrito na literatura para outras Asteraceae em fase natural de brotação como *Taraxacum officinale* (Rutherford & Deacon 1974), *C. intybus* (Van den Ende & Van Laere 1996) e *H. tuberosus* (Marx *et al.* 1997) e em plantas induzidas à brotação por desfolhação como *Polymia sonchifolia* (Fukai *et al.*, 1997), *C.* (De Roover *et al.* 1999).

Os resultados obtidos demonstraram que a permanência de plantas no frio por um período mais longo resultou em um maior aumento da atividade da FEH, além de confirmarem que o frio é um fator intensificador da atividade da FEH em plantas já induzidas à brotação.

O aumento da atividade da FEH em plantas submetidas à baixa temperatura é consistente com resultados anteriores obtidos com *V. herbacea* (Asega 2007, Portes *et al.* 2008) e com raízes de *C. intybus* (Van den Ende *et al.* 2001) que demonstraram que esta enzima pode ser induzida pelo frio.

Van den Ende *et al* (2001) verificaram que duas isoformas de FEH (FEH I e FEH II) de *C. intybus* são induzidas sob condições diferentes; a FEH I é induzida em plantas submetidas à temperatura baixa e a FEH II é induzida tanto em plantas desfolhadas, induzidas à brotação, como em plantas submetidas à temperatura baixa.

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a hipótese já apresentada nos trabalhos anteriores realizados com *V. herbacea* de que pelo menos duas isoformas de FEH ocorrem nessas plantas, uma induzida pela excisão dos ramos aéreos e outra induzida pelo frio.

Analisando-se a distribuição da atividade da FEH nas diferentes regiões do rizóforo, verifica-se que esta foi, em geral, mais elevada na região proximal (figura 8 B), confirmando resultados de Portes & Carvalho (2006). Entretanto, o gradiente crescente de atividade no sentido distal-proximal do rizóforo, verificado anteriormente, não foi observado no presente trabalho. Diferença marcante na atividade entre as plantas intactas e excisadas mantidas no frio por 21 dias (**Intactas/5°C e Exc/5°C**), embora não observada quando se analisa a atividade no rizóforo inteiro (figura 8A) pode ser claramente observada na região proximal do rizóforo (figura 8B).

Em plantas induzidas à brotação, a atividade mais elevada da FEH na região proximal do rizóforo indica um aumento na mobilização dos frutanos para o crescimento da planta próximo à região de inserção dos ramos aéreos. Em plantas não induzidas à brotação, no entanto, o aumento da FEH está provavelmente associado ao papel de proteção ao frio exercido pelos frutanos. Neste caso, a ação da FEH levaria a uma maior disponibilização de frutose, sacarose e frutanos de cadeias curtas, compostos osmoticamente mais ativos do que os frutanos de cadeias longas. A ação desses compostos na tolerância ao frio, por sua vez, seria pelo ajuste osmótico e/ou pela estabilização das membranas, conforme já demonstrado para modelos experimentais (Demel *et al.* 1998, (Hincha *et al.* 2002).

A análise por HPAEC/PAD dos produtos de incubação da FEH nas regiões proximal, mediana e distal do rizóforo é apresentada na figura 9 e é consistente com os resultados apresentados na figura 8. Comparando-se com as plantas controle (**Veg – T0 e Veg 21 d**), verificou-se um aumento na liberação de frutose especialmente na região proximal dos rizóforos em plantas induzidas à brotação (**Brotação Induzida**) e em todos os tratamentos de frio, dentre os quais as plantas excisadas apresentaram um pico maior de frutose do que as intactas. As plantas mantidas sob temperatura ambiente no escuro (**Intactas/TAmb e Exc/TAmb**) também apresentaram aumento da liberação de frutose, principalmente quando sofreram excisão dos ramos aéreos. De maneira geral, portanto, a maior atividade da FEH foi detectada na região proximal dos rizóforos, o que confirma os dados de Portes & Carvalho (2006) de que a mobilização de frutanos ocorre preferencialmente próximo à região de crescimento e desenvolvimento dos novos ramos aéreos durante a fase de brotação.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram os resultados descritos sobre o aumento da atividade da FEH durante a brotação natural e brotação induzida por excisão dos ramos aéreos em *V. herbacea* (Portes & Carvalho 2006, Asega 2007) e outras asteráceas como *H. tuberosus* (Marx *et al.* 1997) e *C. intybus* (Van den Ende *et al.* 2003). Porém também demonstram que o aumento da atividade da enzima pode estar relacionado a alterações nos fatores ambientais, como o frio e o escuro, pois houve aumento da atividade em plantas no estado vegetativo submetidas a essas condições (Van den Ende *et al.* 2003).

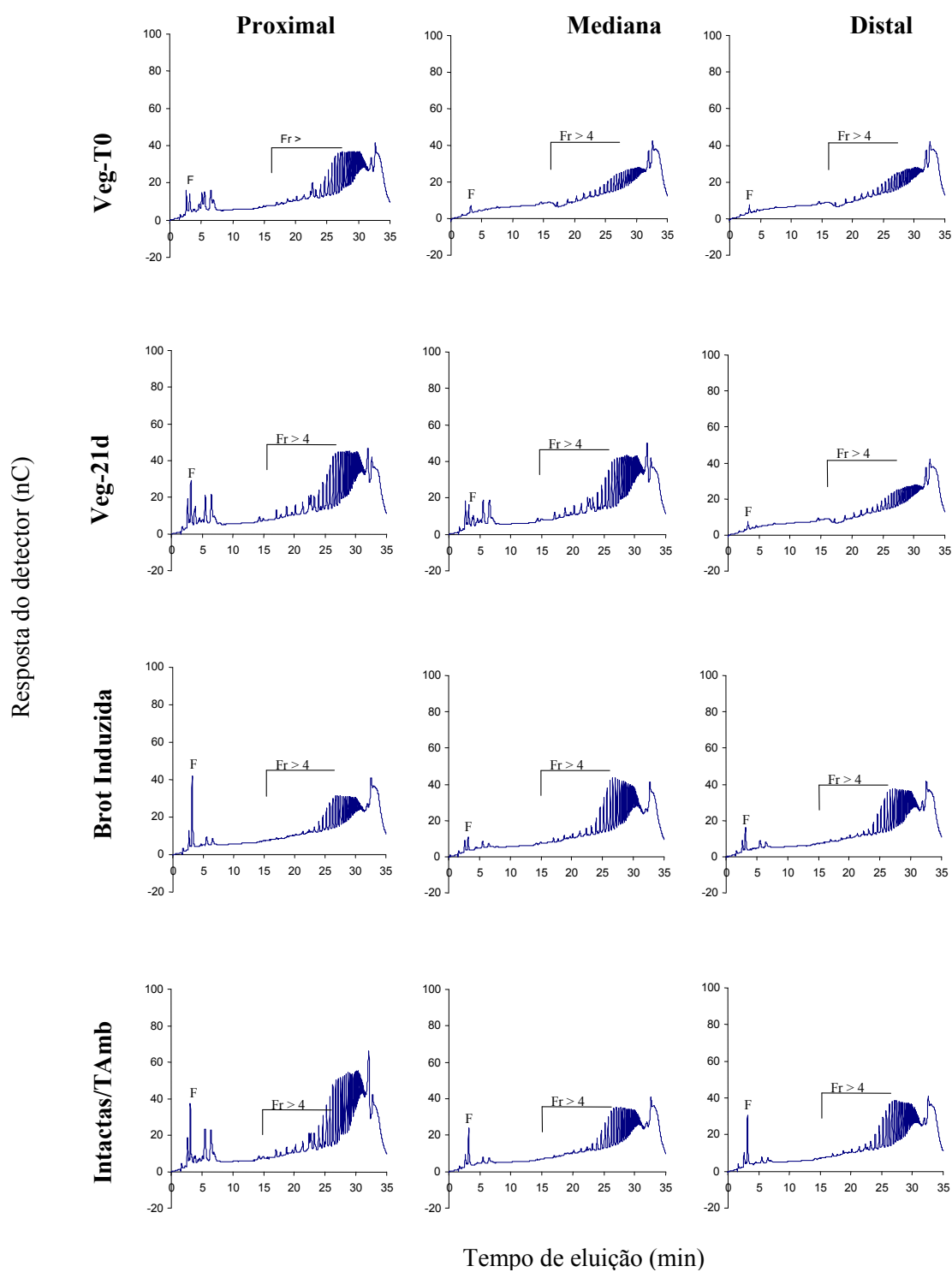


Figura 9. Atividade da FEH. HPAEC/PAD dos produtos formados após 4 h de incubação dos extratos enzimáticos das regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de *Vernonia herbacea*, com inulina (5%). F-frutose, Fr > 4 – frutanos com grau de polimerização acima de 4. Tratamentos conforme legenda da figura 8.

(Continua na próxima página)

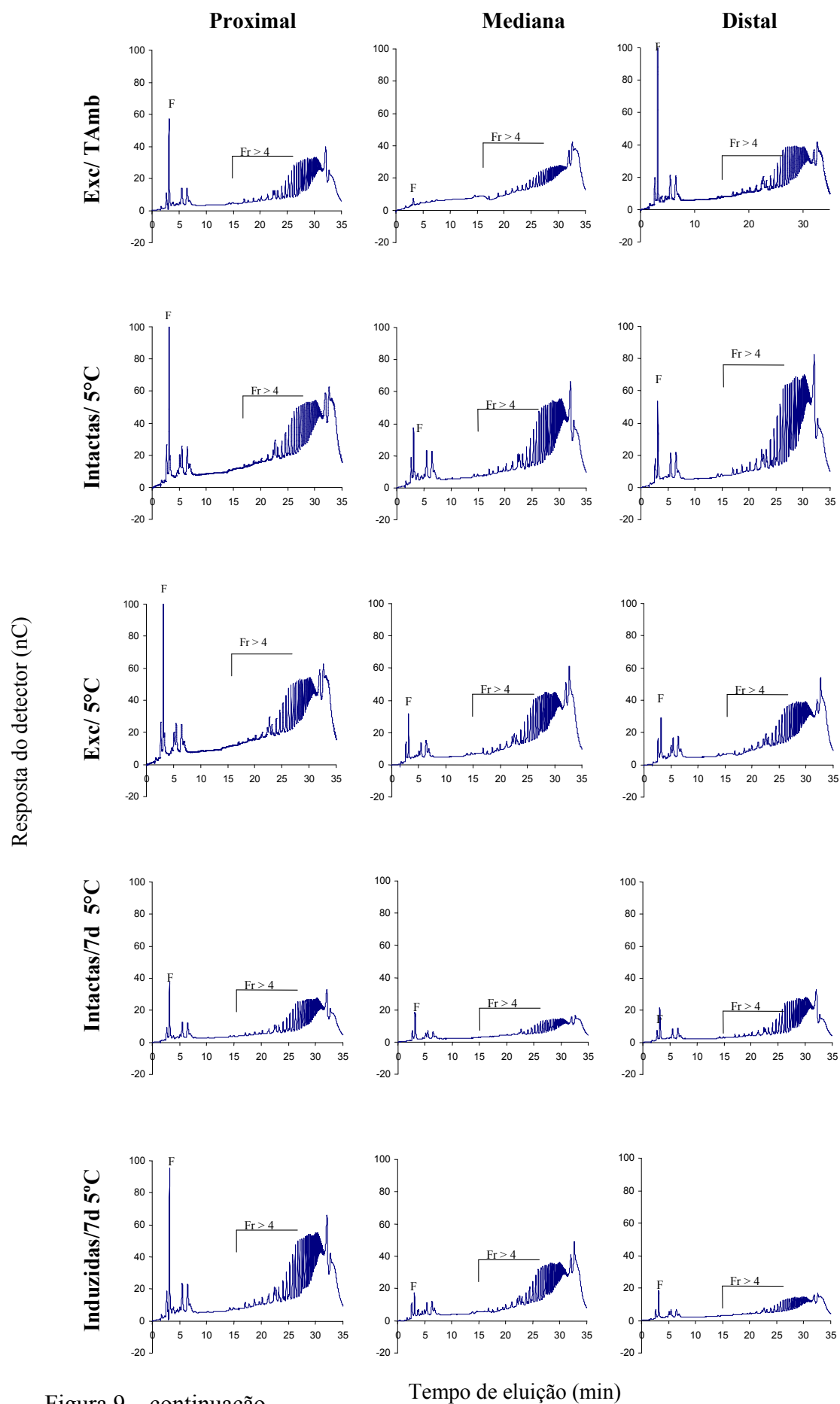


Figura 9 – continuação

A atividade da SST é apresentada na figura 10. A atividade foi mais elevada nas plantas controle em fase vegetativa (**Veg – T0 e Veg – 21 d**) do que nas demais. A atividade elevada da SST nesta fase do ciclo fenológico em que os órgãos aéreos fotossintetizantes encontram-se bem estabelecidos é esperada, pois, nestas condições, os fotoassimilados produzidos em excesso à demanda de utilização pela planta, são translocados na forma de sacarose para o órgão subterrâneo de reserva ativando a SST e, portanto, a síntese de frutanos, conforme já demonstrado extensivamente na literatura (Pollock & Cairns 1991, Van den Ende *et al.* 1999).

Ao contrário do verificado em plantas na fase vegetativa, a atividade da SST foi baixa em plantas induzidas à brotação pela remoção dos ramos aéreos (**Brotação Induzida**). Neste tratamento, a remoção dos ramos causou a interrupção da translocação de fotoassimilados para o rizóforo, limitando assim o suprimento de sacarose para a atividade da enzima.

Esses resultados corroboram os dados apresentados anteriormente para *Vernonia herbacea* (Asega e Carvalho 2004, Portes & Carvalho 2006) e confirmam a importância do fornecimento contínuo de fotoassimilados de órgãos fonte para órgãos dreno na biossíntese de frutanos, conforme discutido por essas autoras.

A diminuição da atividade da SST em plantas desfolhadas foi mostrada por vários autores para outras espécies acumuladoras de frutanos. Prud'homme *et al.* (1992) relataram uma diminuição na atividade desta enzima em raízes e estolões de *L. perenne* durante os dias posteriores à desfolhação, seguida de um aumento a partir do 15º dia, quando os tecidos foliares já haviam sido restabelecidos. Em *C. intybus*, De Roover *et al.* (1999) também detectaram um decréscimo na atividade da SST 24 horas após a desfolhação, seguida de um aumento 15 dias depois. Em plantas de yacon (*P. sonchifolia*) desfolhadas por ação de forte ventania, Fukai *et al.* (1997) verificaram um decréscimo nesta atividade.

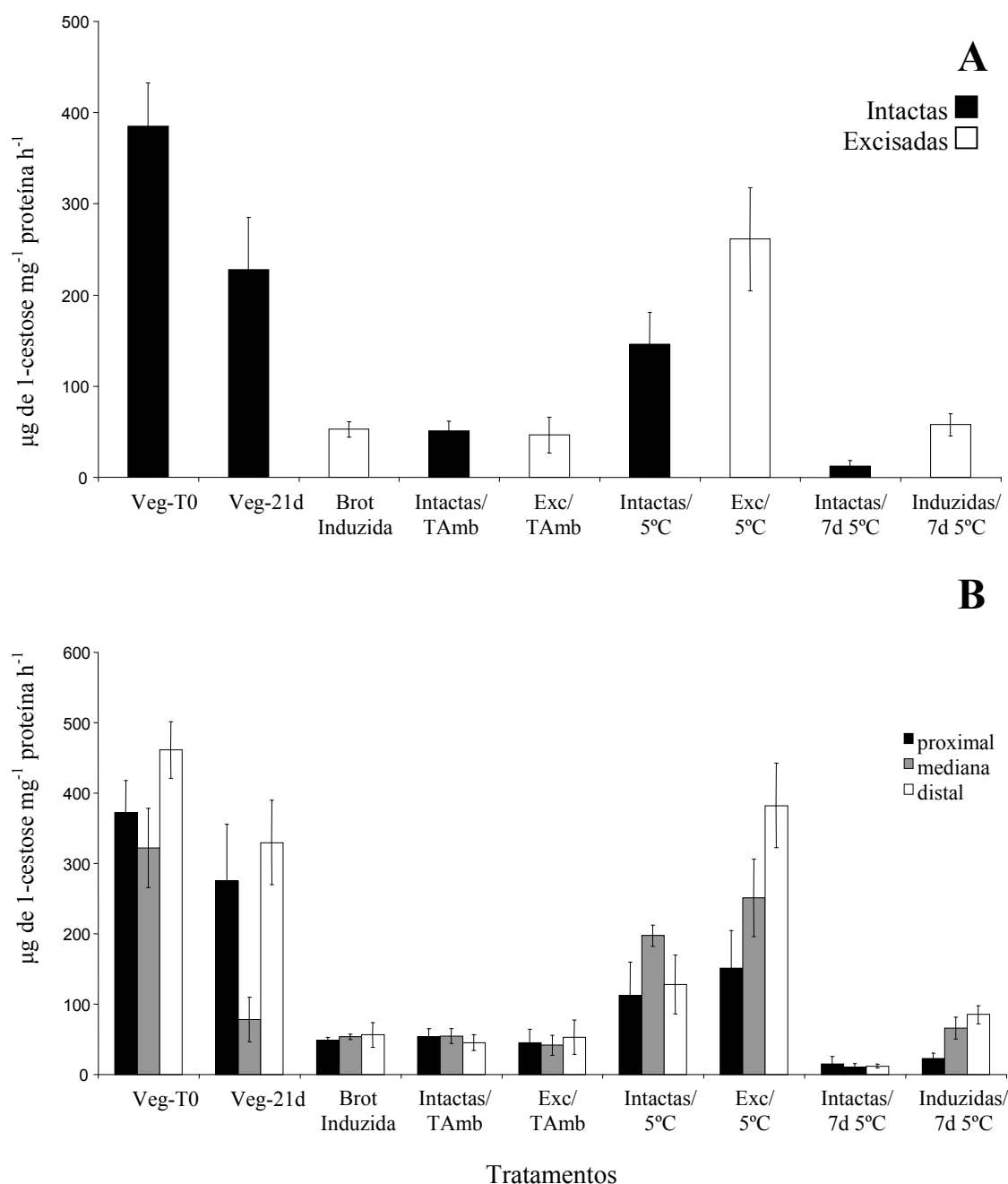


Figura 10. Atividade da SST em rizóforos de *Vernonia herbacea* determinada após 1 hora de incubação. **A)** Atividade média da SST nos rizóforos inteiros. **B)** Atividade da SST nas regiões proximal, mediana e distal. Tratamentos: Vegetativo – Tempo 0 (**Veg-T0**); Vegetativo – 21 d (**Veg-21d**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (**Brot Induzida**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente, no escuro (**Intactas/TAmb**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas em temperatura ambiente, no escuro (**Exc/TAmb**); Manutenção de plantas intactas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Intactas/5°C**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Exc/5°C**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Brotação Induzida), seguido de 7 dias a 5 °C (**Induzidas/7d 5°C**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente (vegetativo – 21 d), seguido de 7 dias a 5°C (**Intactas/7d 5°C**). As barras representam o erro padrão da média (n=3).

A diminuição da atividade da SST também foi verificada em plantas intactas ou excisadas, mantidas no escuro sob temperatura ambiente, (**Intactas/TAmb e Exc/TAmb**), uma vez que nessas plantas a atividade fotossintética e conseqüente translocação de fotoassimilados também foi interrompida pela remoção dos ramos aéreos e/ou pela manutenção das plantas no escuro.

A diminuição da atividade da SST foi menor quando as plantas mantidas no escuro foram submetidas também ao frio por 21 dias (**Intactas/5°C e Exc/5°C**). Neste caso, as plantas excisadas apresentaram atividade mais elevada do que as intactas. Apesar de ausência de fotossíntese nessas plantas a SST pode ter sido estimulada pela liberação da sacarose por ação da FEH, uma vez que a atividade desta enzima em ambos os tratamentos foi elevada (figura 8). A atividade da SST nessas plantas parece ainda ser uma resposta ao frio, conforme já foi demonstrado para outras asteráceas, como *H. tuberosus* (Koops & Jonker 1996) e gramíneas, incluindo cereais, que passam a acumular frutanos sob baixas temperaturas (Pontis & Del Campillo 1985, Jeong & Housley 1990, Kawakami & Yoshida 2002, Hisano *et al.* 2004).

O tempo de permanência das plantas no frio parece ter influenciado a atividade da SST. Plantas intactas ou excisadas, mantidas no frio por 7 dias após 21 dias em condições naturais de luz e temperatura (**Intactas/7d 5°C e Induzidas/7d 5°C**), apresentaram atividade de SST inferior à detectada nas plantas que permaneceram no frio por 21 dias consecutivos (**Intactas/5°C e Excisadas/5°C**). No entanto, quando as plantas dos tratamentos **Intactas/7d 5°C** são comparadas com as plantas controle **Veg – 21 d**, verifica-se que os 7 dias sob temperatura baixa causaram uma diminuição marcante na atividade da SST. Por outro lado, plantas induzidas à brotação e mantidas durante 7 dias em temperatura baixa (**Induzidas/7d5°C**), apresentaram um pequeno aumento na atividade da SST em relação às plantas induzidas à brotação (**Brotação Induzida**), possivelmente por uma maior disponibilidade de sacarose nestas plantas por ação da FEH.

Com relação à distribuição espacial (figura 10 B), verificou-se que, em plantas com atividade de SST mais elevada (**Veg – T0, Veg – 21 d, Intactas/5°C, Exc/5°C e Induzidas/7d5°C**), esta foi mais elevada na região distal do rizóforo, excetuando as plantas do tratamento **Intactas/5°C** que apresentaram uma distribuição diversa das demais. De maneira geral, esses resultados confirmam os resultados obtidos anteriormente (Portes & Carvalho, 2006).

Os resultados obtidos sobre a atividade da SST nos diferentes tratamentos aplicados sugerem que o frio exerce uma ação sobre o metabolismo de frutanos em *V. herbacea*, podendo estimular ou inibir a atividade da SST, dependendo do tempo de armazenamento, da fase fenológica e da condição fisiológica inicial da planta. Dias-Tagliacozzo *et al.* (1999), verificou que em *V. herbacea* as respostas ao frio parecem estar fortemente associadas à fase fenológica da planta ou às suas condições fisiológicas.

A atividade da SST encontra-se ilustrada na figura 11, que apresenta a análise por HPAED/PAD dos produtos formados por sua ação nos diferentes tratamentos e regiões do rizóforo. A atividade da SST é identificada pelo aumento do pico referente à 1-cestose, seu principal produto de ação. Nos tratamentos **Veg – T0 e Veg – 21 d, Exc/5°C** e, em uma escala menor, no tratamento **Induzidas/7d5°C**, observa-se, claramente, o aumento do pico da 1-cestose na região distal, que diminui em direção à região proximal do rizóforo. Nos demais tratamentos o pico referente à 1-cestose ou foi muito baixo (**Brot Ind, Intactas/TAmb, Exc/TAmb, Intactas/7d5°C**) ou apresentou uma distribuição espacial diversa das primeiras (**Intactas/5°C**).

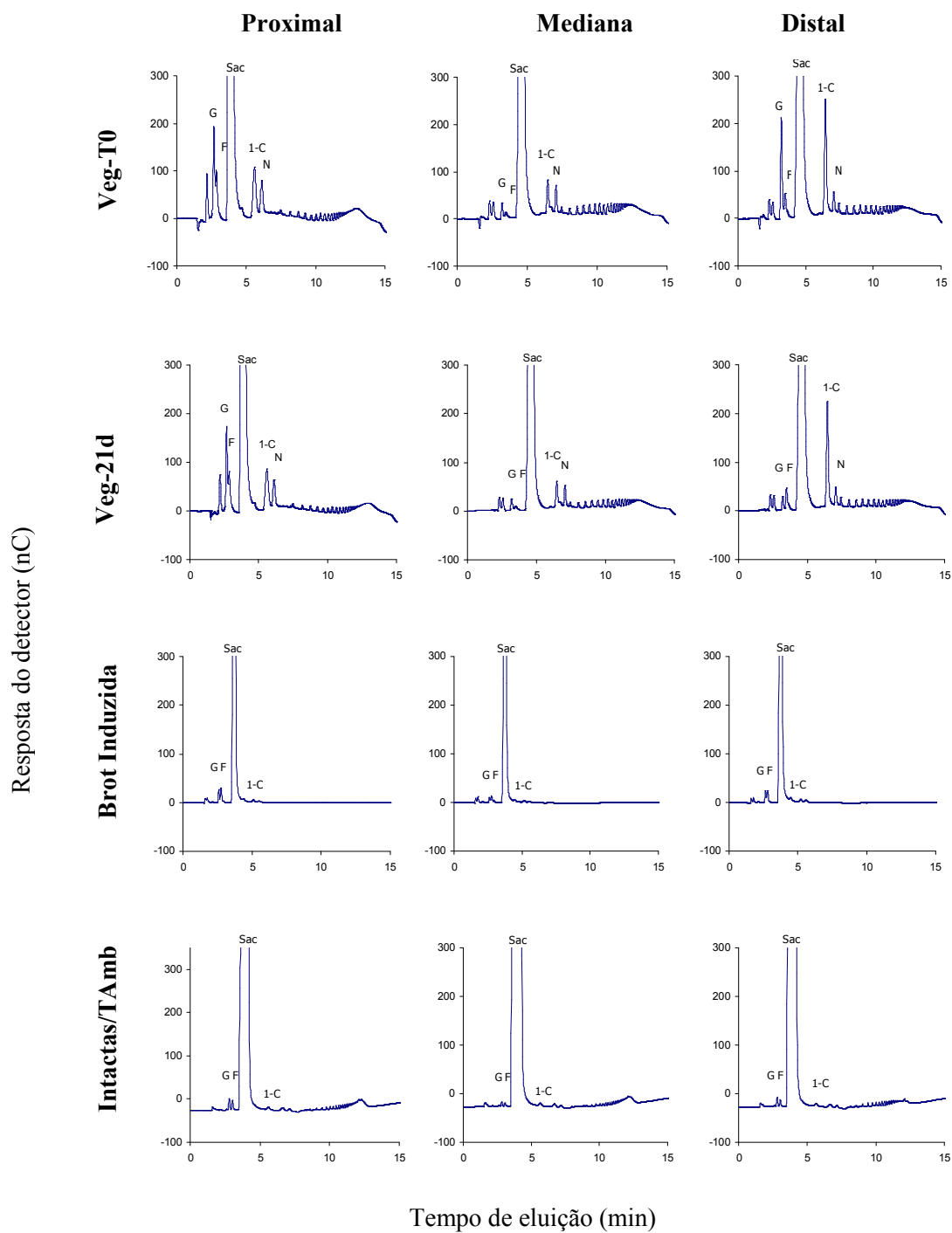


Figura 11. Atividade da SST. HPAEC/PAD dos produtos formados após 1h de incubação dos extratos enzimáticos das regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de *Vernonia herbacea*, com sacarose 0,2 M. G-glucose, F-frutose, Sac-Sacarose, 1-C-1-cestose, N-nistose. Tratamentos conforme legenda da figura 10.

(Continua na próxima página)

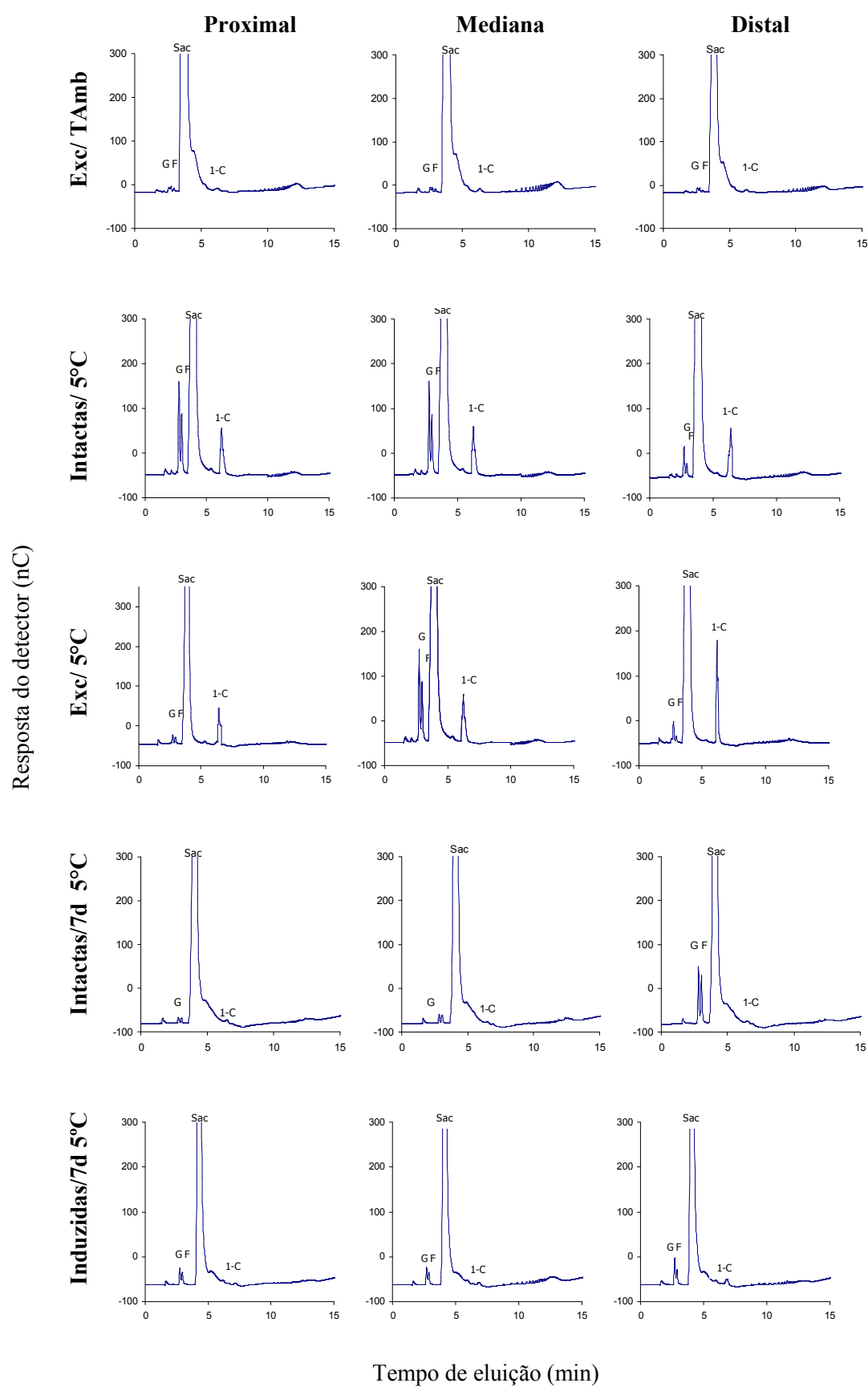


Figura 11- continuação.

A atividade da FFT, enzima que promove a transferência de resíduos de frutose entre cadeias de frutanos de diferentes tamanhos, é apresentada na figura 12. A FFT apresentou, em geral, atividade superior à da SST em todos os tratamentos aplicados. Entre as plantas controle (**Veg – T0 e Veg 21 d**) e as plantas induzidas à brotação (**Brotação Induzida**) não houve diferença quando se analisa a atividade no rizóforo inteiro (figura 12 A). Entretanto, nestas a atividade foi semelhante nas 3 regiões do rizóforo, enquanto nas primeiras a atividade variou entre as diferentes regiões.

Plantas intactas e excisadas, mantidas no escuro sob temperatura ambiente (**Intactas/TAmb e Exc/TAmb**) apresentaram atividade mais elevada do que os seus controles (**Veg – T0 e Veg 21 d, e Brotação Induzida**, respectivamente). Nas plantas excisadas, no entanto, a atividade foi mais elevada do que nas intactas, sem haver diferenças no padrão de distribuição da atividade da FFT ao longo do comprimento dos rizóforos, entre os dois tratamentos (figura 12 B).

Diferentemente da SST, a atividade da FFT não é diretamente dependente do suprimento da sacarose, uma vez que a sacarose pode ser uma das moléculas receptoras de unidades de frutose por ação da FFT, porém nunca uma molécula doadora (Pollock *et al.* 1996). Paralelamente à sua atuação no alongamento das cadeias durante a biossíntese de frutanos, a FFT promove a diminuição dessas cadeias em outras condições fisiológicas. Por exemplo, durante a brotação, ela atua juntamente com a FEH, redistribuindo unidades de frutose no sentido da redução do comprimento das cadeias, facilitando a atuação da hidrolase que, em muitas Asteraceae, apresenta maior afinidade por frutanos de cadeias curtas do que de cadeias longas (Van den Ende *et al.* 2002). Por não ser diretamente dependente do suprimento de fotoassimilados, a atividade desta enzima não foi inibida em plantas mantidas no escuro, como ocorreu com a SST.

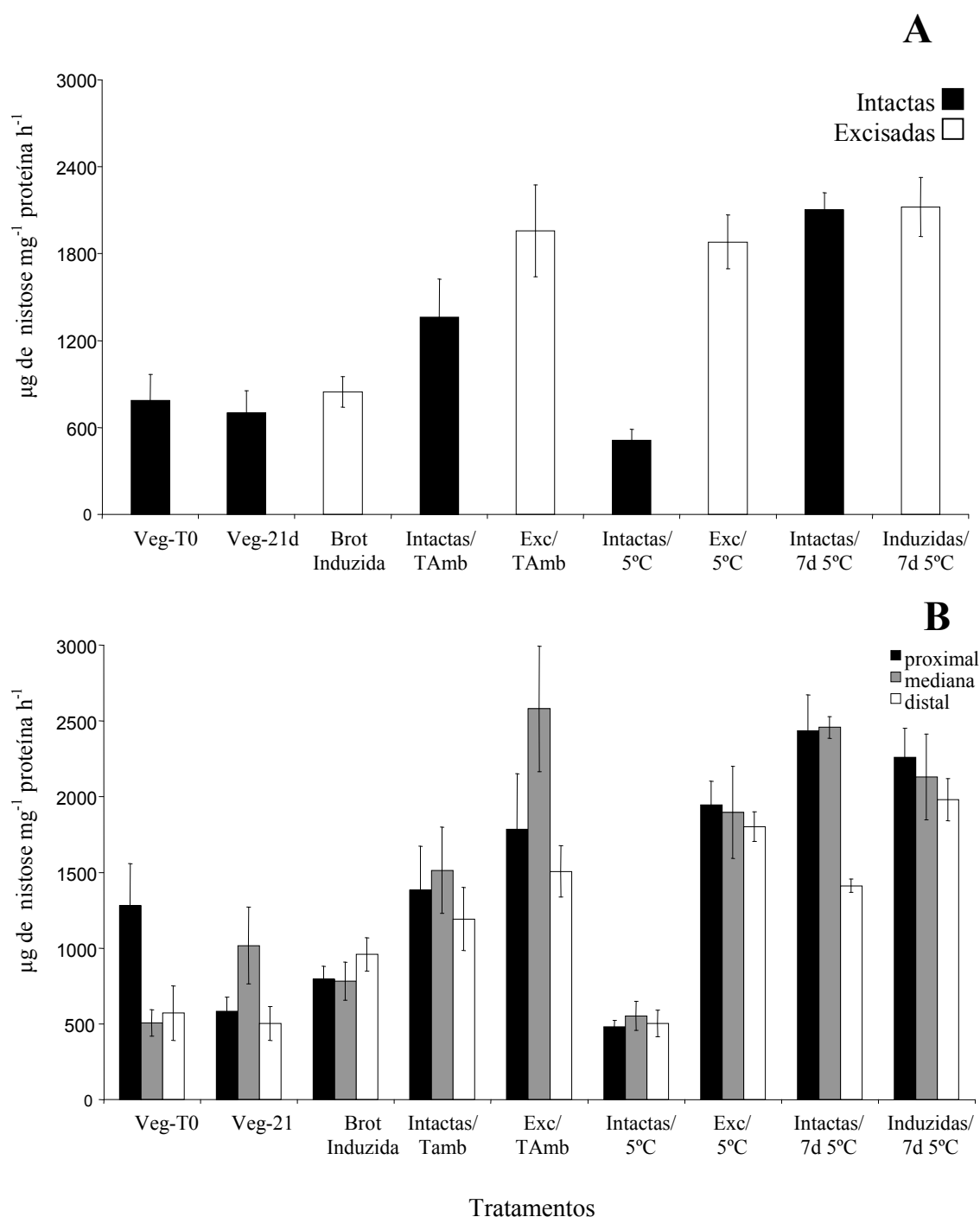


Figura 12. Atividade da FFT em rizóforos de *Vernonia herbacea* determinada após 2 horas de incubação. **A)** Atividade média da FFT nos rizóforos inteiros. **B)** Atividade da FFT nas regiões proximal, mediana e distal. Tratamentos: Vegetativo – Tempo 0 (**Veg-T0**); Vegetativo – 21 d (**Veg-21d**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (**Brot Induzida**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente, no escuro (**Intactas/TAmb**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas em temperatura ambiente, no escuro (**Exc/TAmb**); Manutenção de plantas intactas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Intactas/5°C**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Exc/5°C**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Brotação Induzida), seguido de 7 dias a 5 °C (**Induzidas/7d 5°C**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente (vegetativo – 21 d), seguido de 7 dias a 5°C (**Intactas/7d 5°C**). As barras representam o erro padrão da média (n=3).

Houve variação na atividade da FFT entre plantas intactas e excisadas também quando estas foram submetidas ao frio (**Intactas/5°C e Exc/5°C**), sendo que neste caso, o aumento em relação às plantas intactas foi maior do que nas plantas mantidas no escuro sob temperatura ambiente. Esta resposta parece estar associada, pelo menos em parte, à maior atividade da FEH observada em plantas excisadas (figura 8), embora quando analisadas as atividades nas diferentes regiões esta associação não parece tão evidente, uma vez que a atividade mais elevada da FEH neste tratamento não ocorre na mesma região em que ocorre a atividade mais elevada da FFT (figura 12).

Portes & Carvalho (2008) também verificaram em *V. herbacea* um aumento da atividade da FFT em plantas excisadas mantidas a 5°C, em relação às plantas intactas.

A resposta da FFT ao tempo de exposição ao frio foi diferente da observada com relação à atividade da SST. Enquanto a atividade da SST foi menor em plantas mantidas no frio por 7 dias após 21 dias sob temperatura ambiente do que naquelas mantidas no frio por 21 dias (figura 10), a FFT foi mais elevada nas plantas que permaneceram apenas 7 dias no frio (figura 12). O aumento na atividade da FFT nas plantas dos tratamentos **Intactas/7d5°C** e **Excisadas/7d5°C** foi bastante marcante quando comparada com as plantas controle (**Veg – T0 e Veg 21d**) e plantas induzidas à brotação (**Brotação Induzida**), demonstrando que o frio também exerceu um papel importante na atividade desta enzima.

A pequena variação na atividade da FFT ao longo do eixo de crescimento do rizóforo demonstra que esta enzima é ativa praticamente em todo o órgão e sugere mais uma vez que a sua atuação se dá tanto em regiões do órgão de reserva e em fases em que a biossíntese de frutanos é mais acentuada, como em regiões e fases em que a mobilização destes compostos pela FEH predomina.

A ocorrência freqüente da atividade da FFT em plantas sob diversas condições fisiológicas já foi demonstrada para *V. herbacea* (Asega & Carvalho 2004, Portes & Carvalho 2006, Portes *et al.* 2008) e para outras espécies de Asteraceae. Analisando a variação sazonal dos frutanos de raízes de *T. officinale*, Rutherford & Deacon (1974) verificaram que a atividade da FFT foi sempre superior à da SST, e que não houve variação significativa na atividade da FFT durante o ciclo anual de desenvolvimento das plantas. Mais recentemente, demonstrou-se que a expressão gênica desta enzima foi pouco alterada durante o ciclo de desenvolvimento em plantas de *T. officinale* plantas (Van den Ende *et al.* 2000b). Entretanto, pouco se sabe sobre a influência do frio na atividade desta enzima.

A figura 13 ilustra a atividade da FFT nos diferentes tratamentos e regiões do rizóforo por análise em HPAEC/PAD, demonstrada por aumentos na área do pico referente à nistose.

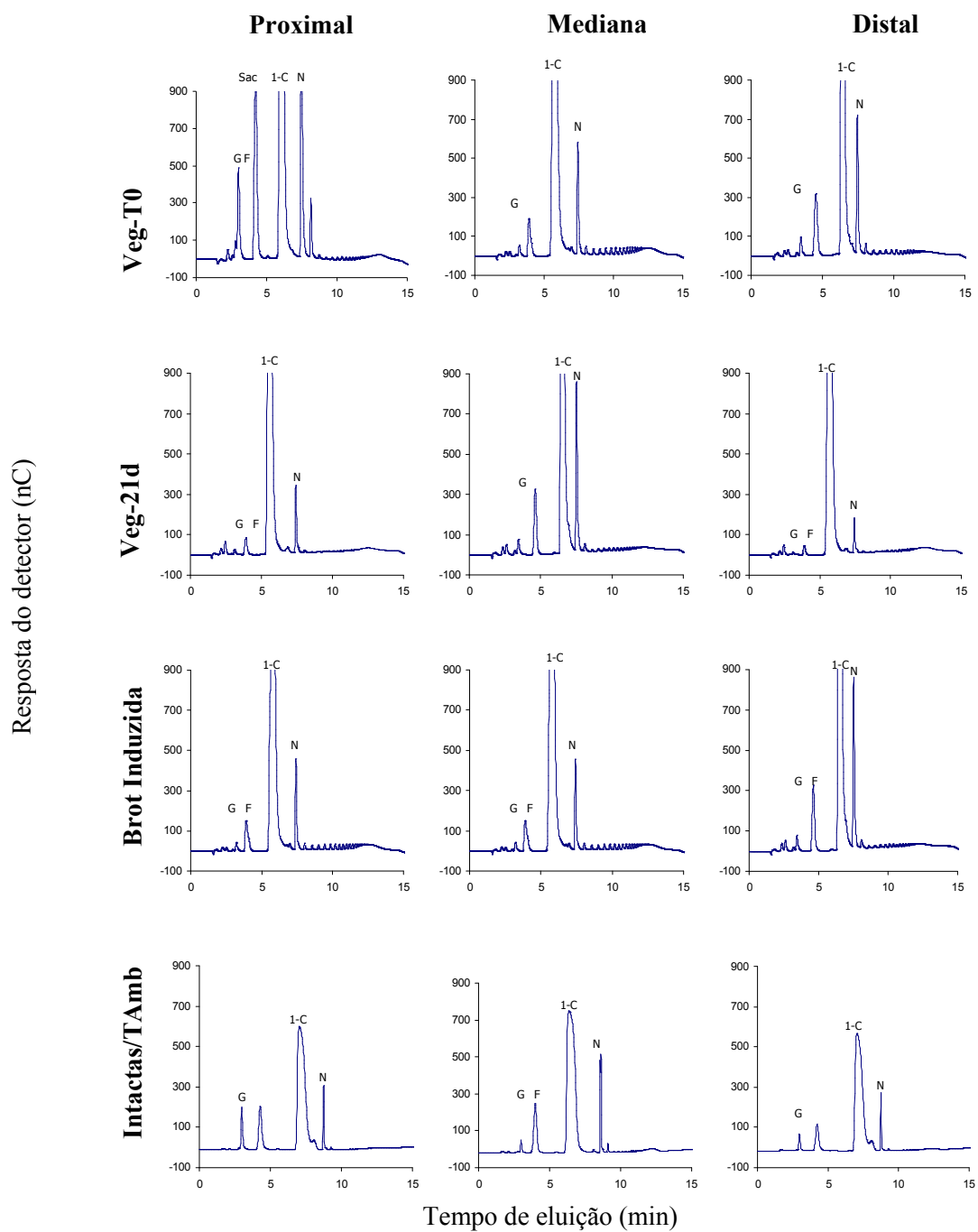


Figura 13. Atividade da FFT. HPAEC/PAD dos produtos formados após 2 h de incubação dos extratos enzimáticos das regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de *Vernonia herbacea* com 1-cestose 0,2 M. G-glucose, F-frutose, Sac-Sacarose, 1-C-1-cestose, N-nistose. Tratamentos conforme legenda da figura 12.

(Continua na próxima página)

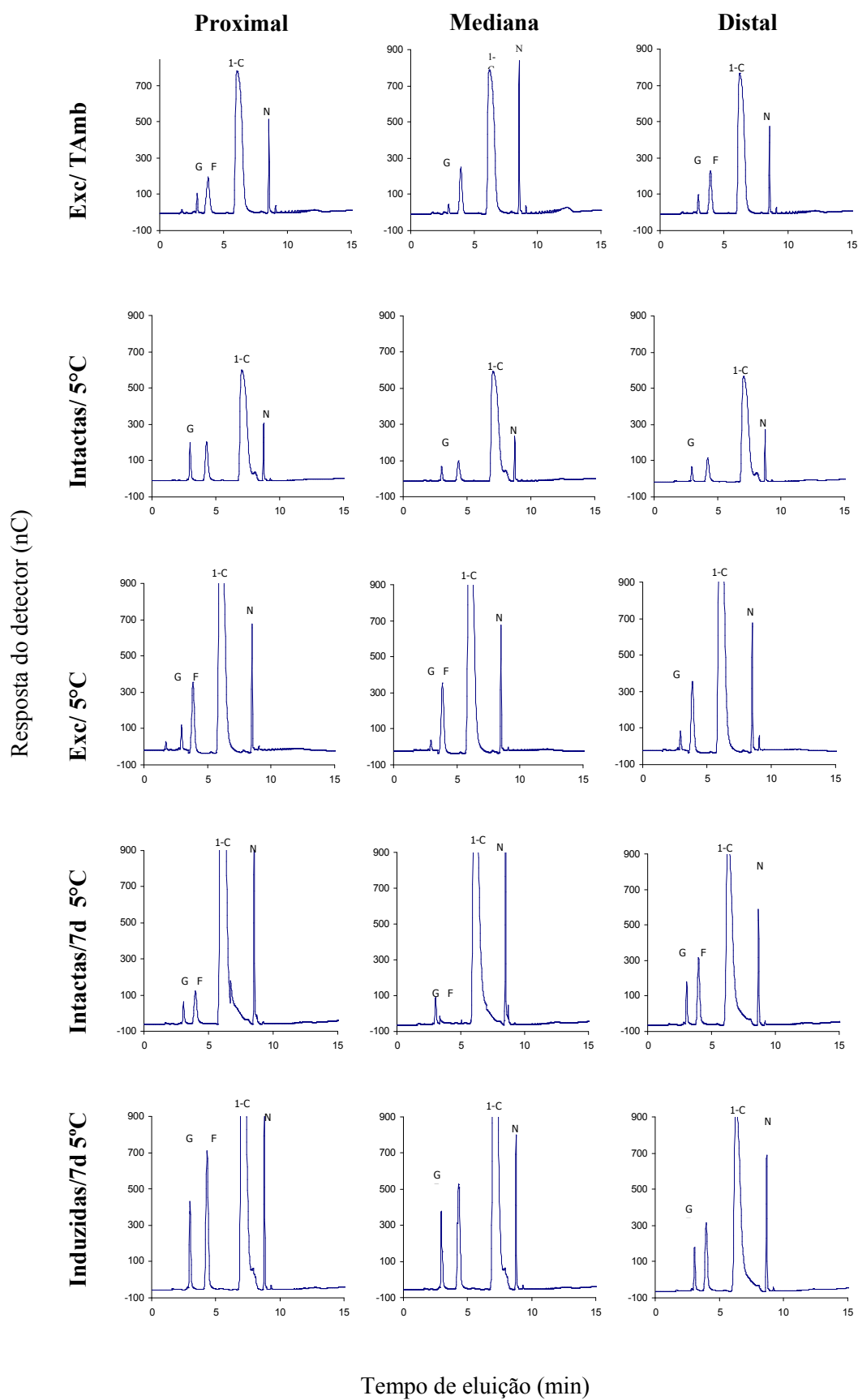


Figura 13 – continuação.

A atividade da invertase é apresentada na figura 14. Dentre as enzimas analisadas no presente trabalho, a invertase foi a que apresentou atividade inferior. Observou-se um aumento da atividade em plantas induzidas à brotação (**Brotação Induzida**) em relação ao detectado nas plantas controle (**Veg – T0 e Veg – 21 d**). Nos demais tratamentos, verificou-se uma tendência a uma atividade mais elevada da invertase em plantas excisadas do que nas intactas.

O frio parece ter estimulado a atividade da invertase, principalmente em plantas armazenadas por 21 dias a 5°C. Nestas, a atividade foi bastante uniforme nas 3 regiões do rizóforo. Por outro lado, nas plantas que permaneceram apenas 7 dias no frio, a região mediana apresentou atividade claramente inferior à detectada nas regiões proximal e distal.

Com relação à distribuição espacial da atividade da invertase nas plantas controle, nas plantas induzidas à brotação, e naquelas que permaneceram no escuro sob temperatura ambiente, verificou-se que, semelhantemente às plantas mantidas no frio por 21 dias consecutivos, a atividade apresentou apenas pequenas variações ao longo do comprimento do rizóforo (figura 14 B).

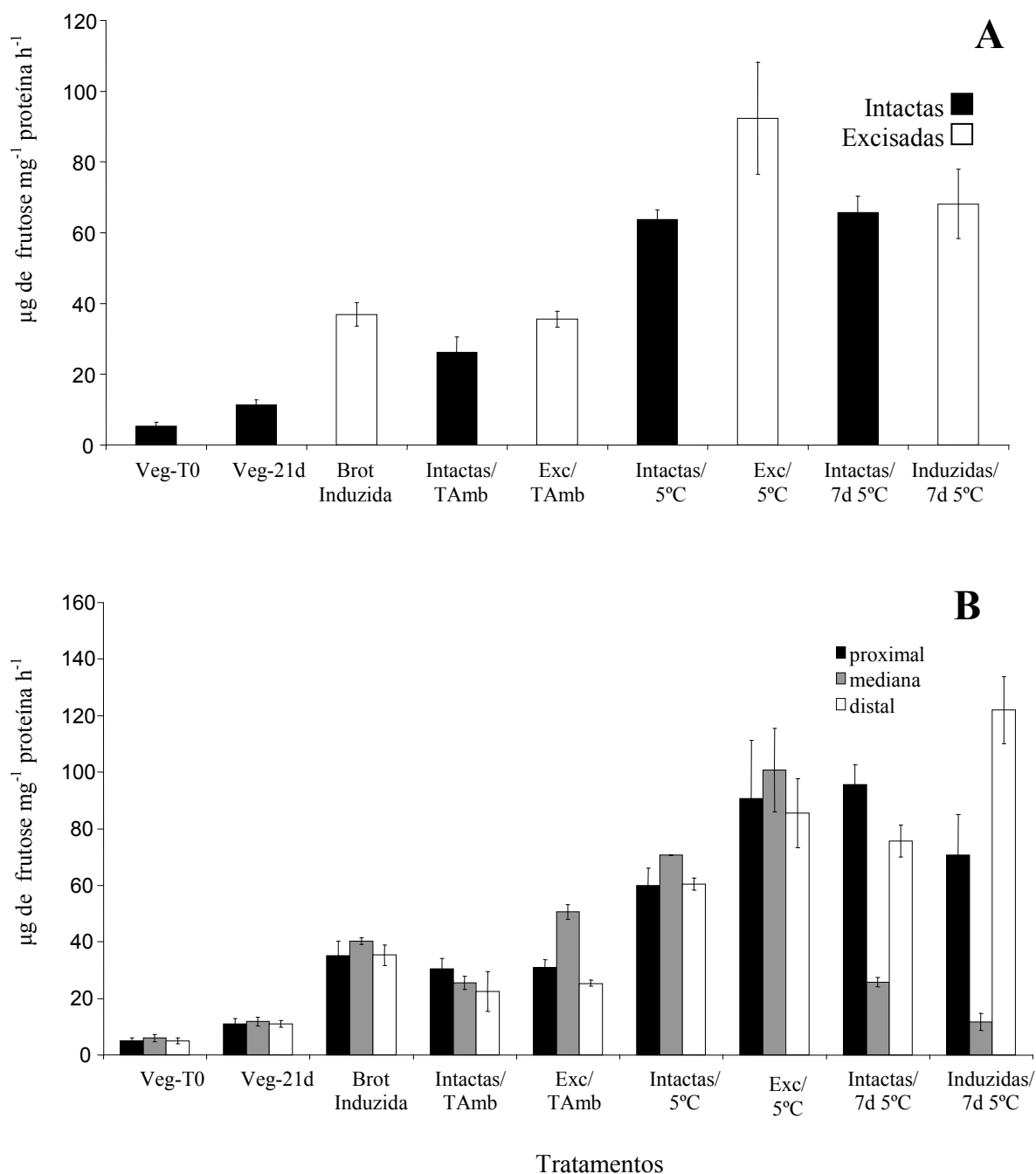


Figura 14. Atividade de Invertase em rizóforos de *Vernonia herbacea* determinada após 4 horas de incubação. **A)** Atividade média da Invertase nos rizóforos inteiros. **B)** Atividade da Invertase nas regiões proximal, mediana e distal. Tratamentos: Vegetativo – Tempo 0 (**Veg-T0**); Vegetativo – 21 d (**Veg-21d**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (**Brot Induzida**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente, no escuro (**Intactas/TAmb**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas em temperatura ambiente, no escuro (**Exc/TAmb**); Manutenção de plantas intactas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Intactas/5°C**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Exc/5°C**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Brotação Induzida), seguido de 7 dias a 5°C (**Induzidas/7d 5°C**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente (vegetativo – 21 d), seguido de 7 dias a 5°C (**Intactas/7d 5°C**). As barras representam o erro padrão da média (n=3).

Analisando o metabolismo de frutanos em plantas de *V. herbacea* induzidas à brotação, Asega e Carvalho (2004) verificaram que o aumento da atividade da invertase ocorreu antes do aumento da atividade da FEH, e discutiram que este fato possivelmente estaria relacionado ao efeito inibidor da sacarose sobre a FEH, já demonstrado para algumas Asteraceae como *H. tuberosus* (Marx *et al.* 1997a), *C. intybus* (Claessens *et al.* 1990), e Poaceae como *Lolium temulentum* (Simpson *et al.* 1991), *L. perenne* (Marx *et al.* 1997b, Lothier *et al.* 2007). Com o decréscimo da concentração vacuolar de sacarose por ação da invertase, a FEH estaria apta a promover a mobilização de frutanos para o crescimento dos ramos aéreos durante a rebrota. No presente trabalho, porém as análises foram realizadas pontualmente aos 21 dias após o início do período experimental e não ao longo de um período maior como no estudo de Asega e Carvalho (2004). Já resultados obtidos por Portes *et al.* (2008) também aos 21 dias, demonstraram que ambas, a invertase e a FEH, apresentaram aumentos de atividade em plantas induzidas à brotação, embora o acompanhamento dessas atividades ao longo do período experimental também não tenha sido realizado no estudo.

Na figura 15 são apresentados os perfis cromatográficos da análise por HPAEC/PAD, dos produtos de incubação obtidos para as 3 regiões do rizóforo. Conforme mencionado acima, a invertase apresentou atividade muito baixa, o que pode ser verificado pelo pico referente à frutose. A detecção da 1-cestose em alguns cromatogramas indica a atuação da SST.

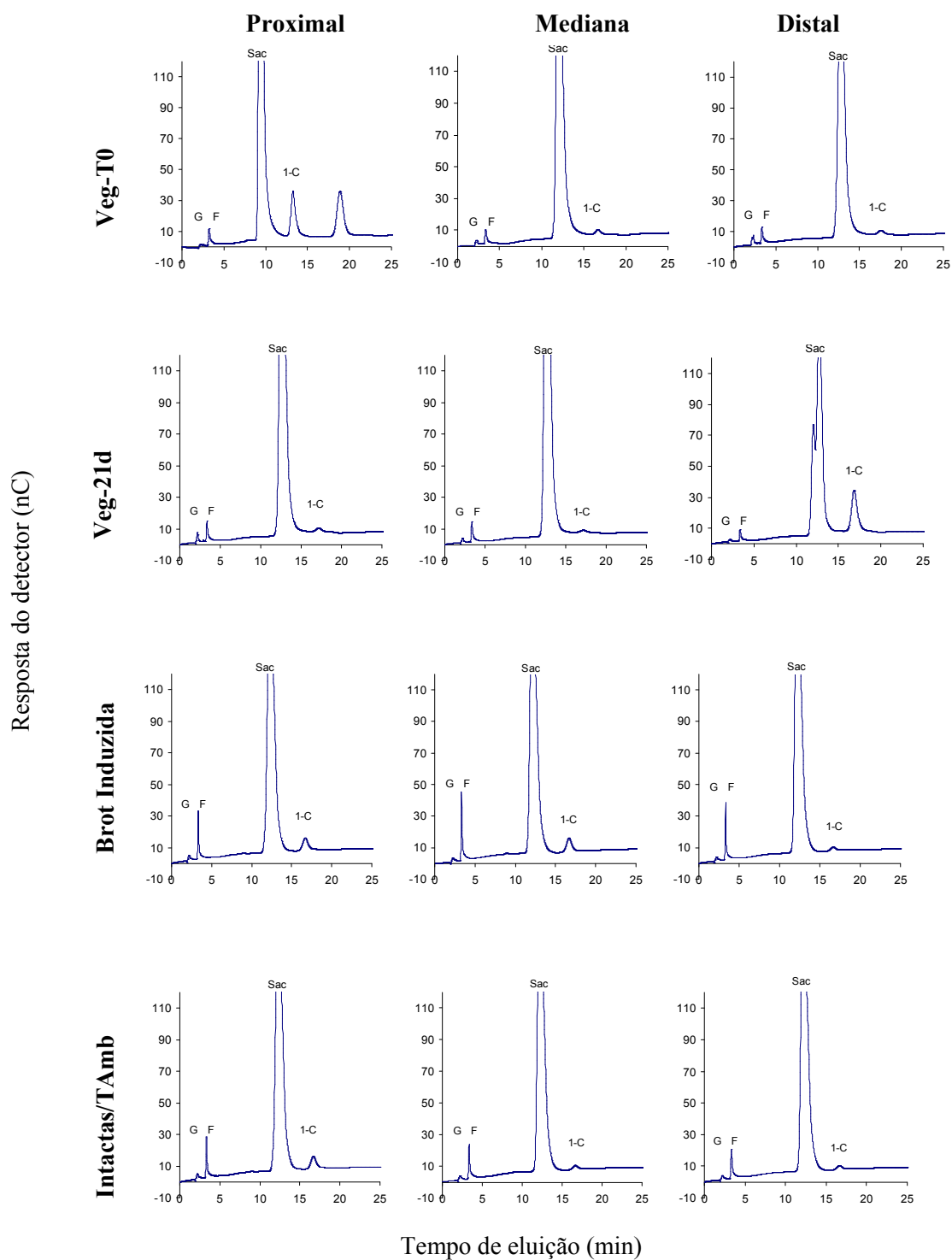


Figura 15. Atividade da Invertase. HPAEC/PAD dos produtos formados após 4h de incubação dos extratos enzimáticos das regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de *Vernonia herbacea* com sacarose 0,05 M. G-glucose, F-frutose, Sac-Sacarose, 1-C-1-cestose. Tratamentos conforme legenda da figura 14.

(Continua na próxima página)

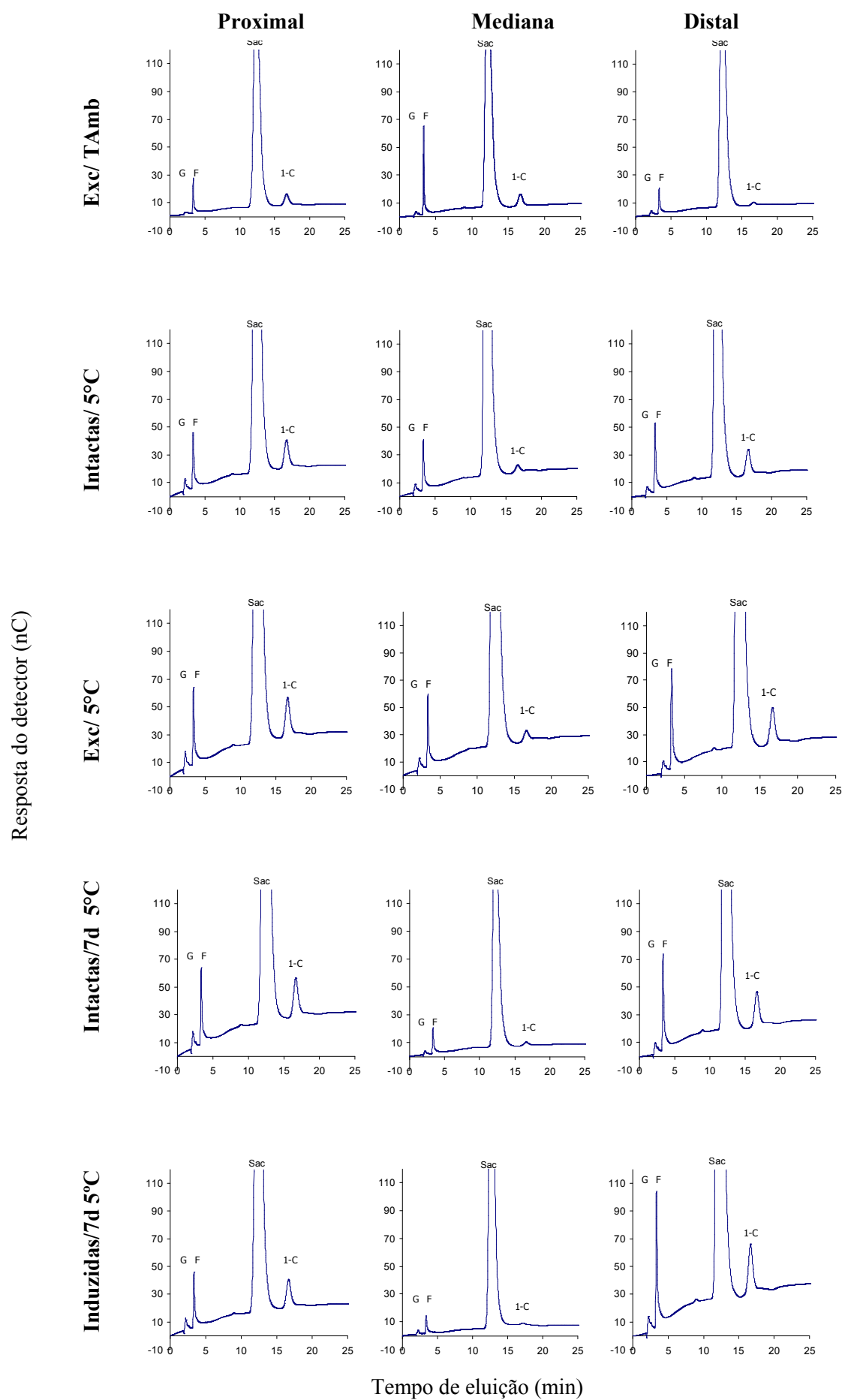


Figura 15 – continuação.

Os conteúdos de fruto-oligossacarídeos, fruto-polissacarídeos e frutanos totais estão apresentados na figura 16. Tanto nas plantas controle como nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos, a concentração de fruto-polissacarídeos (figura 16B) foi mais elevada do que a de fruto-oligossacarídeos (figura 16A), o que é uma situação comumente encontrada em *V. herbacea* (Carvalho & Dietrich 1993, Carvalho *et al.* 1997, Dias-Tagliacozzo *et al.* 1999). Exceto pelas plantas induzidas à brotação, todas as plantas submetidas à excisão dos ramos aéreos apresentaram teores de fruto-polissacarídeos superiores aos de plantas intactas dentro de cada tratamento (figura 16B), um dado também observado para os teores de frutanos totais (figura 16C), mas não para os fruto-oligossacarídeos (figura 16A).

A distribuição dos fruto-oligossacarídeos nas diferentes regiões do rizóforo, aponta para um aumento da concentração destes compostos no sentido proximal-distal do órgão de reserva tanto nas plantas controle como nas demais (figura 17A). Esta distribuição pode estar relacionada à idade dos tecidos, pois na região distal (ápice) os tecidos mais jovens apresentam uma taxa de biossíntese, em geral, mais elevada do que as demais regiões do rizóforo. Ao contrário, a concentração de fruto-polissacarídeos foi, em geral, maior nas regiões proximal e mediana do que na região distal do rizóforo (figura 17B), exceção feita às plantas induzidas à brotação (**Brotação Induzida**) e às induzidas à brotação e mantidas no frio por 7 dias (**Induzidas/5°C**). Perfil semelhante do conteúdo de frutanos nas 3 regiões do rizóforo foi observado nos frutanos totais (figura 17 C).

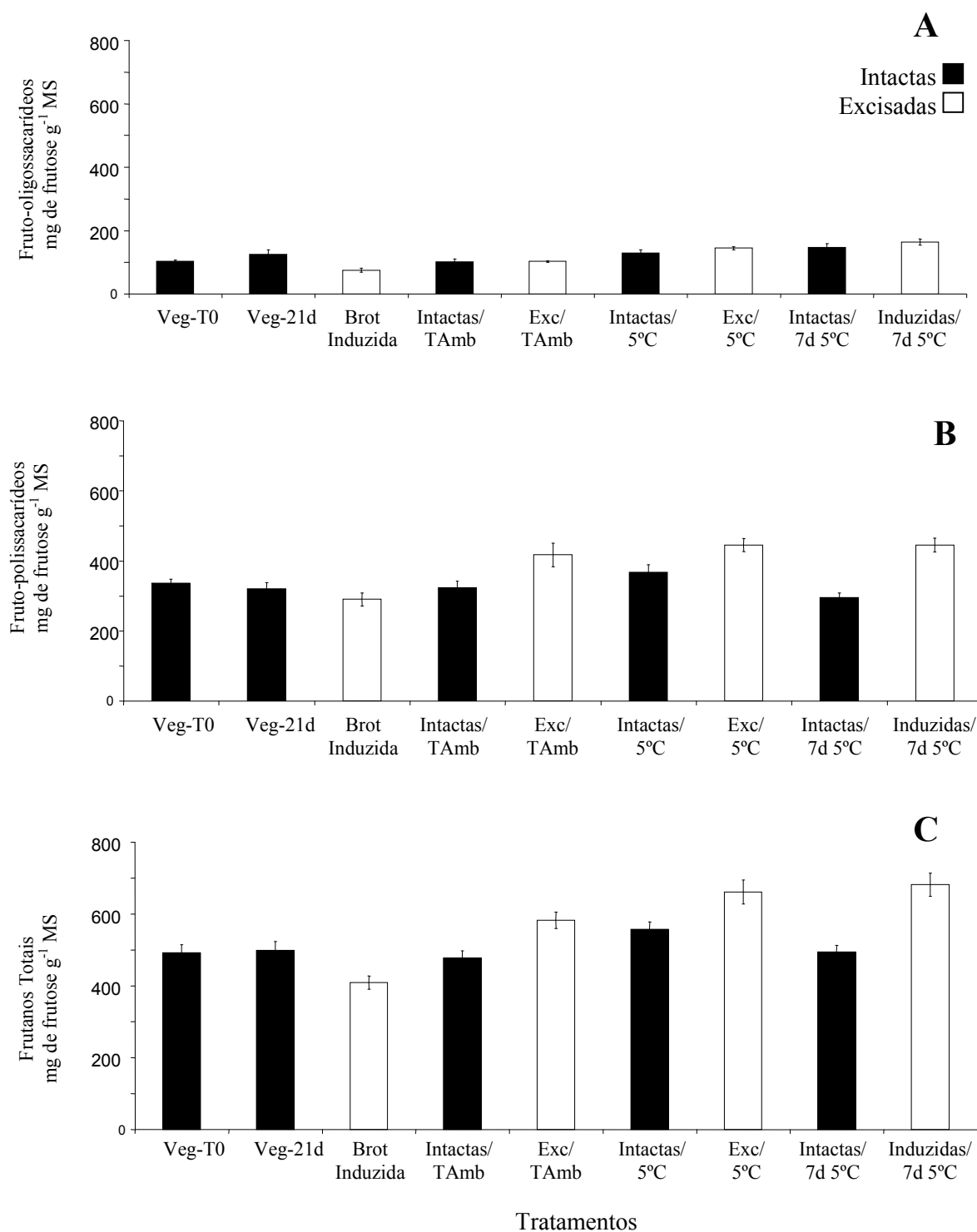


Figura 16. Conteúdo de fruto-oligosacarídeos (A), fruto-polissacarídeos (B) e frutanos totais (C) nos rizôforos de *Vernonia herbacea*. Tratamentos: Vegetativo – Tempo 0 (**Veg-T0**); Vegetativo – 21 d (**Veg-21d**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (**Brot Induzida**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente, no escuro (**Intactas/TAmb**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas em temperatura ambiente, no escuro (**Exc/TAmb**); Manutenção de plantas intactas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Intactas/5°C**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Exc/5°C**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Brotação Induzida), seguido de 7 dias a 5 °C (**Induzidas/7d 5°C**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente (vegetativo – 21 d), seguido de 7 dias a 5°C (**Intactas/7d 5°C**). As barras representam o erro padrão da média (n=3).

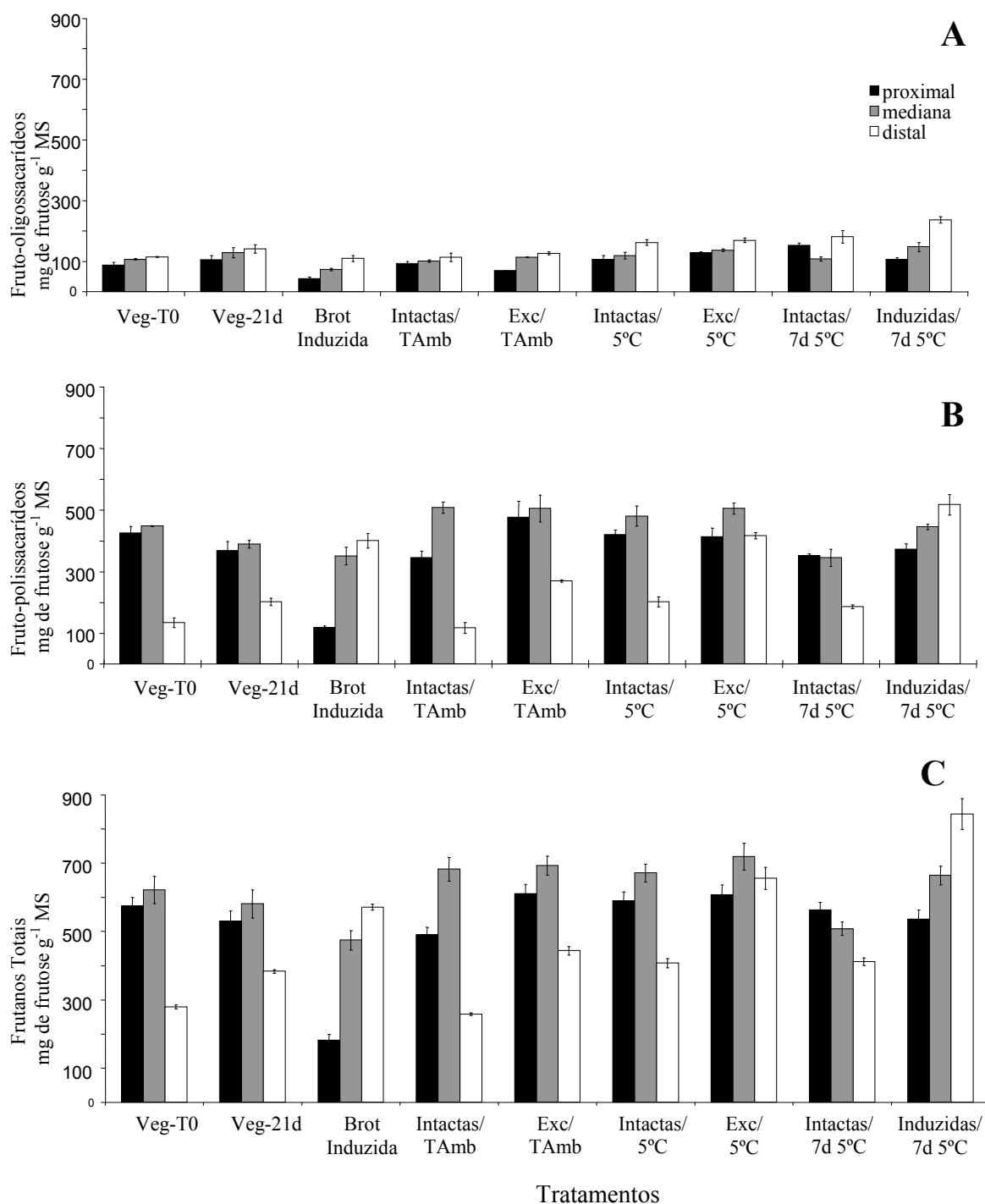


Figura 17. Conteúdo de oligo-frutossacarídeos (A), fruto-polissacarídeos (B) e frutanos totais (C) nas regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos de *Vernonia herbacea*. Tratamentos: Vegetativo – Tempo 0 (**Veg-T0**); Vegetativo – 21 d (**Veg-21d**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (**Brot Induzida**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente, no escuro (**Intactas/TAmb**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas em temperatura ambiente, no escuro (**Exc/TAmb**); Manutenção de plantas intactas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Intactas/5°C**); Excisão dos ramos aéreos e manutenção das plantas a 5°C, no escuro por 21 dias (**Exc/5°C**); Indução à brotação pela excisão dos ramos aéreos (Brotação Induzida), seguido de 7 dias a 5 °C (**Induzidas/7d 5°C**); Manutenção de plantas intactas em temperatura ambiente (vegetativo – 21 d), seguido de 7 dias a 5°C (**Intactas/7d 5°C**). As barras representam o erro padrão da média (n=3).

Considerando o conteúdo de fruto-oligossacarídeos no rizóforo inteiro (figura 16A), as plantas induzidas à brotação (**Brotação Induzida**) apresentaram conteúdo **27%** inferior ao das plantas controle (**Veg-T0**), sendo que a região proximal apresentou queda mais acentuada, de **58%**, do que as outras regiões do rizóforo (figura 17 A). Esta diminuição detectada nas plantas induzidas à brotação parece estar relacionada à rebrota e crescimento dos novos ramos aéreos e à mobilização de reservas dos rizóforos para o restabelecimento dessas plantas, uma vez que 100% das plantas submetidas à remoção dos ramos aéreos (**Brotação Induzida**) rebrotaram. O fornecimento de compostos para suprir a demanda energética deste processo fisiológico é principalmente decorrente da atividade da FEH nesta fase, como já demonstrado por Fukai *et al.* (1997), Marx *et al.* (1997), Degasperi *et al.* (2003) e outros, para outras Asteraceae, e por Asega & Carvalho (2004), Asega (2007), Portes & Carvalho (2006) Portes *et al.* (2008), para *V. herbacea*.

Baseando-se nos resultados de atividade da FEH nos diferentes tratamentos aplicados às plantas neste experimento, nos resultados obtidos por Asega & Carvalho (2004), Asega (2007), Portes & Carvalho (2006) e Portes *et al.* (2008) também com plantas de *V. herbacea*, e naqueles obtidos por Van den Ende *et al.* (2001) que indicaram que as duas isoformas de FEH, FEH-I e FEH-II, de *C. intybus* são induzidas por condições diferentes, observa-se que nas plantas excisadas e nas excisadas e submetidas ao frio ou nas intactas submetidas ao frio, pode ter ocorrido a indução de isoformas diferentes de FEH em *V. herbacea*, como adaptação às condições fisiológicas e ambientais impostas: excisão de ramos aéreos e frio.

As plantas excisadas que permaneceram no escuro (**Exc/TAmb**) apresentaram 30% de brotação. Relacionando-se o conteúdo de fruto-oligossacarídeos com o percentual de rebrota destas plantas, verifica-se que houve uma diminuição do conteúdo destes compostos inferior à observada no tratamento de brotação induzida, em cujas plantas a

demanda de compostos para a rebrota e crescimento dos ramos aéreos foi bem mais elevada do que nas **Exc/TAmb**.

A figura 18 mostra o perfil cromatográfico obtido por HPAEC/PAD dos fruto-oligossacarídeos nas regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos. Foram verificadas algumas diferenças na proporção dos componentes das amostras. De uma maneira geral, esta análise qualitativa demonstra a presença de frutanos com grau de polimerização (GP) de 3 a aproximadamente 28 nesta fração.

Nas plantas induzidas à brotação houve maior proporção de frutose e sacarose em relação aos oligossacarídeos, principalmente na região proximal do rizóforo, correspondendo à atividade mais elevada de FEH obtida *in vitro* também nesta região. Em geral, o perfil cromatográfico dos fruto-oligossacarídeos reflete algumas alterações causadas pelos tratamentos aplicados. Entretanto, os resultados apresentados nos cromatogramas correspondem ao perfil dos oligossacarídeos *in vivo*, que nem sempre coincidem totalmente com os dados de atividade enzimática obtidos *in vitro*.

Mais do que o frio, mas não excluindo a sua influência, a excisão dos ramos aéreos parece ter sido um fator estimulador do acúmulo de frutanos no rizóforo, quando se considera o órgão inteiro (figura 16). Entretanto, observando-se a atividade da FEH e da SST, verifica-se que ambas apresentam atividade também mais elevada nas plantas submetidas à excisão, quando comparadas às intactas de tratamento semelhante (figuras 8A e 10A). Este resultado poderia parecer incoerente e sugerir a existência de um ciclo fútil de síntese e mobilização no órgão, dadas suas atividades de mobilização e síntese. Porém, quando analisadas as atividades dessas enzimas nas diferentes regiões do rizóforo, verifica-se que a atividade mais elevada da FEH ocorreu na região proximal do rizóforo (figura 8B), enquanto a da SST ocorreu especialmente na região distal deste órgão (figura 10B).

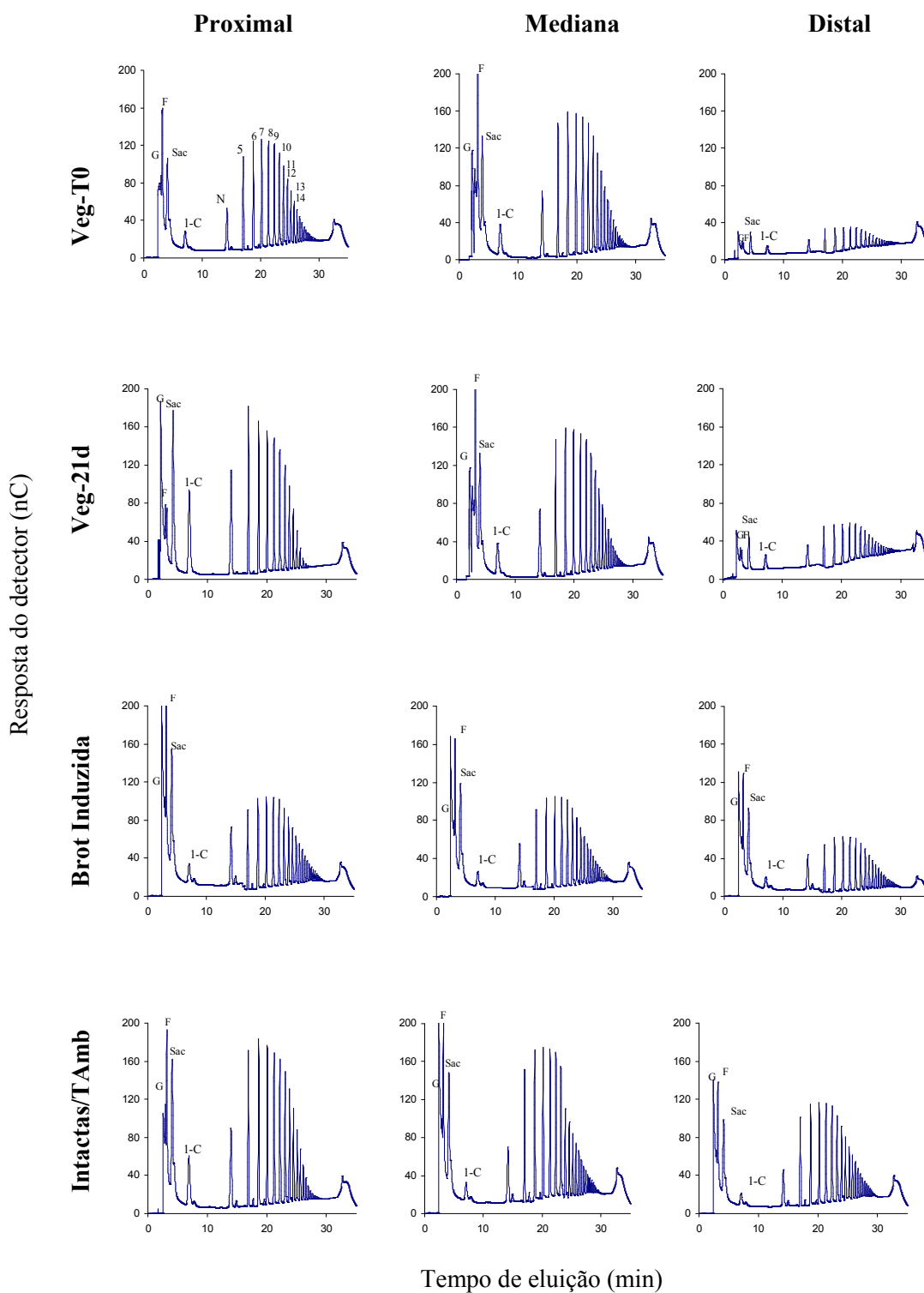


Figura 18. HPAEC/PAD dos fruto-oligossacarídeos extraídos das regiões proximal, mediana e distal de rizóforos de *Vernonia herbacea*. G-glucose, F-frutose, Sac-Sacarose, 1-C - 1-kestose, N-nistose. Os numerais representam oligossacarídeos com grau de polimerização de 5 a 14. Tratamentos conforme legenda da figura 18.

(Continua na próxima página)

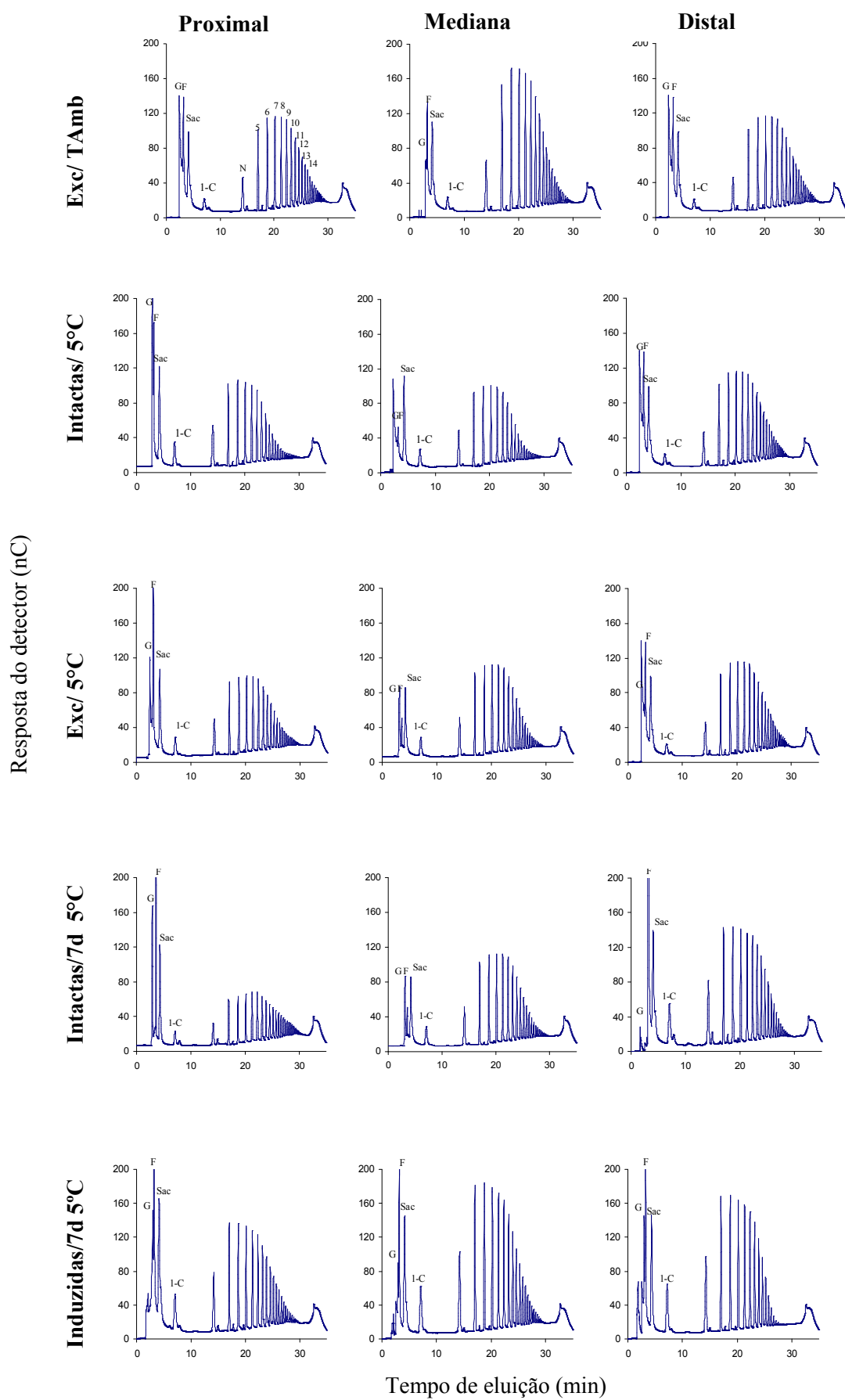


Figura 18 – continuação

O papel de frutanos como crioprotetores foi demonstrado por Konstantinova *et al.* (2002) em plantas de tabaco geneticamente manipuladas para sintetizar frutanos, uma vez que estas plantas apresentaram aumento de tolerância ao frio diretamente relacionado ao acúmulo desses compostos. Hisano *et al.* (2004) também associaram a resistência de plantas de *L. perenne* ao acúmulo de frutanos no outono enquanto Thorsteinsson *et al.* (2002) observaram que plantas de *Phleum pratense* transferidas de uma temperatura amena (20 °C) para uma temperatura fria (10 °C) apresentaram maior acúmulo de frutanos do que plantas que permaneceram todo o período experimental sob temperatura alternada baixa (10 °C/5 °C/dia/noite).

Em experimento realizado com *V. herbacea* (Portes *et al.* 2008), o aumento no conteúdo de frutanos totais não foi verificado quando plantas foram submetidas ao frio, porém a razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos aumentou nessas plantas, sugerindo que os fruto-oligossacarídeos, mais do que os polissacarídeos estariam relacionados à tolerância ao frio. Por outro lado, Dias-Tagliacozzo *et al.* (1999), verificou que em *V. herbacea* as respostas ao frio parecem estar fortemente associadas à fase fenológica da planta ou às suas condições fisiológicas.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que em *V. herbacea*, as enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos têm sua atividade alterada em plantas submetidas à excisão dos ramos aéreos e ao frio e essa resposta é dependente da região do rizóforo considerada. A região proximal do órgão de reserva, onde ocorrem as gemas que dão origem a novos ramos durante a rebrota apresenta, predominantemente, atividade da FEH e da invertase, enquanto a região distal apresenta, especialmente, atividade da SST. A região distal também apresenta os teores mais elevados de fruto-oligossacarídeos, enquanto as regiões proximal e mediana apresentam concentrações mais elevadas de fruto-polissacarídeos. O tempo de permanência das plantas no frio também influenciou a atividade das enzimas FEH e SST, promovendo um maior aumento nas plantas que

permaneceram 21 dias consecutivos no frio, em relação às plantas que foram mantidas por 7 d nestas condições, após permanência de 21 dias em temperatura ambiente.

É sugerido que as plantas induzidas à brotação tenham utilizado o produto da despolimerização das cadeias de frutanos no restabelecimento da sua parte aérea. Por outro lado, as plantas submetidas aos tratamentos de frio possivelmente utilizaram esses produtos, bem como produtos da ação das frutossiltransferases, no ajuste osmótico e na proteção das estruturas celulares, como uma estratégia de adaptação a essa condição ambiental.

Considerações Finais

Neste estudo foram observadas variações no metabolismo de frutanos ao longo do eixo de crescimento do rizóforo em função da brotação, da excisão da parte aérea e da exposição ao frio. Os resultados obtidos confirmam dados da literatura e acrescentam informações sobre o efeito do frio no metabolismo de frutanos em plantas em diferentes condições fisiológicas.

Plantas na fase vegetativa apresentam atividade elevada de SST e FFT e baixa atividade de FEH e Invertase. A indução à brotação estimulou a atividade da FEH e da invertase e inibiu a atividade da SST. A permanência de plantas induzidas à brotação no frio, por 7 dias promoveu ainda mais a atividade da FEH e da invertase e inibiu fortemente a atividade da SST.

O tempo de permanência das plantas no frio influenciou a atividade da FEH e SST, uma vez que plantas mantidas por 21 dias consecutivos sob temperatura baixa apresentaram atividades mais elevadas do que aquelas mantidas por 7 dias nestas condições. A excisão das plantas levou à uma resposta mais acentuada nestas atividades.

A região proximal do rizóforo, onde se encontram as gemas que dão origem aos ramos aéreos, apresenta, predominantemente, atividade de FEH, enquanto a região distal apresenta atividade de SST mais elevada. A região distal também apresenta os teores mais elevados de fruto-oligossacarídeos, enquanto as regiões proximal e mediana apresentam concentrações mais elevadas de fruto-polissacarídeos.

Os produtos da despolimerização dos frutanos são possivelmente utilizados no restabelecimento da parte aérea de plantas induzidas à brotação, enquanto em plantas submetidas à baixa temperatura, esses produtos, bem como os produtos da ação das frutossiltransferases, são possivelmente utilizados no ajuste osmótico e na proteção de estruturas celulares, como uma estratégia de adaptação a essa condição ambiental.

Plantas de *Vernonia herbacea* apresentaram alterações metabólicas quando expostas ao frio associadas, possivelmente, a um fator evolutivo presente em Asteraceae.

Conclusões

Os resultados obtidos neste experimento permitem destacar a região proximal como a região de maior atividade de hidrólise e a região distal como maior atividade de síntese e acúmulo de fruto-oligossacarídeos, confirmando a hipótese da organização espacial do rizóforo.

Os resultados indicam que plantas de *V. herbacea* apresentaram alterações no metabolismo de frutanos influenciadas pela exposição ao frio e remoção da parte aérea. A brotação induzida pela excisão dos ramos aéreos causou efeito esperado como a inibição da síntese e estímulo a hidrólise de frutanos. O frio parecer ter alterado significativamente o metabolismo de frutanos, aumentou a atividade de hidrólise mesmo sem haver o estímulo à brotação e aumentou a atividade de síntese dos frutanos mesmo em plantas com a parte aérea excisadas. A alteração no metabolismo de frutanos parece ter ocorrido visando à reorganização dos tamanhos das moléculas como resposta à exposição das plantas ao frio.

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., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Carvalho, M.A.M.** 2004. Is fructan hydrolysis in *Vernonia herbacea* orchestrated by an FEH complex? Fifth International Fructan Symposium, Abstracts Havana, Cuba, pp. 88.
- Asega, A.F.** 2007. Mobilização de frutanos durante a brotação em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby: purificação e expressão gênica de frutano-exohidrolases. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Baert, J. & Van Waes, C.** 1998. A rapid determination of the total sugar content and the average inulin chain length in roots of chicory (*Cichorium intybus* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76: 107-110.
- 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.
- 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.
- Bonnett, G.D. & Simpson, R.J.** 1993. Fructan-hydrolizing activities from *Lolium ridigum* Gaudin. *New Phytologist* 123: 443-451.

- Bouhnik, Y., Flourie, B., Andrieux, C., Bisetti, N., Briet, F. & Rambaud, J. C.** 1996. Effects of bifidobacterium sp. fermented milk ingestion with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 50: 269–273.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bravo, L. A., Ulloa, N., Zuniga, G.E., Casanova, A., Corcuera, L.J. & Alberdib, M.** 2001. Cold resistance in Antarctic angiosperms. *Physiologia Plantarum* 111: 55–65.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L.** 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Maryland.
- Cairns, A. J.** 2003. Fructan biosynthesis in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 54: 549-567.
- Cairns, A.J., Pollock, C.J., Gallagher, J.A. & Harrison, J.** 2000. Fructans: Synthesis and Regulation. *In: R.C. Leegood, T.D. Sharkey & S. von Caemmerer (eds.). Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp.301-320.
- Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.** 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C.** 1997. Growth and fructan content of 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. Wittie De Penna & E.W. Menezes (eds.). Fibra dietética en Iberoamérica. Tecnologia y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Projeto CYTED X1.6, 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*: Benkeblia, N. & Shiomi, N. Recent Advances in Fructooligosaccharides Research. Research Signpost, pp.69-91.
- Chatterton, N. J. & Harrison, P. A.** 2003 Fructans in crested wheatgrass leaves. *Journal of Plant Physiology* 160: 843-849.
- Claessens, G., Van Laere, A. & De Proft, M.** 1990. Purification and properties of an inulase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology* 136: 35-39.
- Coutinho, L.M.** 2002. O bioma cerrado. *In*: A. L Klein (org.). Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. Unesp/Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo. pp. 77-91.
- Cuzzuol, G.R.F., Carvalho, M.A.M., Barbedo, C.J. & Zaidan, L.B.P.** 2003. Crescimento e conteúdo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas à adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 81-91.
- De Roover, J.D., Van Laere, A. & Van den Ende, W.** 1999. Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 106: 158-163.
- De Roover, J.D., Van den Branden, 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 (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 210: 808-814.

- Degasperi, M.I., Itaya, N.M., Buckeridge, M.S. & Figueiredo -Ribeiro, R.C.L.** 2003. Fructan degradation and hydrolytic activity in tuberous roots of *Viguiera discolor* (Baker) (Asteraceae), a herbaceous species from the cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 11-21.
- Demel, R.A., Dorrepaal, E., Ebskamp, M.J.M., Smeekens, J.C.M. & de Kruijff, B.** 1998. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1375: 36-42.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.C.** 1999. Fructan variation in the rizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby influenced by temperature. *Revista Brasileira de Botânica* 22: 267-273.
- Dionne, J.; Castonguay, Y., Nadeau, P. & Desjardins, Y.** 2001 Freezing Tolerance and Carbohydrate Changes during Cold Acclimation of Green-Type Annual Bluegrass (*Poa annua* L.) Ecotypes. *Crop Science* 41:443-451.
- Dysseler P & Hoffem D.** 1995. Inulin, an alternative dietary fibre. Properties and quantitative analysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 49 Suppl 3:S145-52.
- Eagles, C.F.** 1967. Variation in the soluble carbohydrate content of climate races of *Dactylis glomerata* (cocksfoot) at different temperatures. *Annals of Botany* 75: 339-350.
- Edelman, J. & Jefford, T.G.** 1968. The mechanism of fructose 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 fructans metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal of Plant Physiology* 116: 197-208.

- Fukai, K., Ohno, S., Goto, K., Nanjo, F. & Hara, Y.** 1997. Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). Soil Science Plant Nutrition 43: 171-177.
- Gibson, G. R. & Roberfroid, M. B.** 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota-introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition 125: 1401–1412.
- Gibson, G. R., Beatty, E. R. Wang, X. & Cummings, J. H.** 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. Gastroenterology 108: 975–982.
- Gibson, G. R & Wang, X.** 1994. Enhancement of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. FEMS Microbiological Letters 118: 121–128.
- Goedert, W.J.** 1985. Solos dos Cerrados. Nobel, São Paulo e EMBRAPA, CPAC, Brasília.
- Hartemink, R., Vanlaere, K.M.J. & Rombouts, F.M.** 1997. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. Journal of Applied Microbiology 383: 367-374.
- 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. & Heyer, A.G.** 1998. Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and respective 1-FFT cDNAs. FEBS Letters 427: 25-28.
- 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. Proceedings of the National Academy of Sciences 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. Chartterton (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. *Jornal Plant Physiology*, 134:186.

Henson, C.A. & Livingston, D.P. 1998. Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolyzes multiple fructofuranosidic linkages. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 715-720.

Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T. & Tokunaga, Y. 1986. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacterium Microflora* 5: 37-50.

Hidaka, H., Adachi, T., Tokunaga, T., Nakajima, Y. & Kono, T. 2007. The road of fructooligosaccharides research and business development *In*: N. Benkeblia, & N. Shiomi (eds.) *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research*. Research Signpost, Kerala, pp.375-395.

Hincha, D.K., Hellwege, E.M. & Heyer, A.G. 2000. Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *European Journal of Biochemistry* 267: 535-540.

Hincha, D.K., Zuther, E., Hellwege, E.M. & Heyer, A.G. 2002. Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* 12:103-110.

- Hincha, D. K., Popova, A. V. & Cacela, C.** 2006. Effects of sugars on the stability and structure of lipid membranes during dryng. *In*: H.T. Tien & A. Ottova-Leitmannova. Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, v.3, Elsevier, Amsterdam, pp.189-217.
- Hincha, D. K., Livingston III, D.P., Premakimar, R., Zuther, E., Obel, N., Cacela, C. & Heyer, A.G.** 2007. Fructans from oat and rye: Composition and effects on membrane stability during drying. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 1611-1619.
- Hisano, H., Kanazawa, A., Kawakami, A., Yoshida, M., Shimamoto, Y. & Yamada, T.** 2003. Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. *Plant Science* 167: 861-868.
- Isejima, E.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Zaidan, L.B.P.** 1991. Fructan composition in adventitious tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by daylength. *New Phytologist* 119: 149-154.
- Itaya, N.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Buckeridge, M.S.** 1999. Synthesis of fructans by fructosyltransferases from the tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 435-442.
- Itaya, N. M., Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002 Fructosyl transferase nd hydrolase activities in rizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). *Physiologia Plantarum* 116: 451-459.
- Jeong, B. & Housley, T.L.** 1990. Fructan metabolism in wheat in alternating warm and cold temperatures. *Plant Physiology* 93: 902 – 906.
- Jermyn, M.A.** 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature* 177: 38-39.

- Kawakami, A. & Yoshida, M.** 2002. Molecular characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose:fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 66: 2297–2305.
- Kawakami, A., Yoshida M & Van den Ende W.** 2005. Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum*) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* 358: 93-101.
- Konstantinova, T., Parvanova,D., Atanasov, A & Djilianov, D.** 2002. Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Science* 163:157-164.
- Koops, A.J. & Jonker, H.H.** 1996. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II. Purification of Sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified Sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and Fructan:fructan 1-fructosyltransferase. *Plant Physiology* 110:1167-1175.
- Larcher, W.** 2004. Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer, Berlin.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L. & Cox, M. M.** 2002. Princípios de bioquímica. 3.ed. Edgard Blucher, São Paulo.
- Levitt, J.** 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. Academic Press New York. v.I – Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. Academic Press, Inc. New York.
- Livingston, D.P. & Henson, C.A.** 1998. Apoplastic sugars fructnas, fructanexohydrolase and invertase in winter oat: response to second-phase cold hardening. *Plant Physiology* 116:403-408.

- Livingston, D., Premakumar, R. & Tallury S. P.** 2005. Carbohydrate concentrations in crown fractions from winter oat during hardening at sub-zero temperatures. *Annals of Botany* 96: 331-335.
- Livingston, D.P., Hinch, D.K. & Heyer, A.G.** 2007. The relationship of fructan to abiotic stress tolerance in plants. *In*: N. Benkeblia, & N. Shiomi (eds.) *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research*. Research Signpost, Kerala. pp. 181-199.
- Lothier J, Lasseur B., Le Roy K., Van Laere A., Prud'homme M.P., Barre P., Van den Ende W. & Morvan-Bertrand A.** 2007. Cloning, gene mapping, and functional analysis of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) from *Lolium perenne* implicated in fructan synthesis rather than in fructan mobilization. *Journal of Experimental Botany* 58: 1969–1983.
- Luscher, M., Erdin C., Sprenger, N., Hochstrasser, U., Boller, T. & Wiemkem, A.** 2006. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Letters* 385: 39-42.
- Mancilla-Margalli, N. A., & Lopez, M.G.** 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyllirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7832-7839.
- Mantovani, W. & Martins, F.R.** 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 11: 101-112.
- Marx, S.P., Nosberger, J. & Frehner, M.** 1997a. Seasonal variation of fructan- β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β -(2,1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *New Phytologist* 135: 267-277.

- Marx, S.P., Nösberger, J. & Frehner, M.** 1997b. Hydrolysis of fructan in grasses: a β (2,6) linkage specific fructan - β - fructosidase from stubble of *Lolium perenne*. New Phytologist 135: 279 - 290.
- 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., v.13 A. Springer-Verlag, Heildelberg. pp. 418-471.
- Modler, H.W.** 1994. Bifidogenic factors - sources, metabolism and applications. International Dairy Journal 4: 383-407.
- Morvan, A., Challe, G., Prud'Homme, M.P., Le Saos, J. & Boucad, J.** 1997. Rise of fructan exohydrolase activity in stubble of *Lolium perenne* after defoliation is decreased by uniconazole, an inhibitor of the biosynthesis of gibberellins. New Phytologist 136: 81-88.
- Oliveira, V.F.** 2007. Efeito da atmosfera enriquecida em CO₂ no crescimento, na alocação de biomassa e no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- 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.
- Pinto, M. N.** 1990. Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas. Unb/Sematec, Brasília.
- Pollard, C.J. & Amuti, K.S.** 1981. Fructose oligosaccharides, possible markers of philogenetic relationships among dicotyledonous plant families. Biochemistry Systematics and Ecology 9: 69-78.

- 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. 250-227.
- Pontis, H.G.** 1989. Fructans and cold stress. *Journal of Plant Physiology* 134: 148-150.
- Portes, M.T.** 2005. Biossíntese e degradação de frutanos em diferentes regiões do rizóforo de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae). Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Portes, M.T. & Carvalho, M.A.M.** 2006. Spatial distribution of fructans and fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby in different developmental phases. *Plant Science* 170: 624-633.
- Portes, M.T., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Carvalho, M.A.M.** 2008. Low temperature and defoliation affect fructan-metabolizing enzymes in different regions of the rhizophores of *Vernonia herbacea*. *Journal of Plant Physiology* doi:10.1016/j.jplph.2008.01.004.
- Prud'homme, M.P., Gonzalez, B. Billard, J.P. & Boucaud, J.** 1993. Carbohydrate content, fructan and sucrose enzymes activities in roots, stubble and leaves of ryegrass (*Lolium perenne*) as affected by source/sink modification after cutting. *Journal of Plant Physiology* 140: 282 – 291.
- Puebla, A.F., Salerno, G.L. & Pontis, H.G.** 1997. Fructan metabolism in two species of *Bromus* subjected to chilling and water stress. *New Phytologist* 136: 123-129.
- Ribeiro Sobrinho, D.S., Buckeridge, M.S. & Carvalho, M.A.M.** 1996. Fructan hydrolase from rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby and its role in fructan mobilization. *In*: Third International Fructan Conference, Utah. Abstracts, Third International Fructan Conference, Utah, pp.45.

- Ritsema, T. & Smeekens, S.C.M.** 2003. 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 Reviews* 53: 127-130.
- Rutherford, P.P & Deacon, A.C.** 1974. Seasonal variation in dandelion roots of fructans composition, metabolism and response to treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Annals of Botany* 38: 251-260.
- Saengthongpinit, W. & Sajjaanantakul, T.** 2005. Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *Postharvest Biology and Technology* 37: 93-100.
- Sakai, K.** 2000. The effect of short chain fructooligosaccharides in promoting recovery from post-gastrectomy anemia is stronger than that of inulin. *Nutrition Research* 20: 403-412.
- Simpson RJ, Walker RP, Pollock CJ.** 1991. Fructan exohydrolase activity in leaves of *Lolium temulentum* L. *New Phytologist* 119: 953-956.
- Shiomi, M.** 1993. Structure of fructopolysaccharide (asparagosin) from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *New Phytologist* 123: 263-270.
- Smart, D. R., Chatterton, N.J. & Bugbee, B.** 1994. The influence of elevated CO₂ on non-structural carbohydrate distribution and fructan accumulation in wheat canopies. *Plant Cell and Environment* 17: 435-422.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-63.

- Spiegel, J.E. Rose, R. Karabell, P. Frankos, V.H. & Schmidt, D.F.** 1994. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. *Food Technology* 48: 85-89.
- Spollen, W.G. & Nelson, C.J.** 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* 106: 329-336.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. *Fisiologia Vegetal*. 3. ed. Artmed, Porto Alegre.
- 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.
- Thorsteinsson, B., Harrison, P. A. & Chatterton, N.J.** 2002 Fructan and total carbohydrate accumulation in leaves of two cultivars of timothy (*Phleum pratense* Vega and Climax) as affected by temperature. *Journal of Plant Physiology* 159: 999–1003.
- Van Den Ende W. & Van Laere A.** 1996. De-novo synthesis of fructans from sucrose in vitro by a combination of two purified enzymes (sucrose:sucrose fructosyl transferase and fructan:fructan fructosyl transferase) from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 200: 335-342.
- Van den Ende, W., Michiels, A. Roover, J.D. & Van Laere, A.** 2002. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertase, expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal* 2: 1281-1295.
- Van den Ende, W., Michiels, A. Van Wouterghem, D., Clerens, S., De Roover, J. & Van Laere, A.** 2003. Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEH IIa e 1-FEH IIb). Mass fingerprint of the 1-FEH II enzymes. *Plant Physiology* 126: 1186-1195.

- Van den Ende, W., Yoshida, M., Clerens, S., Vergauwen, R. & Kawakami, A.** 2005. Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum* L.). *New Phytologist* 166: 917-932.
- Van Riet, L., Nagaraj, V., Van den Ende, W., Clerens, S., Wiemken, A. & Van Laere, A.** 2006. Purification, cloning and functional characterization of an fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 57: 213-223.
- Vereyken, I.J., Chupin, V., Hoekstra, F.A., Smeekens, S.C.M. & De Kruijff, B.** 2003. The Effect of Fructan on Membrane Lipid Organization and Dynamics in the Dry State. *Biophysical Journal* 84: 3759–3766.
- Vergauwen, R., Van den Ende, W. & Van Laere, A.** 2003. The role of fructan in flowering of *Campanula rapunculoides*. *Journal of Experimental Botany* 51: 1261-1266.
- Vijn, I. & Smeekens S.** 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120: 351-359.
- 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.
- Yun, J. W.** 1996. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*. 19: 107-117.