

FLAVIO TREVISAN

**Cultivo *in vitro* de *Vernonia herbacea* (Vell.)
Rusby e atividade e expressão de enzimas do
metabolismo de frutanos**

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

São Paulo/SP

2014

FLAVIO TREVISAN

**Cultivo *in vitro* de *Vernonia herbacea* (Vell.)
Rusby e atividade e expressão de enzimas do
metabolismo de frutanos**

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

ORIENTADORA: DRA. MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

CO-ORIENTADORA: DRA. MARILIA GASPAR

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Trevisan, Flavio

T813c Cultivo *in vitro* de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby e atividade e expressão de enzimas do metabolismo de frutanos / Flavio Trevisan -- São Paulo, 2014.
105 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014
Bibliografia.

1. Asteraceae. 2. Inulina. 3. qRT-PCR. I. Título

CDU: 582.998.0

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Olzeno Trevisan e Ildaci B. Trevisan por todo apoio e incentivo aos meus estudos, a minha esposa Áurea Juliana Bombo Trevisan pelo constante apoio.

À Professora Dra. Maria Angela Machado de Carvalho pela orientação, amizade e pela oportunidade oferecida.

À Professora Dra. Marília Gaspar pela co-orientação e constante colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor Edson Chu pelo auxílio nos experimentos de cultura de tecidos.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, pela amizade e auxílio e sugestões durante a realização do trabalho, especialmente para Aline Coelho, Athos Poli, Vanessa Oliveira e Emanuela Joaquim e Claudio Galvão.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica Ana Alice, Maria Aparecida, Mary e Pedro.

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Botânica pelas facilidades oferecidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Proc. 2009/16688-6) e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo e auxílio financeiro ao projeto de pesquisa do PNADB (Proj. 454/2010).

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho o meu muito obrigado.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Vernonia herbacea</i>	20
Material vegetal.....	20
Conteúdo e composição de frutanos em plantas cultivadas <i>in vitro</i> e em casa de vegetação.....	21
Enraizamento de segmentos nodais.....	21
Regeneração e conteúdo de frutanos em calos	22
3.2 Estudo do metabolismo de frutanos em calos	23
3.3 Isolamento de cDNAs de interesse em <i>Vernonia herbacea</i>	24
Material vegetal	24
Extração do RNA total.....	24
Construção de <i>primers</i>	24
Síntese do cDNA.....	26
Amplificação e isolamento dos fragmentos dos genes de interesse.....	26
Reação de sequenciamento.....	26
Alinhamento das sequências e análise filogenética.....	27
3.4 Estudo do metabolismo de frutanos em plantas cultivadas <i>in vitro</i>	28
Material vegetal.....	28
3.4.1 Efeito de diferentes fontes de carbono.....	28
3.4.2 Efeito de diferentes concentrações de sacarose.....	29
3.5 Análise do metabolismo de frutanos	29
Extração e análise de carboidratos solúveis.....	29
Extração enzimática.....	30
Determinação das atividades enzimáticas.....	30
Análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	31
<i>Construção dos primers para as análises de qRT-PCR</i>	31
<i>Síntese de cDNA</i>	32
<i>PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)</i>	32
3.6 Análise estatística	33

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Vernonia herbacea</i>	34
Enraizamento de segmentos nodais.....	41
Regeneração e conteúdo de frutanos em calos	43
4.2 Estudo do metabolismo de frutanos em calos	51
4.3 Isolamento de cDNAs de interesse em <i>Vernonia herbacea</i>	56
Isolamento da sequência parcial dos genes <i>EF</i> , <i>1-SST</i> e <i>1-FFT</i>	56
Análise filogenética dos genes <i>1-SST</i> e <i>1-FFT</i>	59
Validação dos <i>primers</i> para as análises de qRT-PCR.....	61
4.4 Estudo do metabolismo de frutanos em plantas cultivadas <i>in vitro</i>	64
4.4.1 Efeito de diferentes fontes de carbono.....	64
4.4.2 Efeito de diferentes concentrações de sacarose.....	78
5 CONCLUSÃO	85
6 PERSPECTIVAS	86
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	100

Lista de abreviaturas

18S - 18S RNA ribossomal

1-FEH - 1-frutano exohidrolase

1-FFT - frutano:frutano 1-frutosiltransferase

1-SST - sacarose:sacarose 1-frutosiltransferase

2,4-D – ácido 2,4-diclorofenoxiacético

AIB - ácido indolbutírico

ANA - ácido naftalenoacético

BAP - 6-benzilaminopurina

CP – crossing point

CV – coeficiente de variação

DP - desvio padrão

EF - fator de alongamento 1-alpha

FOS - fruto-oligossacarídeos

GP – grau de polimerização

HPAEC/PAD - Cromatografia de troca aniônica de alta resolução e detector de pulso amperométrico

KIN - cinetina

MS - meio de cultura Murashige & Skoog 1962

PCR - Reação em cadeia de polimerase

qRT-PCR - Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

TDZ - thidiazurom

RESUMO

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby é uma Asteraceae nativa do Cerrado que acumula em seus rizóforos cerca de 80% de sua massa seca na forma de frutanos do tipo inulina. Frutanos são polímeros de frutose originados da sacarose que ocorrem como principal carboidrato de reserva em 15% das angiospermas. Além da função de reserva, os frutanos contribuem para a tolerância à seca e a baixas temperaturas. Visando à obtenção de plantas germinadas *in vitro*, aquênios foram desinfestados e colocados para germinar em meio de cultura e as plantas obtidas, multiplicadas através do enraizamento de segmentos nodais. Foi avaliado o efeito de diferentes reguladores vegetais na morfogênese *in vitro* utilizando folhas como explantes. O efeito de diferentes fontes de carboidratos na regulação do metabolismo de frutanos foi avaliado em plantas cultivadas *in vitro* por meio da análise da composição dos frutanos e da atividade e expressão dos genes que codificam para as enzimas de síntese (1-SST e 1-FFT) e degradação (1-FEH) destes compostos. A utilização de aquênios como explantes permitiu a germinação *in vitro*, e o enraizamento de segmentos nodais, a multiplicação das plantas. A espécie apresenta recalcitrância para o desenvolvimento de gemas e embriões adventícios. A análise do conteúdo de frutanos nas plantas obtidas indicou uma alteração no padrão da razão fonte/dreno e conseqüentemente no acúmulo de frutanos na parte aérea em detrimento dos rizóforos. As sequências dos genes *EF*, *1-FFT* e *1-SST* permitiu a construção de *primers* para as análises de qRT-PCR e a análise filogenética mostrou que as sequências de *V. herbacea* apresentaram maior similaridade com os respectivos genes de outras espécies de Asteraceae, do que com os de Poaceae. O cultivo sob déficit energético estimulou a transcrição do gene *1-FEH* e inibiu a dos genes *1-SST* e *1-FFT*. A transferência das plantas sob carência de carbono para meios de cultura suplementados com sacarose, frutose ou glucose promoveu uma inversão no perfil de expressão desses genes. Com exceção do gene *1-FFT* foi observada a correlação entre a atividade enzimática e a expressão gênica. Os resultados permitem concluir que em *V. herbacea* sacarose, frutose e glucose atuam de forma semelhante na regulação do metabolismo de frutanos e que existe uma regulação única, porém com efeito inverso, para os genes *1-SST* e *1-FEH*. O cultivo em concentrações crescentes de sacarose estimulou a síntese e inibiu a mobilização de frutanos, e induziu um padrão de atividade distinto entre os genes *1-SST* e *1-FFT*, indicando a existência de um mecanismo de regulação diferenciado entre os mesmos.

ABSTRACT

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby is an Asteraceae native to the Cerrado which accumulates about 80% of the rhizophore dry mass as inulin-type fructans. Fructans are fructose polymers that occur as the main reserve carbohydrate in 15 % of the angiosperms. In addition to their role as plant reserve carbohydrates, fructans are known to provide tolerance to drought and low temperatures in plants. Aiming at establishing a protocol for plant *in vitro* culture, achenes were sterilized and germinated in culture medium and the plants were multiplied through the rooting of nodal segments. The effect of different plant growth regulators on morphogenesis was evaluated *in vitro* using leaves as explants. The effect of different sources of carbohydrate on fructan metabolism in plants grown *in vitro* was assessed by analyzing the fructans composition and by the activity and expression of genes encoding enzymes for synthesis (1-SST and 1-FFT) and degradation (1-FEH). The use of achenes as explants allowed the establishment of *in vitro* plants, the propagation was obtained by rooting of nodal segments, but the species presents recalcitrance for the development of adventitious buds and embryos. The analysis of fructan in *in vitro* plants indicated a change in the pattern of source/sink ratio and consequently the accumulation of fructans in shoots instead of in rhizophores. The sequences of the genes *EF*, *1-SST* and *1-FFT* allowed the construction of *primers* for qRT-PCR analyses. The phylogenetic analysis of the sequences of *V. herbacea* showed higher similarity with the corresponding genes from other species of Asteraceae than Poaceae. The carbon deficit stimulated the transcription of the gene *1-FEH* and inhibited *1-SST* and *1-FFT*. The transfer of carbon deprived plants to culture medium supplemented with sucrose, glucose or fructose promoted reversal of the expression profile of these genes. With the exception of *1-FFT* a positive correlation between enzyme activity and gene expression was observed. The results indicate that in *V. herbacea* sucrose, fructose and glucose act similarly in the regulation of fructan metabolism and that there is a single regulation, but with inverse direction for the genes *1-SST* and *1-FEH*. Cultivation of plants in increasing sucrose concentrations stimulated synthesis and inhibited the mobilization of fructans, and induced a distinct pattern of gene activity for *1-SST* and *1-FFT*, indicating the existence of a mechanism for differential regulation between them.

1 INTRODUÇÃO

A fotossíntese promove a assimilação do CO₂ atmosférico pelas folhas resultando como produtos finais, por duas rotas diferentes, sacarose no citosol e amido nos cloroplastos. A sacarose é o principal composto utilizado para transporte do carbono fotoassimilado, para as partes não fotossintetizantes das plantas como raízes, órgãos de reserva e frutos, entre outros. Já o amido é o principal carboidrato de reserva em plantas (Taiz & Zeiger 2004).

No entanto, existem variações nas formas de armazenamento e transporte do carbono fixado, e um grande número de oligossacarídeos e açúcares álcoois já foram caracterizados e associados ao transporte de carbono em vegetais (Kandler & Hopf 1980). Algumas espécies, por exemplo, armazenam parte do carbono fixado pela fotossíntese na forma de sacarose ou como frutanos (Hendry 1995). De fato, os frutanos são, depois do amido e da sacarose, os carboidratos de maior ocorrência entre os vegetais superiores, encontrados em cerca de 15% das angiospermas (Hendry & Wallace 1993).

Os frutanos podem substituir totalmente o amido em algumas espécies como *Vernonia herbacea* (Carvalho & Dietrich 1993) e *Viguiera discolor* (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993), ou coexistir com o mesmo em outras como *Lachenalia mínima* (Orthen 2001) e *Triticum aestivum* (Scofield *et al.* 2009).

Os frutanos são acumulados principalmente em órgãos subterrâneos de reserva como raízes tuberosas, rizóforos, rizomas, tubérculos e bulbos, podendo ser também armazenados em quantidades inferiores em caules, folhas, inflorescências e sementes, especialmente de Poaceae (Pollock *et al.* 1996).

Estruturalmente, os frutanos consistem de séries homólogas de oligo- e polissacarídeos não redutores, originados a partir da sacarose, em que cada membro da série contém uma unidade de frutose a mais que o membro anterior (Edelman & Jefford 1968). Uma ampla variação no peso molecular dos frutanos pode ocorrer em diferentes espécies. Em geral, o grau de polimerização (GP) máximo da cadeia varia de 30 a 50 unidades de frutose, mas, ocasionalmente, moléculas com GP 200 podem ser encontradas. O comprimento médio das cadeias de frutanos pode variar também de acordo com o estágio fenológico, idade da planta e com as condições ambientais, mas existe um determinante genético para o tamanho máximo das moléculas em cada espécie (Darbyshire & Hendry 1978).

Os frutanos ocorrem sob a forma de diferentes estruturas que são classificadas de acordo com os tipos de ligações glicosídicas entre as unidades de frutose, com o trissacarídeo que dá origem à série homóloga, a presença de glucose terminal ou interna à molécula e a presença ou não de ramificações. Nas plantas superiores cinco estruturas podem ser

encontradas: inulina, levano ou fleano, frutanos com ligações mistas ou graminanos, neosérie da inulina e neosérie de levanos (figura 1). Os frutanos do tipo inulina são os mais estudados, tendo sido isolados pela primeira vez em 1804 por Rose, a partir de *Inula helenium* (Asteraceae) e, posteriormente, denominados inulina.

A inulina, que está presente predominantemente em Asterales, é baseada no trissacarídeo 1-cestose (1-cestotriose) e apresenta unidades de frutose unidas por ligações do tipo β -2,1. O levano ou fleano, encontrado predominantemente em Poales/forrageiras (*Phleum*, *Dactylis*, *Poa*), é baseado no trissacarídeo 6-cestose (6-cestotriose) e apresenta as unidades de frutose unidas por ligações do tipo β -2,6. Os frutanos com ligações mistas, β -2,1 e β -2,6, e cadeias ramificadas, são encontrados também em Poales/cereais (*Triticum*, *Bromus*, *Hordeum*). Já a neosérie da inulina, com ligações β -2,1 entre as unidades de frutose, é encontrada em alguns membros de Asparagales (*Asparagus*, *Allium*) e a neosérie do fleano, com ligações β -2,6 entre as unidades de frutose, está presente em alguns membros de Poales (*Avena*, *Lolium*), sendo que ambas são baseadas no trissacarídeo neocetose (6-G-cestotriose) e são as únicas entre as demais estruturas com a glucose interna à molécula (Pollock *et al.* 1996, Ritsema & Smeekens 2003).

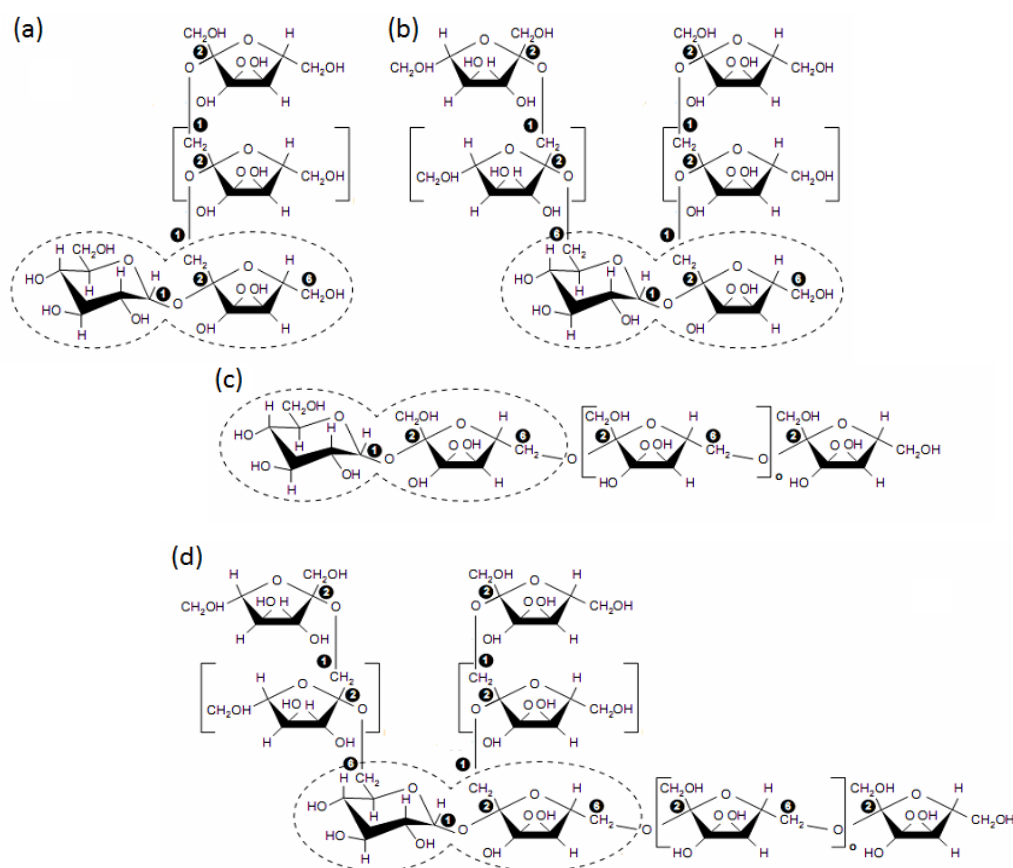
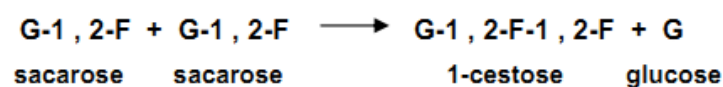


Figura 1. Estrutura dos diferentes tipos de frutanos encontrados nas espécies de plantas superiores. (a) inulina, (b) neosérie da inulina, (c) levano e (d) frutanos de cadeia mista. A molécula de sacarose sobre a qual a molécula de frutano é sintetizada está circulada (Ritsema & Smeekens 2003, modificado).

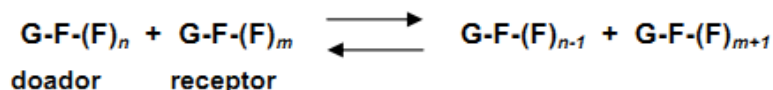
Metabolismo de frutanos

Segundo modelo descrito por Edelman & Jefford (1968) para o metabolismo de frutanos em tubérculos de *Helianthus tuberosus* e, tempos depois, confirmado por Koops & Jonker (1996) e Lucher *et al.* (1996), a síntese de inulina, o tipo mais simples de frutanos, é realizada pela ação conjunta de duas frutossiltransferases. A sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST), que catalisa a transferência da uma unidade frutossil de uma molécula de sacarose doadora para outra receptora, produzindo o trissacarídeo 1-cestose, conforme indicado abaixo:



e a frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT), que catalisa a transferência reversível da unidade frutossil de uma molécula de frutano com grau de polimerização ≥ 3 para outra

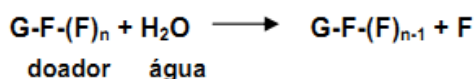
molécula de frutano ou de sacarose, resultando em moléculas de frutanos com comprimentos de cadeias variáveis, conforme indicado abaixo:



Estudos atribuem a existência de plantas com frutanos de diferentes graus de polimerização, a diferenças na afinidade da 1-FFT por substratos com comprimentos de cadeia variados (Hellwege *et al.* 2000, Vergauwen *et al.* 2003). Estudos de expressão heteróloga do gene da 1-FFT de espécies com frutanos de diferentes graus de polimerização indicaram também que os diferentes perfis de frutanos observados nessas espécies estão relacionados principalmente a diferenças nas características de suas enzimas 1-FFT (Hellwege *et al.* 1998).

A 1-FFT também pode atuar na mobilização de reservas. Como a transferência da unidade frutossil de uma molécula de frutano para outra é reversível, a enzima pode transferir unidades de frutose de moléculas com GP elevados para moléculas com GP menores facilitando a sua despolimerização posterior pela enzima de hidrólise (Edelman & Jefford 1968, Hellwege *et al.* 1998).

A despolimerização dos frutanos é catalisada pela enzima 1-frutano exohidrolase (1-FEH), que hidrolisa de forma exolítica a unidade de frutose terminal da cadeia; a enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose, e seus principais produtos são frutose e sacarose.



Além da 1-SST e da 1-FFT, outras enzimas atuam na biossíntese de frutanos mais complexos, com formas estruturais diferentes da inulina (Vijn & Smeekens 1999), como a sacarose:frutano 6-frutossiltransferase (6-SFT) e frutano:frutano 6G-frutossiltransferase (6G-FFT). A biossíntese dos diferentes tipos de frutanos pode ser resumida conforme o esquema apresentado na figura 2.

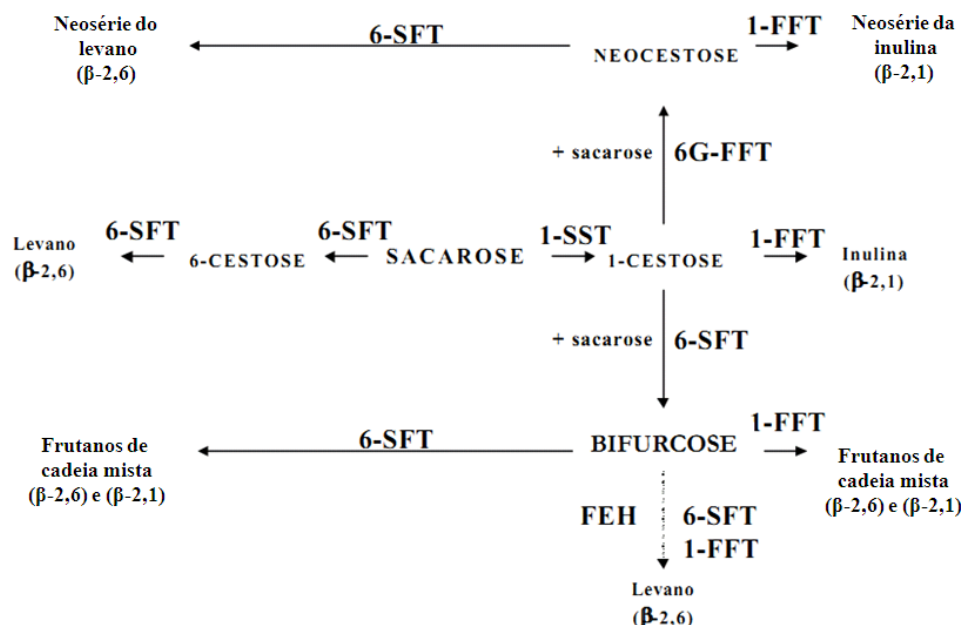


Figura 2. Modelo de biossíntese de frutanos. Adaptado de Vijn & Smeekens (1999).

A maior parte das enzimas catalisa reações específicas com substratos particulares. Já as enzimas do metabolismo de frutanos são peculiares, pois apesar de possuírem doadores e aceptores preferenciais, são capazes de catalisar diversas reações de transferência de grupos frutossil, apesar de apresentarem, nessas situações, uma eficiência muito menor do que a observada com substratos e doadores preferenciais (Van den Ende *et al.* 1996).

A regulação das enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos parece ser realizada principalmente em nível de transcrição (Van den Ende *et al.* 2002). Segundo Pollock & Cairns (1991) a síntese de frutanos é induzida por aumento na concentração de sacarose nas células, enquanto a sua despolimerização ocorre pela necessidade de liberação de reservas quando o suprimento energético é limitado (Van de Ende *et al.* 2002, Asega & Carvalho 2004). No entanto, outros açúcares, como glucose e frutose, mesmo que em níveis inferiores, também são capazes de estimular a síntese de frutanos (Maleux & Van den Ende 2007). Portanto, situações que favoreçam a fotossíntese ou maior disponibilidade de carboidratos são capazes de estimular a atividade/expressão dos genes envolvidos na síntese de frutanos, como observado em *V. herbacea* (Portes & Carvalho 2006), em *Triticum aestivum* (Martine-Noel *et al.* 2001) e *Cichorium intybus* (Kusch *et al.* 2009). Essa resposta modulada pela disponibilidade de fotoassimilados pode ser correlacionada com alterações ao longo do ciclo fenológico da planta quando, em geral, observa-se uma atividade elevada da 1-SST na fase de crescimento vegetativo e baixa durante a rebrota na primavera, sendo o contrário observado para a 1-FEH (Fukai *et al.* 1997, Asega & Carvalho 2004, Portes & Carvalho 2006).

A desfolhação natural ou induzida também é correlacionada com a resposta a concentrações intracelulares de açúcares uma vez que a mesma interrompe o aporte de fotoassimilados criando uma situação de déficit energético que estimula a atividade/expressão do gene da 1-FEH e consequente liberação de energia para a rebrota, como observado em *V. herbacea* (Asega & Carvalho 2004, Portes & Carvalho 2006, Asega *et al.* 2011), *C. intybus* (Van den Ende *et al.* 2001), *Lolium perenne* (Morvan *et al.* 1997) e *Phleum pratense* (Tamura *et al.* 2011).

Além da concentração de açúcares nas células, estresses ambientais como deficiência de nitrogênio, déficit hídrico e baixas temperaturas, são capazes de promover alterações no metabolismo de frutanos em diversas espécies. O estresse nutricional devido à falta de nitrogênio induziu o aumento na concentração de frutanos em relação a plantas não estressadas de *V. herbacea* (Cuzzuol *et al.* 2008) e *C. intybus* (Van den Ende *et al.* 1999). Em cevada (*Hordeum vulgare*), o déficit de nitrogênio promoveu o acúmulo de frutanos, associado ao aumento na transcrição do gene 6-SFT (Wang *et al.* 2000).

O estresse por baixa temperatura estimulou atividade da enzima 1-FEH e reduziu a da 1-SST em *V. herbacea* (Portes *et al.* 2008, Asega *et al.* 2011), enquanto em *Poa pratensis*, espécie que acumula frutanos do tipo levano, o frio estimulou a atividade de enzimas de síntese (6-SFT) e degradação (FEH), o que demonstra o papel de ambas enzimas na aclimação ao frio (Rao *et al.* 2011).

O déficit hídrico é outro fator ambiental associado a alterações no metabolismo de frutanos. Em plantas de *V. herbacea*, a supressão da rega promoveu aumento na razão oligo:polifrutanos devido a um aumento inicial da atividade das enzimas envolvidas na síntese (1-SST e 1-FFT), que posteriormente deram lugar à maior atividade da enzima de degradação (1-FEH) (Garcia *et al.* 2011). Já em plântulas de *C. intybus*, o déficit hídrico promoveu um rápido acúmulo de frutanos associado ao aumento na expressão da 1-SST (De Roover *et al.* 1999).

Origem da flora sintetizadora de frutanos

O surgimento da flora sintetizadora de frutanos ocorreu entre o Oligoceno (32-25 milhões anos atrás) e o Mioceno (24-15 milhões anos atrás). O Oligoceno é caracterizado como um período seco com desertificação localizada e acompanhado por uma grande regressão no nível dos mares. No Mioceno houve uma tendência de redução contínua das temperaturas, o desenvolvimento da cobertura de gelo permanente na Antártica e de regiões

extremamente secas. Nesse contexto desenvolveu-se uma vegetação adaptada a um clima com disponibilidade sazonal de água no solo e com precipitação concentrada em uma época restrita (Hendry 1995). Inicialmente foi proposto que a flora sintetizadora de frutanos tenha surgido como uma vantagem adaptativa a condições de baixas temperaturas. Entretanto, apesar de muitas plantas que produzem frutanos tolerarem períodos de baixas temperaturas não existe uma evidência que associe a expansão da flora que contém frutanos a episódios prolongados de frio (Hendry 1993).

Exemplos desta flora encontram-se entre os membros das famílias Asteraceae, cuja origem está situada cerca de 25 milhões de anos atrás, e Poaceae com origem há 12-10 milhões anos. A distribuição atual das Asteraceae sugere que a família segue um padrão consistente com sua origem, uma vez que atualmente a sua ocorrência é continuamente associada a regiões de clima seco com precipitação considerável, porém sazonal (Hendry 1995).

A tabela 1, adaptada de Hendry & Wallace (1993), mostra a distribuição dos organismos que contém frutanos. Entre as plantas superiores, os frutanos são encontrados em 5 das ordens mais derivadas (Cyperales, Asterales, Campanulales, Lamiales e Poales), perfazendo, no total, cerca de 45000 espécies que armazenam frutanos em adição ou substituição ao amido (Hendry & Wallace 1993).

Análises filogenéticas indicam que os genes das enzimas envolvidas na síntese de frutanos evoluíram a partir de invertases vacuolares, compartilhando com essas uma similaridade de sequências de 42 a 56 % (Wiemken *et al.* 1995). Essas análises agrupam as 1-SST de Liliopsida (monocotiledôneas) em grupos distintos das 1-SST de Magnoliopsida (eudicotiledôneas), os quais apresentam maior relação com suas respectivas invertases vacuolares do que com as 1-SST do outro grupo (Van den Ende *et al.* 2002). Já os genes das enzimas envolvidas na despolimerização dos frutanos (1-FEH) são mais relacionados com invertases de parede celular apresentando com estas, similaridade entre 43 e 59% (Van de Ende *et al.* 2000, 2002).

As análises filogenéticas indicam ainda, uma origem polifilética para os genes envolvidos na síntese de frutanos em plantas, em pelo menos dois eventos distintos. Essa hipótese é fortalecida pela análise das enzimas do metabolismo de frutanos em plantas (Ritsema & Smeekens 2003), que mostrou que enzimas de uma espécie ou família que conferem diferentes tipos de reação, são algumas vezes mais relacionadas do que aquelas enzimas que catalisam a mesma reação, mas originadas de espécies ou famílias diferentes.

Tabela 1. Ocorrência natural de frutanos em seres vivos *.

Filo ou Divisão	Ocorrência de frutanos	Exemplos
Angiospermas	Seis ordens	Asterales, Poales
Gnetófitas	Ausente	-
Pinophyta	Ausente	-
Cycadophyta	Ausente	-
Lycopodiophyta	Ausente	-
Hepaticophyta	Classe principal	Jungermaniales
Bryophyta	Restrito a um gênero	<i>Sphagnum</i>
Algae	Duas ordens de algas verdes	Dasycladales e Cladophorales
Fungi	Raro	<i>Aspergillus</i>
Bacteria	Generalizado	<i>Streptococcus</i>

* (Adaptado de Hendry 1993)

Papel ecofisiológico dos frutanos

A principal função dos frutanos é a de composto de reserva, acumulados quando a capacidade fotossintética excede a demanda energética da planta e utilizados quando as condições ambientais desfavorecem a fotossíntese ou para garantir o crescimento heterotrófico durante a rebrota. No entanto, o fato de serem sintetizados principalmente por representantes de duas famílias mais derivadas, Asteraceae e Poaceae, com grande sucesso ecológico, grande número de espécies e ampla distribuição, sugere que esse tipo de carboidrato confere a elas algumas vantagens adaptativas (Hendry 1995).

Os frutanos diferem do amido em suas propriedades físicas, sítio de estocagem e em suas vias biossintéticas. São sintetizados a partir da sacarose e acumulados nos vacúolos, podendo alcançar níveis superiores a 70% de massa seca dos órgãos de reserva, impedindo a retroinibição da fotossíntese, sendo ainda, ao contrário do amido, solúveis em água (Vijn & Smeekens 1999).

Muitas foram as hipóteses para explicar o desenvolvimento dessa rota alternativa para estocagem de carbono. Foi proposto que os frutanos evoluíram como uma forma de proteção a baixas temperaturas nas angiospermas; no entanto essa afirmação é questionada uma vez que a flora produtora de frutanos não se limita às zonas temperadas. Com base na origem desta flora, poderíamos esperar que esse tipo de carboidrato de reserva estivesse associado à

maior sobrevivência das plantas em ambientes com menor disponibilidade hídrica (Hendry 1995).

De fato, estudos demonstram que os polímeros de frutose possuem um papel importante na resistência ao estresse produzido por baixas temperaturas (Livingston & Henson 1998, Kawakami *et al.* 2008) e déficit hídrico (Pilon-Smits *et al.* 1995, Garcia *et al.* 2011). A transformação de plantas de tabaco com genes para a síntese de frutanos tornou-as mais resistentes ao frio e ao déficit hídrico (Konstantinova *et al.* 2002, Pilon-Smits *et al.* 1999).

As vantagens conferidas pelos frutanos às plantas de ambientes sujeitos ao déficit hídrico e às baixas temperaturas foram avaliadas em diferentes espécies e diferentes mecanismos foram propostos para esta ação protetora. Inicialmente, foi proposto que por sua alta solubilidade em água os frutanos atuariam como crioprotetores, reduzindo a temperatura de congelamento do vacúolo e aumentando a resistência celular pela redução da taxa de desidratação pelo frio, ou pelo menos, conferindo tolerância às plantas sob baixas temperaturas (Pontis & Del Campillo 1985, Hendry 1987, Nelson & Spollen 1987). Isso devido ao fato de gramíneas perenes de regiões temperadas, que estão naturalmente expostas a períodos prolongados de baixas temperaturas, acumularem frutanos como carboidratos de reserva em seus tecidos vegetativos, bainha foliar, base de caule e até lamina foliar (Gallagher, *et al.* 2007). No entanto, para Hendry (1987), esse mecanismo de ação não é efetivo uma vez que sob as concentrações encontradas nas células essa redução seria inferior a 1°C.

Posteriormente, levando-se em conta que a dessecação é um componente importante do estresse por congelamento, foi proposto que os frutanos poderiam promover o ajuste osmótico celular através da variação do seu grau de polimerização (Santarius 1973, Spolen & Nelson 1994). Assim, a degradação de frutanos de cadeias longas promoveria o acúmulo de solutos com baixo peso molecular os quais contribuiriam para a redução do potencial osmótico e consequente manutenção da turgescência celular, permitindo aos tecidos acumuladores de frutanos reter água em situações que favoreçam a desidratação, como o déficit hídrico do solo ou o congelamento.

De Roover e colaboradores (1999) observaram que plântulas de *C. intybus* apresentaram um aumento de 10 vezes o teor de frutanos quando submetidas ao estresse hídrico. Em *Vernonia herbacea* a indução ao estresse hídrico produziu mudanças no metabolismo de frutanos como o aumento no conteúdo de frutose, sacarose e na razão oligo:polifrutanos, sendo essas mudanças associadas à manutenção da turgescência nos

rizóforos (Garcia *et al.* 2011). Baixas temperaturas também induzem alterações na razão oligo:polifrutanos, com diminuição do tamanho médio das cadeias de frutanos, o que permite o ajuste osmótico das células, promovendo a tolerância das plantas ao frio (Van den Ende & Van Laere 1996, Portes *et al.* 2008, Asega *et al.* 2011)

Alternativamente, os frutanos podem atuar na proteção da membrana plasmática em situação de seca ou frio. Nos casos de desidratação, a remoção das moléculas de água que promovem a manutenção do espaço entre os grupos lipídicos da membrana, permite uma aproximação das moléculas de lipídeos levando a um aumento na força de van der Waals e na temperatura de transição de fase da membrana, o que causa a mudança de fase líquido-cristalina para gel. Quando a membrana é reidratada, a temperatura de transição diminui e a membrana volta à fase líquida cristalina. Essa transição leva à formação de poros temporários, os quais permitem o extravasamento do conteúdo celular (Hinch *et al.* 2006).

Estudos demonstraram que os frutanos atuam na estabilização de membranas em condições de estresse. Vereyken e colaboradores (2001) revelaram que ambos, levano e inulina, interagiram com as membranas compostas de fosfolipídeos, protegendo-as durante condições de estresse. Foi demonstrado, ainda, que a bicamada lipídica torna-se menos permeável durante o congelamento e a desidratação quando os frutanos estão presentes (Hinch *et al.* 2000, Hinch *et al.* 2002). Desta forma, a célula não perde sua integridade devido ao aumento da permeabilidade e à perda da seletividade da membrana ocorridos durante o frio e a seca (Demel *et al.* 1998).

Estudos recentes sugerem outra função para os frutanos, a de atuarem como protetores contra o estresse oxidativo, causado por espécies reativas de oxigênio (Nishizawa *et al.* 2008, Stoyanova *et al.* 2011). Foi proposto um modelo no qual os frutanos, acumulados em grande quantidade no vacúolo, atuam neutralizando as espécies reativas de oxigênio, trabalhando em conjunto com compostos fenólicos vacuolares e com o mecanismo antioxidante do citoplasma (Peshev *et al.* 2013).

Entre as espécies reativas de oxigênio biologicamente relevantes (H_2O_2 , O_2^- e OH^-) os radicais hidroxila (OH^-) destacam-se como um dos mais perigosos (Keunem *et al.* 2013) por não possuírem um mecanismo enzimático de neutralização conhecido (Gechev *et al.* 2006). Em um estudo *in vitro*, comparando o poder de neutralização de OH^- mediado por diferentes compostos fenólicos e açúcares, a inulina se destacou por apresentar capacidade de sequestro de grupos OH^- superior aos demais açúcares testados e ligeiramente inferiores aos compostos fenólicos, sugerindo que os frutanos podem ter um papel importante no mecanismo antioxidante *in vivo* (Peshev *et al.* 2013).

Não existe um consenso sobre qual desses mecanismos atua de forma mais eficaz na proteção contra estresses ambientais, logo é possível que a vantagem adaptativa mediada pelos frutanos ocorra devido à interação dos fatores acima citados em proporções que podem variar entre as diferentes espécies.

Importância econômica dos frutanos

Além do seu papel ecológico relevante, os frutanos possuem importância econômica, relacionada principalmente aos benefícios que esses carboidratos trazem à saúde animal e humana, e devido à sua ampla gama de aplicações na indústria de alimentos.

Até pouco tempo atrás as pesquisas com alimentos visavam apenas a melhorar suas características organolépticas. No entanto, durante os últimos anos, novos conceitos em relação à ciência da nutrição se desenvolveram, entre eles o de que os alimentos possuem componentes que, além de exercerem suas funções de nutrientes, também desempenham funções fisiológicas benéficas à saúde (Lajolo 1998). A inulina, seja na forma de cadeias longas, seja na forma de fruto-oligossacarídeos (FOS), está inserida nesse contexto devido às suas características pré-bióticas.

No trato digestório, os frutanos não sofrem digestão enzimática e são fermentados pela microflora do colón promovendo, por exemplo, o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, que por competição inibem o desenvolvimento de bactérias patogênicas e promovem melhorias na função intestinal (Pak 2006).

Durante o processo fermentativo por esses microrganismos são produzidos ácidos graxos de cadeias curtas, lactato, biomassa bacteriana e gases. Essas substâncias atuam na modulação do metabolismo de lipídeos, diminuindo o colesterol e os triglicérides, na diminuição da pressão sanguínea e da glicemia, além de promoverem a fixação de minerais, principalmente cálcio, contribuindo assim para o controle da osteoporose (Capito & Filisetti 1999).

Portanto, atualmente, a inulina é muito usada na indústria de alimentos como aditivo alimentar (Capito & Filisetti 1999). Após a extração e secagem, esta se apresenta como um pó branco, amorfo, higroscópico, com odor e sabor neutros, podendo ser utilizada na forma de solução aquosa para promover um aumento da viscosidade da solução e formação de gel cremoso com textura semelhante à gordura (Niness 1999).

As diferenças no tamanho das cadeias mais longas de inulina e dos fruto-oligossacarídeos levam a diferentes aplicações tecnológicas. Dessa forma, a inulina é

utilizada na indústria como substituto de gorduras e fibras alimentares, sendo considerada fibra solúvel, enquanto os fruto-oligossacarídeos possuem aplicações industriais similares aos xaropes de frutose, sacarose ou glucose, sendo utilizados para espessar produtos lácteos, reduzir a perda natural de água em produtos de panificação, diminuir o ponto de congelamento de sobremesas congeladas, fornecer crocância a biscoitos de baixo teor de gordura e agir como um aglutinante em barras nutricionais de cereais (Haully & Moscatto 2002).

A inulina também pode ser utilizada na produção de xaropes de frutose, que em comparação com a sacarose tem maior poder edulcorante, é menos cariogênica, possui maior solubilidade em água e menor viscosidade. Além disso, níveis baixos desse carboidrato podem ser metabolizados sem a necessidade de insulina, o que a torna um adoçante alternativo para diabéticos (Kosaric 1984, Blakely *et al.* 1995).

Frutanos na flora brasileira

No Brasil, espécies que acumulam frutanos são amplamente distribuídas no bioma Cerrado. O Cerrado corresponde hoje a 21% do território brasileiro e é caracterizado por clima com sazonalidade hídrica bem definida, verão úmido e inverno seco, com até cinco meses de duração (Coutinho 2002). O inverno seco associado a baixas temperaturas e disponibilidade de nutrientes reduzida contribui para as baixas taxas de crescimento encontradas em plantas de Cerrado (Felippe & Dale 1990, Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1991, Carvalho *et al.* 1997).

Além das condições climáticas adversas, o Cerrado apresenta um solo profundo, poroso, permeável, constituído de uma mistura de areia e argila, em proporções diferentes, com baixa retenção de água, baixa capacidade de troca catiônica e pobre em nutrientes. O solo é ácido, o pH varia entre 4 e 5, devido em parte ao alto nível de Al^{3+} . Estas condições contribuem para formação de uma vegetação xeromórfica e rica (Eiten 1972).

A vegetação do cerrado apresenta um estrato arbóreo constituído por árvores e arbustos com troncos tortuosos, revestidos por casca espessa, com folhas coriáceas, duras e brilhantes ou revestidas por tricomas, e um estrato herbáceo, caracterizado por uma alta diversidade de espécies. Ambos os estratos são heliófilos, ou seja, se desenvolvem plenamente em condições de intensa luminosidade solar.

Entre as espécies do estrato herbáceo da vegetação do Cerrado, uma das estratégias empregadas para superar os extremos de temperatura, a seca e o estresse nutricional é a

presença marcante de órgãos subterrâneos espessados, que atravessam períodos de acúmulo de fotoassimilados durante o seu ciclo de desenvolvimento (Mantovani & Martins 1988). Esses órgãos subterrâneos são estruturas perenes que garantem não apenas a sobrevivência das plantas durante os períodos de condições ambientais adversas, mas também, em muitos casos, a reprodução vegetativa destas plantas (Coutinho 2002).

Em estudo realizado em uma área de cerrado na Estação Experimental e Reserva Biológica de Mogi Guaçu (SP), foi observada uma ampla distribuição de carboidratos solúveis em órgãos de reserva subterrâneos em espécies do extrato herbáceo, dentre essas, *Vernonia herbacea* e *V. discolor* que se destacaram por uma alta concentração de frutanos, cerca de 80% de massa seca (Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1986). Em um estudo posterior foram analisadas 35 espécies herbáceas da família Asteraceae e dessas, 60% apresentaram frutanos do tipo inulina nos órgãos de reserva (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993).

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby é uma espécie de Asteraceae com hábito perene, nativa do cerrado, que apresenta rizóforos como órgãos de reserva subterrâneos (Carvalho & Dietrich 1993). Adaptadas às condições do Cerrado, as plantas de *V. herbacea* apresentam um padrão de desenvolvimento sazonal que envolve brotação das gemas presentes nos rizóforos, na primavera, seguida de um período de crescimento rápido da parte aérea que continua durante o verão até o início do outono, quando o crescimento do caule cessa e tem início a senescência, seguida da abscisão da parte aérea e dormência da planta. Ao final do inverno, com a quebra da dormência, novas gemas brotam completando o ciclo fenológico da planta. Durante os diferentes estádios de desenvolvimento de *V. herbacea* foram observadas variações no conteúdo de frutanos que evidenciam o papel dos mesmos como um composto de reserva para a espécie (Carvalho & Dietrich 1993).

Segundo Sasaki e colaboradores (1999), a taxa de germinação de sementes de *V. herbacea* é baixa, sendo 11% para sementes recém-coletadas e 7% quando as sementes são armazenadas a 4°C. Apesar da baixa taxa de germinação, plantas de *V. herbacea* apresentam propagação vegetativa, por meio de seus rizóforos (Carvalho & Dietrich 1993).

O alto teor de frutanos possibilita a indicação desta espécie como uma alternativa para a produção comercial deste composto (Carvalho *et al.* 1998, Cuzzuol *et al.* 2008), obtido quase unicamente de raízes tuberosas da asterácea *Chicorium intybus* L. (Van den Ende *et al.* 2002).

A avaliação do desempenho agrícola em campo indicou que *V. herbacea* é pouco exigente em nutrientes e não responde favoravelmente à elevada adubação nitrogenada; resultados positivos foram obtidos com doses de 20 kg ha⁻¹ no plantio e de 6 a 12 kg ha⁻¹ em

cobertura (Cuzzuol *et al.* 2003). Esses resultados foram reforçados por estudos em que o tratamento com soluções nutritivas diluídas favoreceu o crescimento dos rizóforos e o acúmulo de frutanos, enquanto soluções mais concentradas favoreceram o desenvolvimento da parte aérea (Cuzzuol *et al.* 2005).

Cuzzuol e colaboradores (2008) cultivaram plantas de *V. herbacea* em soluções nutritivas por um período de 12 meses e posteriormente, dividiram as plantas em dois grupos, um controle, com a mesma solução (N-suficiente), e o outro, com uma solução limitada em nitrogênio (N-limitada), seguindo-se um cultivo por mais 6 meses. As plantas controle apresentaram alto crescimento vegetativo e baixo acúmulo de frutanos, enquanto nas plantas com fornecimento limitado de nitrogênio, o crescimento foi limitado e o teor de frutanos aumentou. Entretanto, os autores verificaram que, devido ao aumento da biomassa dos rizóforos nas plantas controle, a produção de frutanos por plantas foi superior neste tratamento.

Estudos sobre o metabolismo de frutanos em *V. herbacea* mostram a importância da inulina como composto de reserva nessa espécie. Asega & Carvalho (2004) observaram que após a desfolha induzida, ocorre aumento na atividade da enzima 1-FEH associado ao crescimento de novos ramos. Outro fator associado ao aumento da atividade da enzima 1-FEH com consequente alteração na razão oligo:polifrutanos é o estresse por baixa temperatura (Portes *et al.* 2008, Asega *et al.* 2011).

O conteúdo de frutanos e as atividades enzimáticas foram analisados ao longo do eixo longitudinal dos rizóforos de plantas de *V. herbacea* em diferentes fases fenológicas (Portes & Carvalho 2006), sendo verificada uma distribuição espaço-temporal com um gradiente decrescente de atividade biossintética a partir da região apical/distal para região basal/proximal do rizóforo durante a fase vegetativa e um gradiente crescente de atividade de despolimerização no sentido distal-proximal do rizóforo na fase de brotação. A atividade da 1-SST foi praticamente ausente nas fases de brotação e dormência, enquanto a atividade de 1-FEH ocorreu principalmente em plantas induzidas à brotação. A atividade de 1-FFT foi detectada em todas as fases fenológicas em toda a extensão dos rizóforos, com um padrão de distribuição espacial similar ao observado para a 1-SST. Com relação à 1-FEH foi verificado através de análise de *northern blot* que essa diferença espacial da atividade se deve a uma transcrição diferencial do gene ao longo do eixo do rizóforo (Asega *et al.* 2008).

O efeito de mudanças climáticas também foi avaliado em *V. herbacea*, tendo-se observado que concentrações elevadas de CO₂ promoveram um aumento nas taxas de fotossíntese e crescimento, levando a uma maior produtividade de frutanos, devida ao

aumento de biomassa aérea e subterrânea. Em condição de elevado CO₂, as plantas apresentaram maior atividade das enzimas de biossíntese e menor das enzimas de degradação de frutanos (Oliveira *et al.* 2010).

Cultivo *in vitro*

A cultura de tecidos refere-se ao desenvolvimento de órgãos, tecidos e/ou células isoladas do organismo. Trata-se de uma técnica amplamente utilizada na propagação clonal, em programas de melhoramento e no estudo dos metabolismos primário e secundário, por propiciar a manutenção das plantas em condições controladas.

A maioria das células vegetais possuem a capacidade de regenerar um organismo por inteiro. Esta capacidade é explorada no cultivo *in vitro* para formar gemas, raízes e embriões, e dessa forma, possibilitar avanços no conhecimento de diversos processos em fisiologia, bioquímica e genética de plantas (Torres *et al.* 1999). O crescimento e desenvolvimento das plantas são fundamentalmente controlados por substâncias reguladoras de crescimento. O estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro* é um processo empírico, em que são testadas diferentes fontes de explantes, composições minerais do meio de cultivo, açúcares, reguladores hormonais, além de diferentes condições de temperatura, fotoperíodo e luminosidade. No entanto, o conhecimento prévio da espécie em estudo e de suas respostas a esses fatores, pode ser utilizado para direcionar os estudos (Peres 2002). A escolha do tipo de explante é definida pelo tipo de cultura que se pretende iniciar, a finalidade dessa cultura e por características da espécie (George *et al.* 2008).

De acordo com Handro e Floh (1990), quando as células são liberadas do controle promovido pelo organismo íntegro e são expostas a uma nova condição, essas podem se desdiferenciar, retornar a condição embriogênica, sendo que seus genomas podem então ser expressos de outras formas, levando, por exemplo, ao desenvolvimento de novas estruturas.

A regeneração *in vitro* pode ocorrer pela embriogênese ou organogênese. Na embriogênese são formadas estruturas muito semelhantes aos embriões zigóticos a partir do explante (embriogênese direta) ou a partir de uma ou de um grupo destas em calos previamente formados (embriogênese indireta) (Handro & Floh 1990). A organogênese está relacionada à obtenção de eixos caulinares monopolares, provenientes de gemas pré-existentes ou neoformadas, podendo ser obtidas das formas direta e indireta (Guerra & Nodari 2006).

A formação de brotos e raízes em meio de cultura é controlada principalmente pelo balanço auxinas/citocininas no meio: um balanço favorável à auxina promove a formação de raízes enquanto o balanço favorável à citocinina induz à formação de gemas caulinares (Skoog & Miller 1957). Para Thorpe (1994), o sucesso da regeneração *in vitro* depende de vários fatores, como o genótipo, tipo, idade e tamanho dos explantes, composição do meio de cultura, condições de cultivo e dosagens de reguladores vegetais.

A presença de frutanos em tecidos vegetais regenerados *in vitro* já foi relatada para diversas espécies. Exemplos podem ser citados para as espécies de cerrado *Viguiera discolor* e *Gomphrena macrocephala*, acumuladoras de frutanos em suas raízes tuberosas. Em *V. discolor* o cultivo de segmentos nodais em meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962) com metade da concentração de macronutrientes e livre de reguladores, resultou em 50% de enraizamento. A incubação de nó caulinares em meio suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) resultou na regeneração de plantas com raízes não espessadas, enquanto a adição de 3 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) resultou na formação de calos friáveis. Inulina foi detectada nas raízes tuberosas regeneradas *in vitro*, mas em concentrações muito abaixo das encontradas em condições de campo (Itaya *et al.* 2005). Em calos de *Gomphrena macrocephala* os frutanos detectados foram na sua maioria de baixo peso molecular, enquanto no meio de cultura os frutanos com alto peso molecular liberados representaram 98% do total detectado. Além disso, curiosamente, os frutanos produzidos *in vitro* foram os da série da inulina em contraste com os da série dos fleanos, encontrados em raízes tuberosas de plantas *in vivo* (Vieira *et al.* 1995).

No cultivo *in vitro* de *H. tuberosus*, a produção de calos foi obtida com 1 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1 mg L⁻¹ de cinetina, enquanto 0,5 mg L⁻¹ ANA + 3 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), favoreceu a regeneração de brotos. No entanto, os autores não avaliaram a formação de frutanos durante o cultivo nessas condições (Taha *et al.* 2007).

A liberação de frutanos no meio de cultura em suspensões celulares foi reportada em *P. pratense*, e os frutanos detectados possuíam características semelhantes aos encontrados nos tecidos *in vivo* (Hale *et al.* 1987).

Por propiciar a manutenção de plantas, ou partes dessas, em situações distintas das encontradas no ambiente natural, o cultivo *in vitro* vem sendo utilizado no estudo do metabolismo de frutanos. Em *Agave tequilana* e *A. inaequidens*, o cultivo de plantas em meios de cultura suplementados com 8% de sacarose e diferentes reguladores vegetais (cinetina, ácido abscísico, metiljasmonato e ácido salicílico) estimulou a expressão dos genes

1-SST e 1-FFT, promovendo o acúmulo de frutanos (Suarez-González *et al.* 2013). Já Kusch *et al.* (2009), utilizando culturas de raízes de *C. intybus*, verificaram que um aumento na razão carbono/nitrogênio favoreceu a síntese de frutanos. Os autores também verificaram que a adição de inibidores da sinalização de Ca^{+2} , proteínas kinases e fosfatases ao meio de cultura, reprimiu a síntese de frutanos.

A literatura mostra que diversas espécies de Asteraceae são facilmente propagadas por meio do cultivo *in vitro* (Itaya *et al.* 2005, Kusch *et al.* 2009, Taha *et al.* 2007), sendo que para muitas a organogênese pode ser facilmente obtida com o cultivo de explantes foliares. Pode-se também verificar o potencial desta técnica em estudos com o objetivo de determinar os mecanismos envolvidos na regulação do metabolismo de frutanos.

As pesquisas realizadas com *V. herbacea* indicam o seu potencial como fonte produtora de frutanos e sugerem o seu cultivo, visando à preservação de recursos naturais e o uso sustentável de áreas de Cerrado (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro 2001). Entretanto faltam estudos de melhoramento genético e desempenho agrícola que deem suporte ao cultivo para utilização e aproveitamento econômico da espécie.

Considerando a importância ecológica e econômica dos frutanos, e o alto potencial de *V. herbacea* como opção para a obtenção desse carboidrato, torna-se importante o aperfeiçoamento de técnicas que auxiliem nos estudos do metabolismo de frutanos e que forneçam suporte para o melhoramento genético da espécie, visando à sua utilização como fonte comercial de frutanos do tipo inulina.



Figura 3. Aspecto geral de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby

2 OBJETIVO

Tendo em vista os elevados teores de frutanos em rizóforos de *Vernonia herbacea* e a importância ecológica e econômica desses carboidratos, o objetivo deste trabalho foi:

- estabelecer um protocolo eficiente para o cultivo *in vitro* em *Vernonia herbacea* e avaliar o potencial desta técnica na multiplicação da espécie,
- avaliar a ocorrência e a produção de frutanos em folhas, caules, raízes e rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* cultivadas *in vitro*,
- estudar o metabolismo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* cultivadas *in vitro* sob o efeito de diferentes fontes de carbono ou diferentes concentrações de sacarose.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo *in vitro* de *Vernonia herbacea*

Material vegetal

Aquênios e rizóforos foram coletados de plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu, SP (22° 18'S, 47° 11'W). Os aquênios foram utilizados nos experimentos de germinação *in vitro*. Os rizóforos foram utilizados na propagação vegetativa conforme Oliveira e colaboradores (2010) e as plantas matrizes obtidas foram plantadas em vasos de 3 L contendo mistura de solo de cerrado e composto orgânico 1:1 (v/v) e mantidas em casa de vegetação.

Para a assepsia, os aquênios foram desinfestados inicialmente por imersão em solução de etanol (70%) e, em seguida, em solução de hipoclorito de sódio, contendo 2,5% de cloro ativo, permanecendo sob agitação por 30 min, após o que foram lavados com água destilada estéril (3x), em condições assépticas. As folhas e rizóforos coletados de plantas matrizes foram lavados em água corrente por 30 min, seguido de imersão em etanol 70% e posterior transferência para solução de hipoclorito de sódio comercial, contendo 0,75% de cloro ativo. O material permaneceu sob agitação por 30 min sendo, em seguida, lavado com água destilada estéril (3x), em condições assépticas. A figura 4 apresenta um resumo esquemático dos diferentes tipos de explantes e experimentos realizados.

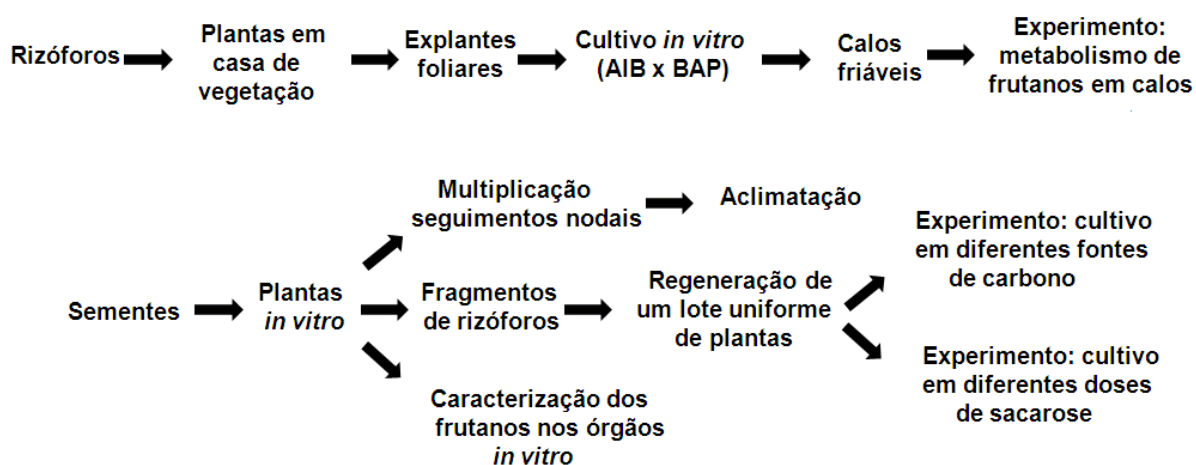


Figura 4. Representação esquemática dos diferentes tipos de explantes e tratamentos utilizados no estabelecimento do cultivo *in vitro* em *V. herbacea*.

Conteúdo e composição de frutanos em plantas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação

Além da germinação *in vitro* de aquênios, visou-se à quantificação e à caracterização dos carboidratos solúveis nas plantas obtidas e sua comparação com plantas mantidas em casa de vegetação. Para tanto, aquênios foram selecionados descartando-se aqueles com sementes mal formadas, escurecidas e predadas por insetos. Em seguida, foram desinfestados e incubados em placas de Petri contendo 30 mL de meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962) com metade das concentrações de macronutrientes, 3% de sacarose e 0,8% de agar, pH 5,8 a 25°C (± 3), em fotoperíodo de 14h ($22,5 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Após a germinação, as plântulas foram transferidas para frascos individuais de 350 mL, contendo 50 mL do mesmo meio de cultura e mantidas nas mesmas condições de incubação.

O teor de frutose total foi determinado em folhas, caules, raízes e rizóforos de plantas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação. As amostras de plantas cultivadas *in vitro* foram coletadas de plantas com 15 meses de cultivo e as amostras de casa de vegetação foram coletadas no mês de fevereiro, de plantas com 12 meses de cultivo e em pleno crescimento vegetativo, cultivadas em vasos de 3 L contendo solo de cerrado.

Enraizamento de segmentos nodais

O experimento visou à rápida multiplicação das plantas obtidas por germinação *in vitro*. Para tanto, segmentos nodais medindo 20 mm de comprimento e contendo uma folha e gema lateral, obtidos de plantas germinadas *in vitro*, foram inoculados individualmente em tubos de ensaio de 24 mm x 175 mm, contendo 10 mL do meio de cultura MS com metade das concentrações de macronutrientes, 3% de sacarose e 0,8% de agar, pH 5,8, suplementado com ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de 0; 0,05; 0,1 e 0,5 mg L⁻¹. O material foi incubado a 25°C (± 3), em fotoperíodo de 14h ($22,5 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 14 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio com um segmento nodal. A avaliação foi realizada após 60 dias, determinando-se o número de folhas formadas, comprimento da parte aérea, formação de calos e raízes.

Segmentos enraizados *in vitro* em meio livre de regulador foram cultivados por um período de 60 dias, em frascos de 350 mL contendo meio de cultura livre de reguladores, incubados a 25°C (± 3), em fotoperíodo de 14h ($22,5 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e em seguida, submetidos ao processo de aclimação para a condição *ex vitro*. Para tanto, 60 plantas foram

transferidas para vasos de 0,5 L contendo substrato autoclavado (Plantmax - hortaliças) em número de três por vaso e cobertas com saco plástico transparente. Os vasos foram mantidos à sombra e a retirada do plástico foi realizada gradualmente por um período de 30 dias, quando as plantas foram transferidas para casa de vegetação.

Regeneração e conteúdo de frutanos em calos

O experimento visou a avaliar o efeito de reguladores vegetais na regeneração *in vitro*. Discos foliares com 6 mm de diâmetro, obtidos de folhas de plantas matrizes cultivadas em casa de vegetação, foram incubados em placas de Petri contendo 30 mL do meio de cultura MS com metade das concentrações de macronutrientes, 3% de sacarose e 0,8% de agar, pH 5,8, suplementado com os reguladores vegetais 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB) conforme apresentado na tabela 2, e mantidos a 25°C (± 3), em fotoperíodo de 14h ($22,5 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 5 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri com 8 explantes. A avaliação do experimento foi realizada após 30 dias, determinando-se a massa e o número de explantes com formação de calos e órgãos. O teor de frutose total e a análise cromatográfica para a determinação dos perfis de frutanos foram realizados em duas linhagens de calos regenerados a partir de folhas cultivadas por 30 dias em meio suplementado com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB (linhagem friável) e 1 mg L^{-1} de BAP (linhagem compacta).

Tabela 2. Combinações dos reguladores vegetais 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido indolbutírico (AIB) (mg L^{-1}), utilizadas em experimentos de regeneração *in vitro*.

AIB \ BAP	BAP				
	0	0,25	0,5	1	2
0	0 + 0	0 + 0,25	0 + 0,5	0 + 1	0 + 2
0,05	0,05 + 0	0,05 + 0,25	0,05 + 0,5	0,05 + 1	0,05 + 2
0,1	0,1 + 0	0,1 + 0,25	0,1 + 0,5	0,1 + 1	0,1 + 2
0,5	0,5 + 0	0,5 + 0,25	0,5 + 0,5	0,5 + 1	0,5 + 2
1	1 + 0	1 + 0,25	1 + 0,5	1 + 1	1 + 2

O efeito de outros reguladores vegetais foi avaliado em folhas obtidas de plantas oriundas da germinação *in vitro*. Para tanto, fragmentos foliares foram incubados em placas

de Petri contendo 30 mL do meio de cultura MS com metade das concentrações de macronutrientes, 3% de sacarose e 0,8% de agar, pH 5,8, suplementado com 0; 0,5; 1; 2 e 5 mg L⁻¹ de thidiazurom (TDZ), cinetina (KIN) ou ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D), mantidos a 25°C (±3), em fotoperíodo de 14h (22,5 μmol foton m⁻² s⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 3 repetições, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri com 10 explantes. A avaliação do experimento foi realizada após 30 dias, determinando-se o número de explantes com formação de calos e órgãos.

3.2 Estudo do metabolismo de frutanos em calos

O experimento visou avaliar o potencial de calos friáveis de *V. herbacea* no estudo do metabolismo de frutanos.

Calos friáveis regenerados a partir de fragmentos foliares de *V. herbacea* foram cultivados em meio de cultura MS com metade das concentrações de macronutrientes, 3% de sacarose e 0,8% de agar, pH 5,8, suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de AIB. O material foi cultivado em placa de petri com 30 mL do meio de cultura e subcultivado a cada 30 dias por um período de 5 meses e posteriormente utilizado na instalação do experimento. Calos foram inoculados em frascos de 130 mL contendo 50 mL de meio de cultura acima descrito e cultivados por até 9 semanas. As condições de cultivo utilizadas foram temperatura média de 25°C (±3) e fotoperíodo de 14h (22,5 μmol foton m⁻² s⁻¹).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições por coleta, sendo cada repetição um frasco com 4 inóculos de calo com massa inicial de aproximadamente 0,3 g. As coletas do material foram realizadas com 0, 3, 5, 7 e 9 semanas de cultivo e o material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até a realização das extrações de carboidratos e enzimas.

A avaliação do experimento foi realizada por meio da determinação do conteúdo e composição de frutanos, e da atividade das enzimas 1-SST, 1-FFT e 1-FEH, detalhadamente descrito no item 3.5.

3.3 Isolamento de cDNAs de interesse em *Vernonia herbacea*

Material vegetal

Os rizóforos utilizados na extração de RNA total para o isolamento de genes de interesse foram retirados de plantas matrizes de *V. herbacea* em pleno crescimento vegetativo, cultivadas em vasos de 3 L contendo mistura de solo de cerrado e composto orgânico 1:1 (v/v) e mantidas em casa de vegetação.

Extração do RNA total

Para extração do RNA total, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, maceradas em almofariz para obtenção de pó fino na presença de N₂ líquido e armazenadas em freezer -80°C. Para cada 100 mg de amostra foi adicionado 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen), após o que a mistura foi agitada em vortex e incubada por 5 min a 30°C. Em seguida foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, seguido de agitação manual vigorosa por 15 s e incubação a 30°C por 5 min e, então, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 min a 4°C. A fase aquosa correspondente ao RNA foi coletada e transferida para outro tubo, ao qual se adicionou 0,5 mL de isopropanol, sendo a mistura agitada e incubada por no mínimo 15 min a 4°C, seguido de centrifugação a 12000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado, correspondente ao RNA, foi lavado com 1 mL de etanol 75% em água, agitado em vortex e centrifugado a 7500 x g por 5 min a 4°C, descartando-se o sobrenadante ao final do processo. O *pellet* foi deixado para secar e em seguida, foi resuspendido em 50 µL de água livre de RNA contendo 4 µL mL⁻¹ de inibidor de RNase (RNaseOUT, Invitrogen) e armazenado a -20°C.

As amostras de RNA total foram quantificadas em nanofotômetro (Implen) e a qualidade do RNA total foi avaliada por separação em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X a 2,8 V/cm. Apenas amostras de RNA total íntegro e com valor da razão de absorbância λ260/280 entre 1,8 e 2,0 foram selecionadas para utilização.

Construção de *primers*

Para isolar a sequência parcial dos genes que codificam as enzimas sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST) e frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT) e do fator de

alongamento 1-alpha (EF) em *V. herbacea*, foram realizados alinhamentos de sequências dos referidos genes isolados de outras espécies e cujas sequências se encontram depositadas no Genbank.

As espécies cujas sequências foram utilizadas no alinhamento foram: *Stevia rebaudiana* (AY157315.1), *H. annuus* x *Helianthus debilis* (AY094064.1), *Chrysanthemum seticuspe* f. *boreale* (AB679278.1), *Gerbera hybrid* (EU126916.1), *C. intybus* (AY378166.1), *Carthamus tinctorius* (HQ891310.1), *Ageratina adenophora* (EF413022.1) para o gene EF; *C. intybus* (JQ346799.1), *C. intybus* (U81520), *Taraxacum officinale* (AJ250634), *H. tuberosus* (AJ009757), *Agave tequilana* (DQ535031), *Allium cepa* (AJ006066), *Triticum aestivum* (AB029888), *Hordeum vulgare* (AJ567377), *Lolium perenne* (AY245431), para o gene 1-SST e *H. tuberosus* (AJ009756.1), *V. discolor* (AJ811625.1), *Cynara scolymus* (AJ000481.2), *Echinops ritro* (AJ811624.1), *Triticum aestivum* (AB088410.1), *Triticum aestivum* (AB088409.1) para o gene 1-FFT. Os códigos entre parênteses correspondem ao número de acesso das sequências no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Os alinhamentos foram obtidos através do programa Clustal X 2.07 (Larkin *et al.* 2007) para localização das regiões conservadas. As regiões conservadas foram, então, utilizadas para o desenho dos *primers* com auxílio do programa Primer 3 Plus (www.bioinformatics.nl). Os *primers* selecionados foram analisados quanto ao teor de CG (%), TM (°C), formação de grampios, homodímeros e heterodímeros, com o auxílio do programa Oligo Analyzer (www.idtdna.com), e a especificidade dos *primers* foi verificada através da ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Os *primers* selecionados (Tabela 3) foram utilizados para amplificação dos fragmentos desejados e posterior sequenciamento dos mesmos.

Tabela 3. *Primers* utilizados para amplificação de cDNA parcial e sequenciamento dos genes 1-SST, 1-FFT e EF de *Vernonia herbacea*.

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Fragmento (pb)	Temp. Melting (°C)
1-FFT	F 5-TGTTGGAYGAGCCGTTGCAYTC-3	561	68
	R 5-TTGCAACKATGTCCAAGTGYGTAG-3		64
1-SST	F 5-GACATGATCAACTGGTTCCATCTA-3	384	60
	R 5-ACACATTCCCACATACCAGTATG-3		59
EF	F 5-AACCACCGGTCCACTTGATCTAC-3	464	60
	R 5-ATGATGAACTTCCTTCACGATTT-3		60

Síntese do cDNA

Para obtenção do cDNA a ser utilizado na amplificação parcial dos genes de interesse, RNA total foi extraído de amostras de rizóforos, conforme descrito anteriormente. Para eliminar o DNA genômico contaminante, as amostras foram tratadas com a enzima DNase I, isenta de RNase (Fermentas). Seguindo as orientações do fabricante, em um tubo livre de RNase foram adicionados 1 µg de RNA total, 1 µl de 10x reaction buffer com MgCl₂, 1 µl de DNase I e o volume foi completado para 10 µl com água deionizada. A reação foi incubada a 37°C por 30 min. Para finalizar a reação, foi adicionado 1 µl de 50 mM EDTA seguido de incubação a 65°C por 10 min e armazenamento a -20 °C, até utilização.

A síntese do cDNA foi feita utilizando-se o kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), a partir de 1 µg de RNA total tratado com DNase. Seguindo as orientações do fabricante, em um tubo livre de RNase foram adicionados 1 µg de RNA, 1 µl oligo (dT)₁₈, 4 µl de 5x reaction buffer, 1 µl de Ribolock™ RNase Inhibitor, 2 µl de 10 mM dNTP Mix e 1 µl de RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase. A reação foi incubada a 42°C por 60 min, a 70°C por 5 min e, em seguida, o cDNA foi armazenado a -20°C.

Amplificação e isolamento dos fragmentos dos genes de interesse

O cDNA sintetizado foi amplificado por PCR, as reações foram realizadas utilizando os *primers* específicos (tabela 3) e o Kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), seguindo as orientações do fabricante e conduzidas em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorff). As reações foram conduzidas com o seguinte programa: 2 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 45 s a 94°C, 1 min a 58°C, e 1 min a 72°C e mais um ciclo de 1 min a 72°C.

Os fragmentos gerados foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE1X, e purificados com auxílio do kit “Quick gel extraction & PCR Purification COMBO Kit” (Invitrogen), seguindo-se as orientações do fabricante. Os fragmentos purificados foram quantificados em nanofotômetro (Implen) e utilizados na reação de sequenciamento.

Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o Kit “Big Dye Terminator v.3.1” (Applied Biosystems). Para tanto, em um tubo livre de contaminantes foram

adicionados 0,1 µg de DNA, 3 pmoles de *primer* (direto ou reverso), 3 µl de tampão de sequenciamento, 2 µl de Big Dye e o volume foi completado para 15 µl com água deionizada. A reação foi incubada por 2 min a 96°C, seguido de 35 ciclos de 45 s a 96°C, 30 s a 50°C, e 4 min a 60°C.

O DNA da reação foi precipitado em 25 µl de solução de precipitação (2750 µl de etanol 100%, 110 µl de solução 3 M NaAc pH 5.2, 110 µl de glicogênio 1 mg ml⁻¹), seguido de agitação e incubação em gelo por 15 min. Após centrifugação a 1500 x g por 30 min, o sobrenadante foi descartado e a seguir adicionou-se 50 µl de etanol 70% em água, gelado, seguindo-se nova centrifugação a 1500 x g por 30 min. O sobrenadante foi novamente descartado e os precipitados foram colocados para secar por 1 h em local protegido de luz. As amostras foram encaminhadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA – SSDNA do Instituto de Química da USP.

A especificidade das sequências obtidas foi verificada com o auxílio da ferramenta *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Alinhamento das sequências e análise filogenética

Para a análise filogenética das sequências de aminoácidos deduzidos dos genes *1-SST* e *1-FFT*, as mesmas foram comparadas com sequências de diferentes grupos obtidas no GenBank.

Foi utilizado um total de 32 sequências, sendo 13 sequências de sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (Vh.Sst: 1-Sst de *Vernonia herbacea*; Ci.Sst: 1-Sst de *C. intybus* -JQ346799.1; To.Sst: 1-Sst de *Taraxacum officinale* -AJ250634.1; Ht.Sst: 1-Sst de *H. tuberosus* -AJ009757.1; At.Sst(1): 1-Sst de *Agave tequilana* -DQ535031.1; Ac.Sst: 1-Sst de *Allium cepa* -AJ006066.1; Ta.Sst: 1-Sst de *Triticum aestivum* -AB029888.1; Hv.Sst: 1-Sst de *Hordeum vulgare* -AJ567377.2; Lp.Sst: 1-Sst de *Lolium perenne* -AY245431.1; Sc.Sst: 1-Sst de *Secale cereale* -JQ728010.1; Tt.Sst: 1-Sst de *Triticum turgidum* -EU981912.2; At.Sst(2): 1-Sst de *Aegilops tauschii* -FJ487950.1; Fa.Sst: 1-Sst de *Festuca arundinacea* -AJ297369.1), 11 sequências de frutano:frutano 1-frutossiltransferase (Vh.Fft: 1-Fft de *Vernonia herbacea*; Ht.Fft: 1-Fft de *H. tuberosus* -AJ009756.1; Vd.Fft: 1-Fft de *V. discolor* -AJ811625.1; Cc.Fft: 1-Fft de *Cynara cardunculus* -AJ000481.2; Er.Fft: 1-Fft de *Echinops ritro* -AJ811624.1; Ta.Fft: 1-Fft de *Triticum aestivum* -AB088410.1; As.Fft: 1-Fft de *Aegilops searsii* -EU981914.2; Tu.Fft: 1-Fft de *Triticum urartu* -EU981913.1; At.Fft: 1-Fft de *Agave tequilana* -EU026119.1; Bp.Fft: 1-Fft de *Bellis perennis* -AJ811697.1; Dp.Fft: 1-Fft de *Doronicum*

pardalianches -AJ811696.1), 6 sequências de 1- frutano–exohidrolase (Pp.Feh(1): 1-Feh de *Phleum pratense* -AB583555.1; Pp.Feh(2): 1-Feh de *Poa pratensis* -GU228510.1; Lc.Feh: 1-Feh de *Leymus chinensis* -FJ178114.1; As.Feh: 1-Feh de *Aegilops speltoides* -FJ184993.1; Ci.FEH: 1-Feh de *C. intybus* -AY323935.1; Vh.Feh: 1-Feh de *Vernonia herbacea* -AM231149.1) e duas sequências de invertases vacuolares (Ci.Inv: invertase vacuolar de *C. intybus* -AJ419971; Ta.Inv: invertase vacuolar de *Triticum aestivum* -AJ635225.1).

As sequencias parciais dos genes *1-SST* e *1-FFT* de *V. herbacea* foram traduzidas com a ferramenta de tradução disponível em (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/translate/>).

O alinhamento foi realizado através do programa CLUSTAL W (Jeanmougin, 1998). Como as sequencias de interesse eram apenas parciais, as regiões dos genes *1-SST* e *1-FFT* não alinhadas com os respectivos genes em *V. herbacea* foram excluídas e as sequencias foram alinhadas novamente.

A filogenia e as análises evolucionárias foram conduzidas utilizando-se o programa MEGA 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.* 2007). A filogenia foi estimada empregando as sequências proteicas alinhadas e utilizando o método de Neighbor-Joining com 1000 réplicas de bootstrap.

3.4 Estudo do metabolismo de frutanos em plantas cultivadas *in vitro*

Material vegetal

Para os experimentos foram utilizadas plantas com 5 meses de cultivo, obtidas a partir de brotações de segmentos de rizóforos, oriundos de plantas germinadas *in vitro*. O procedimento permitiu o estabelecimento de um lote de plantas com tamanho e desenvolvimento uniforme cultivado em meio de cultura MS com metade das concentrações de macronutrientes, 3% de sacarose e 0,8% de agar, pH 5,8. As condições de cultivo foram temperatura média de 25°C (± 3) e fotoperíodo de 14h (22,5 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

3.4.1 Efeito de diferentes fontes de carbono

As plantas foram transferidas e mantidas por 7 dias em meio de cultura MS com metade das concentrações de macronutrientes, sem adição de sacarose, 0,8% de agar, pH 5,8. Após esse período as plantas foram transferidas para o mesmo meio de cultura contendo 3% de sacarose, glucose ou frutose. O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso,

com 3 repetições, sendo cada repetição constituída por 1 frasco de 350 mL com 50 mL de meio de cultura e três plantas. As plantas foram coletadas aos 0, 1, 2 e 5 dias após a transferência para o meio contendo a fonte de carbono. Os materiais, rizóforos e parte aérea (folhas e caules), foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a realização das análises.

A avaliação do experimento foi realizada por determinação do conteúdo de frutose total, análise cromatográfica dos carboidratos solúveis, da atividade das enzimas 1-SST, 1-FFT e 1-FEH e expressão dos genes que codificam as referidas enzimas.

3.4.2 Efeito de diferentes concentrações de sacarose

As plantas foram cultivadas por 30 dias em meio de cultura MS com metade das concentrações de macronutrientes, 0,8% de agar, pH 5,8 e suplementado com diferentes concentrações de sacarose (0, 3, 6 ou 9%). O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, com 4 repetições, sendo cada repetição constituída por 3 plantas de um único frasco de 350 mL, contendo 50 mL do meio de cultura. Os materiais, rizóforos e parte aérea (folhas e caules), foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a realização das análises.

A avaliação do experimento foi realizada por meio da determinação do conteúdo de frutose total, análise cromatografia dos carboidratos solúveis e atividade das enzimas 1-SST, 1-FFT e 1-FEH. A caracterização do meio de cultura foi realizada através da determinação do potencial osmótico com Osmômetro de pressão de vapor (Modelo VAPRO 5520, Wescor). Os resultados foram obtidos em mmol Kg⁻¹ e transformados em Mega Pascal (MPa) utilizando a formula de Van't Hoff, $MPa = mmol\ kg^{-1} \times 2,5 \times 10^{-3}$ (Santa-Cruz *et al.* 2002).

3.5 Análise do metabolismo de frutanos

Extração e análise de carboidratos solúveis

As extrações de frutanos nas amostras foram realizadas em triplicata, conforme Carvalho e colaboradores (1998). As frações aquosas e etanólicas foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório, constituindo o extrato de carboidratos solúveis. O teor de frutose total, na forma livre e combinada, foi determinado colorimetricamente pelo método de antrona modificado para quantificação de cetoses (Jermyn 1956), sendo as dosagens realizadas em duplicatas, utilizando-se frutose (Sigma) (200 µg ml⁻¹) como padrão.

Amostras dos carboidratos solúveis foram neutralizadas em colunas de troca iônica, utilizando-se resinas Dowex na forma catiônica (50 x 8 - 200) e aniônica (1 x 8 - 200) e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução e detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex (modelo ICS 3000) e coluna CarboPac PA1 (4 X 250 mm) na concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em equivalentes de frutose. A eluição foi realizada utilizando-se o gradiente 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) como a seguir: 0 - 2 min, 25 mM; 2,1 - 8 min, 50 mM; 8,1 - 10 min, 75 mM; 10,1 - 28 min, 450 mM; 28,1 - 30, 500 mM; 30,1 - 40, 25mM. Os potenciais de PAD aplicados para E1 (0 - 0.4s), E2 (0.41 - 0.42s), E3 (0.43s) e E4 (0.44 - 1s) foram 0,1, -2,0, 0,6 e -0,1, respectivamente e o fluxo através da coluna foi de 0,25 mL min⁻¹.

Extração enzimática

As amostras foram submetidas à extração enzimática por homogeneização em tampão citrato-fosfato (McIlvaine) 50 mM pH 5,5, contendo 2 mM de EDTA, 5 mM de ácido ascórbico e 2 mM de β -mercaptoetanol, adicionando-se à amostra 10% de polivinil polipirrolidona (PVPP). Em seguida, as proteínas foram precipitadas com sulfato de amônio a 80% de saturação. Após centrifugação, os precipitados foram ressuspensos em tampão de extração na proporção de 150 μL por 100 mg de amostra e submetidos aos ensaios de atividade enzimática (Asega & Carvalho 2004). O conteúdo de proteína foi determinado conforme Bradford (1976), sendo as dosagens realizadas em triplicata, utilizando-se albumina de soro bovino como padrão (Sigma).

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 McIlvaine 50 mM, pH 4,5 (inulina) e pH 5,5 (sacarose e 1-cestose). Foram utilizados substratos nas concentrações de 400 mM de sacarose (Sigma) para a atividade de SST, 400 mM de 1-cestose para a atividade de 1-FFT e 10% de inulina extraída de *Vernonia herbacea* para a atividade de 1-FEH. As misturas de incubação foram mantidas em banho-maria a 30°C.

No experimento de calos, foi utilizado tempo de incubação de 6 h para a atividade da 1-SST, 1-FFT e 1-FEH. Para os experimentos com plantas *in vitro* foram utilizados tempos de

incubação de 4, 2 e 3 h para as atividades da 1-SST, 1-FFT e 1-FEH, respectivamente. Após a incubação, as misturas foram submetidas à fervura por 5 min para interrupção da reação. Alíquotas foram diluídas 5 vezes em água deionizada e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex (modelo ICS 3000) e coluna CarboPac PA1 (4 X 250 mm).

Para a análise da atividade da 1-FEH foi utilizado o mesmo gradiente de mistura descrito para as análises cromatográficas de carboidratos solúveis descrito acima. Para a atividade da 1-SST e 1-FFT, a eluição foi realizada utilizando-se um gradiente 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) como a seguir: 0 - 17 min, 15 mM; 17.1 - 21 min, 500 mM; 21.1 - 30 min, 15 mM. Os potenciais de PAD aplicados para E1 (0 - 0.4 s), E2 (0.41 - 0.42 s), E3 (0.43 s) e E4 (0.44 - 1 s) foram 0.1, -2.0, 0.6 e -0.1, respectivamente e o fluxo através da coluna foi de 0.25 mL min⁻¹. As atividades da 1-FEH, 1-SST e 1-FFT foram determinadas pelas áreas dos picos da frutose, 1-cestose e nistose respectivamente, utilizando-se padrões externos.

Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Construção dos primers para as análises de qRT-PCR

Para a obtenção de *primers* específicos para análise da expressão do gene *1-FEH* foi utilizada a sequência de cDNA de *V. herbacea* obtida por Asega e colaboradores (2008), disponível no NCBI (nº de acesso AM231149). Para o gene normalizador 18S (18S RNA ribossomal) foram desenhados *primers* na sequência de *C. intybus* (Maroufi *et al.* 2010) (nº de acesso U42501). Para os genes *1-FFT*, *1-SST* e para o normalizador *EF*, foram desenhados *primers* específicos nas sequências parciais desses genes, isoladas previamente neste trabalho.

A seleção dos *primers* foi realizada com o auxílio do programa Primer 3 Plus (www.bioinformatics.nl) e os *primers* selecionados foram analisados quanto ao teor de CG (%), T_m (°C), formação de grampos, homodímeros e heterodímeros com o auxílio do programa oligo analyzer (www.idtdna.com). A especificidade dos *primers* foi verificada por BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Os *primers* selecionados estão representados na tabela 4.

Tabela 4. Sequências de *primers* desenhados para utilização em experimentos de qRT-PCR

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Fragmento (pb)	Temp. Melting (°C)	Origem da sequência
<i>1-FEH</i>	F 5'-GGCGGATGTTACAATCTCGT-3'	199	60	Asega <i>et al</i> , 2008
	R 5'-GTTTTGGAACACCCGAAAGA-3'		60	
<i>18S RNA</i>	F 5'-GGCGACGCATCATTCAAAT-3'	102	62	Maroufi <i>et al</i> , 2010
	R 5'-TCCGGAATCGAACCCTAAT-3'		59	
<i>1-SST</i>	F 5'-CATGCTCTACACTGGCAACG-3'	163	61	Sequência de <i>V. herbacea</i>
	R 5'-TAGATGGGTCCCGAAAATCC-3'		60	
<i>EF</i>	F 5'-GCTCCTGGACATCGTGACTT-3'	163	60	Sequência de <i>V. herbacea</i>
	R 5'-GACCCCAAGAGTGAAAGCAA-3'		60	
<i>1-FFT</i>	F 5'-TGCGATTACGGAAGGTTCTT-3'	140	60	Sequência de <i>V. herbacea</i>
	R 5'-CAACATTATAGATTGTAGCCCATCC-3'		60	

Síntese de cDNA

O RNA total utilizado na análise foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen), conforme descrito anteriormente. Para eliminar o DNA genômico contaminante, 1,5 µg do RNA total foi tratado com a enzima DNase I, Amplification Grade (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. A mistura foi agitada e incubada por 15 min a 25°C, sendo em seguida adicionado EDTA 25 mM na proporção recomendada pelo fabricante e incubada por 10 min a 65°C.

A síntese do cDNA foi feita utilizando-se o kit SuperScript VILO cDNA Synthesis a partir de 1,27 µg de RNA total tratado com DNase (Invitrogen), com um volume final de 20 µL, seguindo as orientações do fabricante. A mistura foi agitada e incubada por 10 min a 25°C, 60 min a 42°C e 5 min a 85°C e o cDNA obtido foi armazenado a -20°C até sua utilização.

PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A análise da expressão gênica foi feita pela técnica de PCR quantitativo em tempo real, utilizando-se o kit EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen) em um termociclador Mastercycler® ep *realplex* 2S (Eppendorff), de acordo com as instruções do fabricante. O programa utilizado foi: 2 min a 50°C, 2 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de 15 s a 94°C, 1 min a 60°C. Para gerar a curva de *melting*, a temperatura foi aumentada gradativamente por 20 min, de 60 a 95°C.

A eficiência de amplificação dos pares de *primers* e as diluições de trabalho foram obtidas a partir de testes de diluição de um “pool” constituído por todas as amostras de cDNA (1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000) para os diferentes tecidos analisados.

Para as análises foram utilizadas duas amostras biológicas e quadruplicatas técnicas. Foram utilizadas diluições de 1/1000 do cDNA na reação de qRT-PCR com o gene *1-FEH* e de 1/100 para os genes *1-SST* e *1-FFT*. As amostras referentes a cada tratamento foram processadas na mesma corrida, sendo amplificadas em paralelo com o gene de interesse e o gene normalizador.

Os dados de CT de cada amostra, ou seja, o ciclo de amplificação onde o acúmulo de fluorescência na amostra atinge a linha de detecção arbitrária (threshold) foram obtidos, e os resultados foram coletados durante a fase exponencial da reação, momento no qual a emissão de fluorescência é proporcional ao número inicial de cópias do produto amplificado, ou concentração da amostra. Após a quantificação, a especificidade da reação foi avaliada através da curva de dissociação para verificar a qualidade do produto amplificado, sendo utilizados somente *primers* cujos produtos amplificados mostraram um único pico, claro e bem definido (figura 19). O software Realplex 2.2 (Eppendorf) foi utilizado para gerar a curva padrão de cada produto de amplificação, as curvas de dissociação e suas análises. Os valores de expressão relativa foram determinados conforme o método descrito por Pfaffl (2001) e a análise da estabilidade de expressão foi realizada com o programa BestKeeper (Pfaffl, 2004).

3.6 Análise estatística

Para a análise dos dados foi utilizada análise de variância utilizando o programa ESTAT - Sistema para análises estatísticas (V.2.0). Os contrastes entre as médias foram avaliados pelo teste de Tukey em nível de significância de 5 %. Os dados de contagem (experimento de regeneração) foram transformados com a fórmula $(x + 0,5)^{1/2}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo *in vitro* de *Vernonia herbacea*

O cultivo *in vitro* de *Vernonia herbacea* foi iniciado por meio da germinação de sementes em meio de cultura. A desinfestação com solução de cloro ativo a 2,5% foi eficiente para controlar a contaminação nos explantes. A porcentagem de germinação observada nas condições *in vitro* foi de 2,3%, ocorrendo entre 5 e 30 dias após a inoculação (figura 5A) e a taxa de contaminação foi de 1,6%. A incubação de sementes no escuro, a 30°C e em papel de filtro umedecido, não alterou a porcentagem de germinação (dados não mostrados).

A germinação foi baixa quando comparada com os dados de Sassaki *et al.* (1999) que relatam 11% para a mesma espécie. Segundo os autores, a baixa porcentagem de germinação deveu-se à presença de embriões não viáveis em 75% dos aquênios. Outras espécies de Asteraceae também apresentam produção abundante de sementes, porém muitas delas sem embrião. Exemplos destas são *Lessingianthus bardanoides*, *Chresta sphaerocephala* (Cury 2008) e *Eremanthus elaeagnus* (Velten & Garcia 2005), respectivamente com 54, 85 e 91% das sementes sem embriões. Em *Viguiera arenaria*, aquênios coletados em populações naturais e colocados para germinar *in vitro*, apresentaram de 12,3 a 63% de germinação, dependendo do lote coletado, sendo essa variação associada à presença de embriões viáveis nas sementes de 18,3 a 71,5%, respectivamente às taxas de germinação. Em *V. discolor*, a taxa de germinação *in vitro* de sementes coletadas em canteiros foi elevada (80%) (Itaya *et al.* 2005).

A baixa taxa de germinação *in vitro* de *V. herbacea* pode ser explicada pelo estresse sofrido no processo de desinfestação e pela baixa qualidade do lote devido a fatores ambientais, como o ataque de insetos, a proliferação de fungos e as intempéries climáticas, fatores que contribuem para a redução da viabilidade das sementes antes da coleta no campo. Segundo Baskin & Baskin (2001), a melhor época para a coleta de sementes é o início do período de dispersão, quando estas se encontram viáveis, mas ainda não foram expostas a fatores que reduzam sua viabilidade.

Plantas de *V. herbacea* obtidas pela germinação de sementes *in vitro* apresentaram crescimento lento em relação a plantas germinadas em substrato em casa de vegetação. Aos 15 dias após a germinação foi possível visualizar a formação de órgãos aéreos (figura 5B), aos 45, o alongamento dos entrenós (figura 5C) e aos 120, a formação de um sistema radicular sem rizóforos (figura 5D). Folhas e caules apresentaram área, espessura e diâmetro inferiores

aos observados em plantas crescidas em condições naturais. A formação de rizóforos ocorreu após 7 meses de cultivo, sendo que os mesmos eram pequenos e com crescimento limitado (figura 5E) quando comparados com rizóforos de plantas cultivadas em casa de vegetação, 3 meses após a germinação (figura 5F).

A formação de órgãos de reserva durante o cultivo *in vitro* depende de estímulos que variam entre diferentes espécies. Em *Allium cepa*, espécie que acumula frutanos no bulbo, a formação de bulbos foi estimulada com o enriquecimento da luz com vermelho longo e inibida com altas concentrações de sacarose no meio (Saos *et al.* 2002). Em batata, Koda & Okazawa (1983) observaram que a associação entre citocininas e altas doses de sacarose (8%) promoveram o crescimento de tubérculos em segmentos nodais cultivados *in vitro*. Já Lentini & Earle (1991) observaram que a variação das horas de luz afetou a taxa de formação de tubérculos de batata *in vitro*. Em *V. discolor*, a formação de raízes tuberosas acumuladoras de frutanos foi verificada em meio de cultura suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de ANA (Itaya *et al.* 2005).

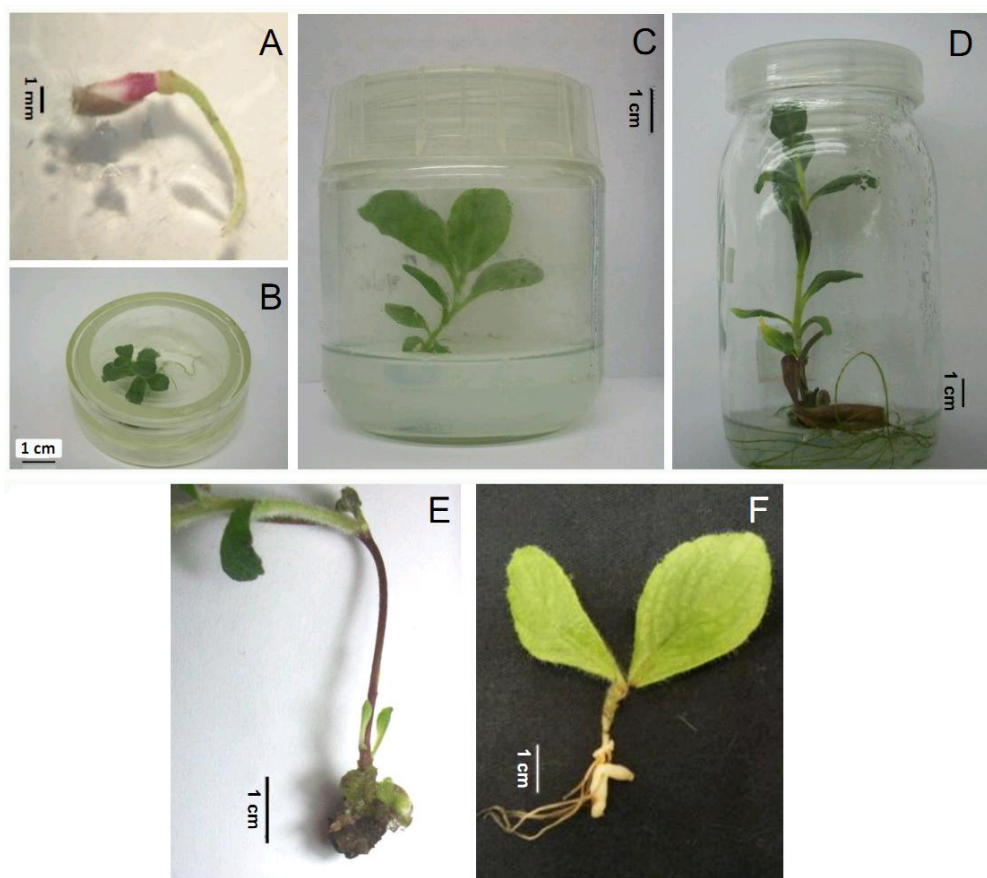


Figura 5. Etapas de germinação e crescimento *in vitro* de plantas de *V. herbacea*. A) aquênios após 2 dias de germinação, B) planta com 15 dias, C) planta com 45 dias, D) planta com 120 dias, E) planta com 210 dias de cultivo *in vitro* apresentando rizóforos, F) planta com rizóforos após 90 dias da germinação, cultivadas em casa de vegetação.

No presente trabalho, o conteúdo de frutanos foi analisado em folhas, caules, raízes e rizóforos de plantas cultivadas por 15 meses em condições *in vitro* e de plantas crescidas em casa de vegetação por 12 meses. A tabela 5 mostra que em todos os órgãos analisados foram observadas diferenças significativas no conteúdo de frutose total das plantas nos dois sistemas de cultivo. Folhas, caules e raízes cultivados *in vitro* apresentaram 58,8, 86,2 e 115,4 mg g⁻¹ de massa seca de frutose total, respectivamente, correspondendo a valores 5,7, 5,1 e 3,5 vezes maiores que os detectados em plantas cultivadas em casa de vegetação. Em rizóforos, verificou-se o inverso; o teor de frutose total em plantas cultivadas *in vitro* foi de 181,8 mg g⁻¹ de massa seca, valor 3,3 vezes inferior ao observado em plantas cultivadas em casa de vegetação.

Acúmulo inferior de frutanos em órgãos de reserva de plantas cultivadas *in vitro* foi também observado em *V. discolor*, em cujas raízes tuberosas, o teor de frutose total foi 7 vezes inferior ao observado em plantas cultivadas em condições naturais do Cerrado (Itaya *et al.* 2005). Em *Cichorium intybus*, os valores observados em raízes cultivadas *in vitro* foram de apenas 10% do observado em raízes tuberosas cultivadas em condições naturais (Kusch *et al.* 2009). Em *Gomphrena macrocephala* o cultivo em meio suplementado com ANA e BAP na razão 1:2 induziu o acúmulo de frutanos do tipo inulina, em contraste com os fleanos observados em raízes tuberosas de plantas em condições normais (Vieira *et al.* 1995).

Em plantas cultivadas *in vitro*, enquanto um baixo teor de frutanos foi observado nos rizóforos, conteúdos elevados foram detectados nos órgãos aéreos e raízes. Este resultado refletiu na razão do teor de frutose total da parte aérea/parte subterrânea, de 0,48 no cultivo *in vitro* e 0,04 em casa de vegetação, indicando claramente uma alteração no padrão de distribuição de carboidratos entre parte aérea e subterrânea durante o cultivo *in vitro*.

Tabela 5. Conteúdo de frutose total em plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro* por 15 meses e em casa de vegetação por 12 meses. Valores indicam a média de 3 repetições. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey, $P < 0,05$.

Órgãos analisados	Frutose total mg g ⁻¹ de massa seca	
	<i>In vitro</i>	Casa de Vegetação
Folha ⁽¹⁾	58,8 a	10,3 b
Caule ⁽²⁾	86,2 a	16,9 b
Raiz ⁽³⁾	115,4 a	32,3 b
Rizóforo ⁽⁴⁾	181,84 a	607,2 b
Razão parte aérea/subterrânea	0,48	0,04

(1) DP: 11,8 CV: 34,2. (2) DP: 28,4; CV: 55,0. (3) DP: 13,6; CV: 18,4; (4) DP: 8,5; CV: 2,1.

A análise do perfil cromatográfico dos carboidratos solúveis em diferentes órgãos de *V. herbacea* por HPAEC/PAD (figura 6) mostrou que, em folhas e caules, o cultivo *in vitro* promoveu o acúmulo da série homóloga da inulina, diferentemente do observado nos órgãos aéreos das plantas cultivadas em casa de vegetação, cujo perfil cromatográfico não mostra os picos característicos desta série e sim alguns picos não identificados nas folhas e nos caules, possivelmente da série da inulina.

Em geral não foram verificadas diferenças nos perfis cromatográficos de frutanos em rizóforos e raízes de plantas de ambos os sistemas de cultivo. No entanto, em raízes cultivadas em casa de vegetação observou-se uma maior proporção das hexoses glucose e frutose em relação aos componentes da série homóloga de inulina quando comparadas com plantas cultivadas *in vitro*. Essas alterações indicam uma mudança no padrão fonte/dreno nas plantas cultivadas *in vitro*. Em plantas sob condições de crescimento favoráveis os órgãos fonte, folhas adultas, por exemplo, são exportadores de carboidratos, os quais são importados por órgãos dreno como flores, folhas jovens, frutos, raízes e órgãos de reserva.

Esse sistema não é estático e o ciclo de vida da planta é marcado por mudanças na força e na direção do dreno nas diferentes partes das plantas. Em rizóforos de *V. herbacea*, a mudança temporária no caráter de órgão dreno para órgão fonte está associada a alterações nas atividades das enzimas 1-FEH e 1-SST. Quando o rizóforo atua como órgão dreno apresenta atividade elevada da 1-SST e baixa da 1-FEH e quando este atua como órgão fonte, o inverso é observado (Portes & Carvalho 2006).

O mecanismo envolvido na regulação da razão fonte/dreno é complexo e envolve a expressão de diferentes genes relacionados ao carregamento, descarregamento e

compartimentalização da sacarose (Roitsch & Ehneß 2000).

Os reguladores vegetais são capazes de influenciar o crescimento, a diferenciação e o desenvolvimento das plantas. Como esses fatores estão diretamente relacionados à partição de carboidratos nas plantas foi proposto que auxinas e citocininas devem atuar na regulação da razão fonte/dreno devido à sua influência na divisão e no alongamento celular (Hansen & Grossmann 2000).

De fato Xie e colaboradores (2004) reportaram a influência de reguladores vegetais aplicados exogenamente na translocação de carbono. Ehneß & Roitsch (1997) observaram que a aplicação de citocinina alterou a expressão de uma invertase extracelular e um transportador de hexoses, genes importantes no estabelecimento da razão fonte dreno.

O metabolismo de frutanos é considerado uma extensão do metabolismo da sacarose, contribuindo para a manutenção do dreno por meio da regulação da concentração de sacarose nos tecidos dreno onde ocorre a polimerização da mesma na forma de frutanos pelas frutossiltransferases no vacúolo (Vijn & Smeekens 1999).

Devido ao papel do metabolismo da sacarose e consequentemente dos frutanos no controle da razão fonte/dreno é de se esperar que reguladores vegetais que influenciam na partição do carbono apresentem efeitos reguladores da expressão dos genes do metabolismo de frutanos. De fato, em *A. tequilana*, o cultivo de plantas em meio de cultura suplementado com cinetina estimulou a expressão dos genes envolvidos na síntese de frutanos (Suárez-González *et al.* 2013).

Outro fator relacionado ao controle da razão fonte/dreno é a concentração de açúcares, que além do seu papel de substrato na sustentação do crescimento heterotrófico em tecidos drenos, possuem um importante papel na sinalização da regulação da razão fonte/dreno (Roitsch 1999). Particularmente, com relação a este papel sinalizador, diversos estudos evidenciam o efeito regulador de hexoses na atividade e expressão de genes relacionados ao metabolismo de frutanos (Koroleva *et al.* 2001, Kusch *et al.* 2009, Suárez-González *et al.* 2013).

A disponibilidade de hexoses em plantas é dependente da fotossíntese, que também é capaz de influenciar na razão fonte/dreno. Segundo Grout (1988), o cultivo *in vitro* proporciona baixas taxas de fotossíntese, o que altera as concentrações e a partição de carboidratos nas plantas.

No presente trabalho a germinação e cultivo *in vitro* de *V. herbacea* foi realizado sem a utilização de reguladores vegetais e a taxa fotossintética dessas plantas não foi avaliada. Entretanto, as condições de temperatura, luminosidade, composição atmosférica, nutrição e

suplementação de carbono no cultivo *in vitro* podem ter contribuído para alterar os níveis de reguladores vegetais nas plantas, afetando o seu desenvolvimento. Outro aspecto refere-se ao cultivo de plantas de *V. herbacea* em meio de cultura livre de fonte de carbono por um período de 30 dias, que, ao promover o consumo das reservas de carbono das plantas, conforme será mostrado mais adiante neste trabalho (tabela 14), indicou que nas condições de cultivo utilizadas, a fotossíntese foi limitada.

Alterações nas concentrações endógenas de hormônios vegetais associadas à redução na taxa fotossintética e ao fornecimento de carbono diretamente no sistema subterrâneo podem influenciar a expressão/atividade dos genes responsáveis pelo estabelecimento do dreno, como, por exemplo, os genes envolvidos no carregamento e descarregamento de sacarose nas células, e dos genes de compartimentalização (metabolismo de frutanos), promovendo as alterações observadas no padrão fonte/dreno de plantas cultivadas *in vitro*.

A avaliação dos teores endógenos de hormônios vegetais em plantas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação, o fornecimento de iluminação com diferentes comprimentos de onda e a suplementação de meio de cultura com reguladores vegetais e diferentes concentrações e fontes de carbono são estratégias experimentais que poderão ser utilizadas futuramente para auxiliar no melhor entendimento da influência do metabolismo de frutanos na regulação do padrão fonte/dreno nesta espécie.

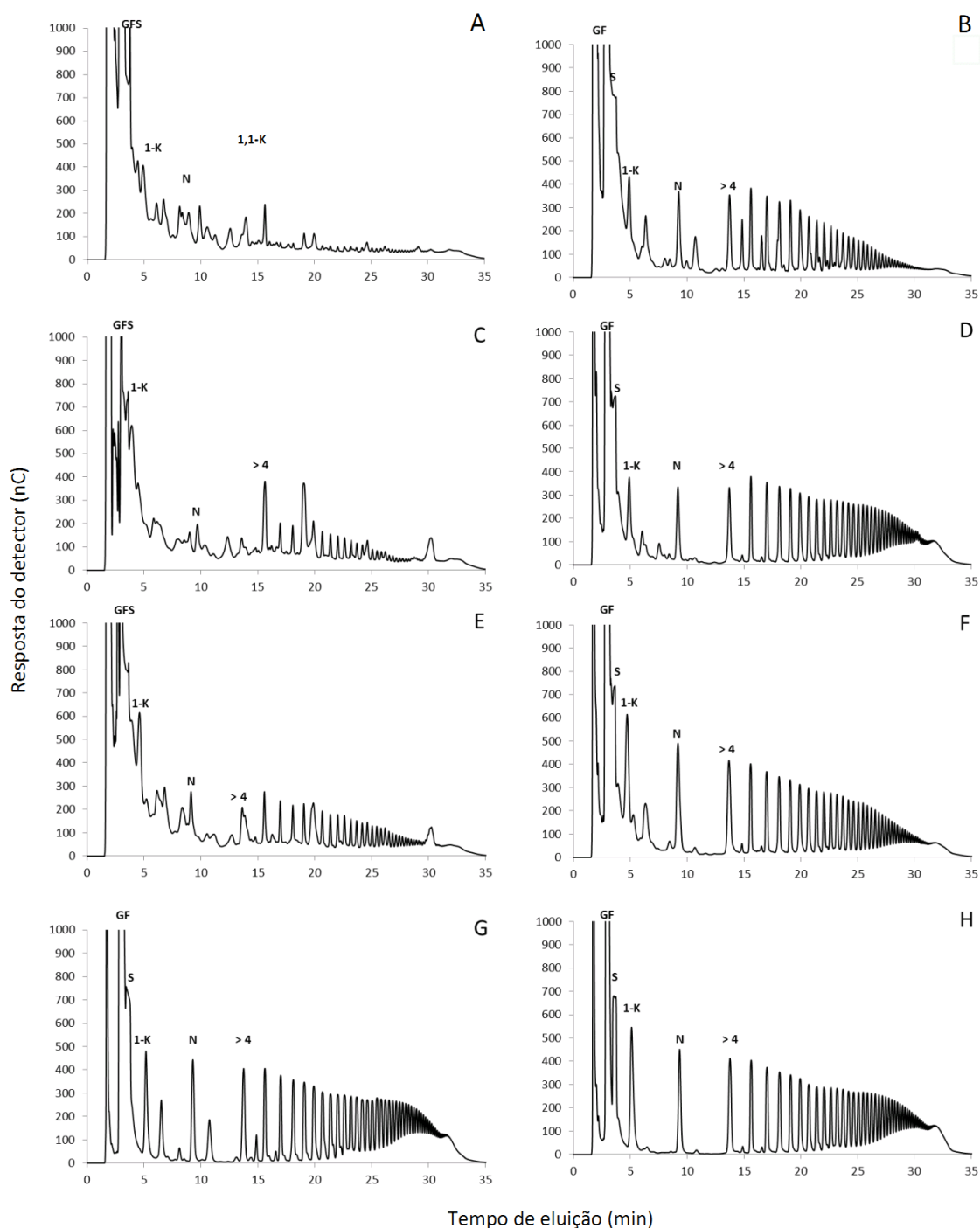


Figura 6. Perfis cromatográficos por HPAEC/PAD dos carboidratos solúveis de diferentes órgãos de *V. herbacea* cultivadas em casa de vegetação por 12 meses: A) Folha, C) Caule, E) Raiz e G) Rizóforo, e *in vitro* por 15 meses: B) Folha, D) Caule, F) Raiz e H) Rizóforo. G, F, S, 1-K, N e > 4 referem-se aos tempos de eluição de glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutanos com grau de polimerização maior do que 4, respectivamente.

Enraizamento de segmentos nodais

O enraizamento de segmentos caulinares com gema lateral, obtidos a partir de plantas de *V. herbacea* germinadas e cultivadas *in vitro*, foi avaliado quanto ao seu potencial de propagação da espécie.

A figura 7 mostra o efeito de diferentes concentrações de AIB no enraizamento de segmentos nodais após 60 dias de incubação. Apesar do AIB ter um papel conhecido na promoção do enraizamento *in vitro*, como observado em *Daphne sp* (Noshad *et al.* 2009), *Citrus limon* (Perez-Tornero *et al.* 2010), *Achillea oculta* (Grigoriadou *et al.* 2011), *Prunus sp* (Zhou *et al.* 2010), *Dorema ammoniacum* (Irvani *et al.* 2010) e *Gomphrena officinalis* (Mercier *et al.* 1992), em *V. herbacea* nas condições utilizadas, a adição de AIB não favoreceu o enraizamento (tabela 6). Na ausência de AIB, a parte aérea apresentou altura média de 63,5 cm e 28,5% de enraizamento. A adição de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB reduziu a porcentagem de enraizamento à metade, apresentou um efeito inibidor sobre o crescimento da parte aérea e promoveu o desenvolvimento de calos na parte basal do segmento nodal. Em dose mais elevada, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, o AIB inibiu totalmente o enraizamento, o crescimento da parte aérea e promoveu uma intensa proliferação de calos (figura 7).

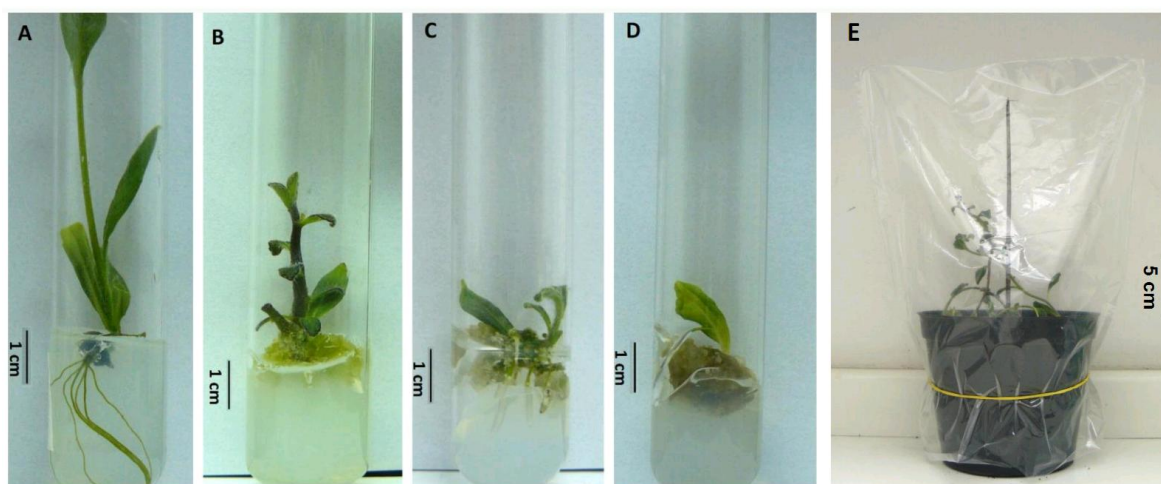


Figura 7. Segmentos nodais obtidos de plantas de *V. herbacea* germinadas *in vitro*, aos 60 dias de incubação em meio de cultura MS 1/2 macronutrientes + AIB. A) 0 mg L^{-1} . B) $0,05 \text{ mg L}^{-1}$. C) $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. D) $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. E) Plantas em processo de aclimação.

A formação de raízes adventícias é decorrente de eventos bioquímicos, fisiológicos e anatômicos regulados por hormônios vegetais. Auxinas são necessárias na fase inicial da

formação das raízes, mas podem inibir o crescimento e o desenvolvimento subsequente do primórdio radicular, enquanto a inibição do desenvolvimento causada por citocininas ocorre nos primeiros estádios do desenvolvimento radicular (De Klerk *et al.* 1990). Dessa forma, embora muitas vezes necessária para produzir o estímulo para o enraizamento, em alguns casos a auxina pode dificultar, ou mesmo, inviabilizar este processo.

Em *Gomphrena macrocephala*, a adição de AIB ao meio de cultura induziu a formação de raízes, mas estas apresentaram uma ligação frágil com o sistema vascular da estaca, não sustentando o processo de aclimação das plantas. Por outro lado na ausência de reguladores esse problema não foi observado (Moreira *et al.* 2000).

A multiplicação de plantas *in vitro* por enraizamento de segmentos nodais apresenta, em alguns casos, potencial para regenerar um grande número de plantas em um curto espaço de tempo. Neste processo a aclimação é uma fase crucial e normalmente constitui uma limitação em diversas espécies (Hazarika 2003).

Em *V. herbacea*, a aclimação das plantas obtidas a partir de segmentos nodais enraizados para as condições *ex vitro* foi realizada com um grupo de 60 plantas obtidas através do enraizamento em meio de cultura livre de AIB (figura 7E). A porcentagem de sobrevivência foi de 68,3 %, demonstrando que a aclimação de plantas cultivadas *in vitro* foi possível, permitindo o uso da técnica como forma de multiplicação de plantas desta espécie.

Tabela 6. Efeito de diferentes concentrações de AIB no desenvolvimento de segmentos nodais obtidos de plantas de *V. herbacea* germinadas *in vitro* aos 60 dias de cultivo. Dados representam a média ou a porcentagem de 14 repetições, sendo cada repetição constituída por um tubo de ensaio com um segmento nodal. Na coluna, as médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey, $P < 0,01$.

AIB (mg L ⁻¹)	Folhas ⁽¹⁾ (N°)	Altura ⁽²⁾ (cm)	Raiz ⁽³⁾ (N°) ¹	Calos (%)	Enraizamento (%)
0	7,8 a	63,5 a	1,7 a	7,4	28,5
0,05	7,0 a	21,2 b	0,3 ab	100	14,2
0,1	5,5 a	13,7 b	0,5 ab	100	14,2
0,5	0,4 b	0,8 b	0,0 b	100	0,0

(1) DP=3,4106; CV=68,21; (2) DP=26,379; CV=106,2; (3) DP=1,684; CV=262,05

Regeneração e conteúdo de frutanos em calos

Explantos foliares, derivados de plantas mantidas em casa de vegetação, foram cultivados em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de AIB e BAP. A análise dos dados apresentados na tabela 7 indica que na ausência de BAP, a suplementação com 0,05 e 0,1 mg L⁻¹ de AIB promoveu o desenvolvimento de raízes adventícias em 22,5% e 32,5% dos explantes cultivados, respectivamente, enquanto concentrações mais elevadas (0,5 e 1 mg L⁻¹ de AIB) promoveram o desenvolvimento de calos friáveis em 100% dos explantes. A suplementação do meio de cultura com 1 mg L⁻¹ de BAP promoveu o desenvolvimento de calos compactos em 70% dos explantes (figura 8).

Nas condições experimentais utilizadas, os reguladores vegetais não promoveram o desenvolvimento de brotos ou embriões somáticos, sendo que BAP apresentou um efeito inibidor na produção de calos friáveis mediada pelo AIB e sua combinação com doses de AIB acima de 0,5 mg L⁻¹ favoreceu a oxidação. Os calos friáveis obtidos apresentaram um alto potencial de crescimento (3,5 g placa⁻¹ de massa fresca) e mantiveram-se friáveis mesmo quando transferidos para meio de cultivo livre de reguladores por um período de 30 dias (dados não mostrados).

A análise quantitativa e qualitativa de frutanos nos calos foi realizada visando a caracterizar o material vegetal obtido pelo cultivo *in vitro*. Para tanto, amostras de calos das linhagens compacta (1 mg L⁻¹ de BAP) e friável (0,5 mg L⁻¹ de AIB), obtidas após 30 dias de cultivo de explantes foliares, foram avaliadas e os conteúdos de carboidratos solúveis são apresentados na tabela 8. Calos da linhagem friável apresentaram teores de frutose total de 152,2 mg g⁻¹ de massa seca, enquanto os calos da linhagem compacta apresentaram 280,6 mg g⁻¹ de massa seca. Ambos os valores foram inferiores aos 607,2 mg g⁻¹ de massa seca detectados em rizóforos de plantas em fase de crescimento vegetativo.

A análise qualitativa revelou a presença da série homóloga de inulina em ambas as linhagens, no entanto, nos calos compactos foram encontrados frutanos com GP 3-27 em uma proporção elevada em relação à glucose, frutose e sacarose quando comparado com a linhagem friável, na qual apenas traços de frutanos com GP entre 3-17 foram identificados (figura 9).

Como a única diferença nas condições de cultivo das duas linhagens foi o tipo de regulador vegetal utilizado, o resultado sugere que o balanço auxina/citocinina é relevante na regulação do metabolismo de frutanos nesses calos, sendo que a auxina inibiu a síntese destes compostos, enquanto, a citocinina favoreceu.

Essa influência de reguladores de crescimento no metabolismo de frutanos foi demonstrada em estudos com *Symphytum officinale*, na qual, uma linhagem de calos não acumuladora de frutanos, a adição ao meio das citocininas BAP ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$) e zeatina (1 mg L^{-1}) promoveu o acúmulo de frutanos entre 4,9 e 10% de massa seca, respectivamente, enquanto a adição das auxinas ANA ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$) e AIA ($0,8 \text{ mg L}^{-1}$) levou a teores inferiores de frutanos, 0,4 a 3 % de massa seca, respectivamente (HaaB *et al.* 1991).

Em *Helianthus tuberosus* foi observada a influência de reguladores vegetais na atividade da 1-FEH em calos. Foram testadas duas combinações de reguladores no meio de cultura. A combinação cinetina (1 mg L^{-1}) + 2,4-D (1 mg L^{-1}) promoveu maior atividade enzimática quando comparada aos reguladores isolados ou juntos em doses maiores, já BAP + ANA estimularam a atividade enzimática quando combinados em doses a partir de 1 mg L^{-1} de cada regulador (Taha *et al.* 2007).

Suárez-González e colaboradores (2013), trabalhando com plantas de *Agave tequilana* e *A. inaequidens* cultivadas *in vitro*, verificaram que a cinetina promoveu a expressão dos genes ligados à síntese de frutanos em *A. tequilana*, enquanto que *A. inaequidens* essa promoção foi mediada por metil jasmonato, regulador envolvido em diversos processos fisiológicos como inibição do crescimento de raízes e caules, redução da expressão de genes relacionados à fotossíntese, estímulo à formação de tubérculos, entre outros (Kerbaudy 2008).

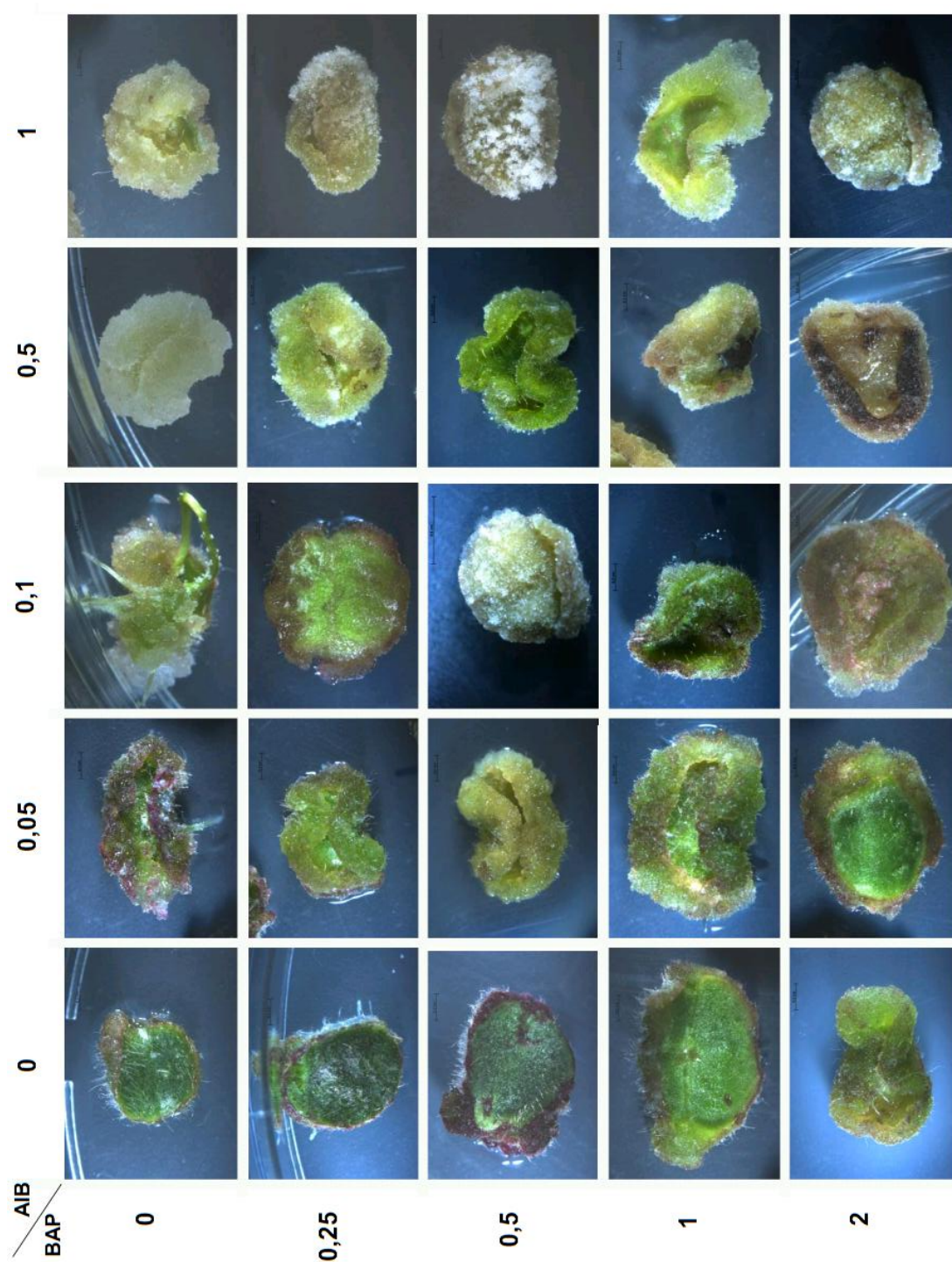


Figura 8. Cultivo *in vitro* de discos foliares de *V. herbacea* cultivadas em casa de vegetação, incubados em meio de cultura MS com metade da concentração de macronutrientes suplementado com BAP ou AIB (mg L^{-1}) e cultivados por 30 dias.

Tabela 7. Cultivo *in vitro* de explantes foliares obtidos de plantas de *V. herbacea* cultivadas em casa de vegetação, incubados em meio de cultura suplementado com BAP ou AIB. Cada repetição foi constituída de uma placa de Petri com 8 discos foliares ($n=5$). Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey, $P < 0,05$.

<u>Reguladores de crescimento (mg L^{-1})</u>		Calos Friáveis (1)	Calos Compactos (2)	Raízes (3)
BAP	AIB	NER	NER	NER
0	0	0 b	0 b	0 b
0	0,05	0 b	7,6 a	1,8 a
0	0,1	0 b	6 a	2,6 a
0	0,5	8 a	0 b	0,4 b
0	1	8 a	0 b	0 b
0,25	0	0 b	5,2 a	0 b
0,25	0,05	0 b	7,4 a	0 b
0,25	0,1	0 b	8 a	0 b
0,25	0,5	0 b	8 a	0 b
0,25	1	1,4 b	6,6 a	0 b
0,5	0	0 b	5,4 a	0 b
0,5	0,05	0 b	8 a	0 b
0,5	0,1	0 b	7,6 a	0 b
0,5	0,5	0 b	8 a	0 b
0,5	1	0 b	8 a	0 b
1	0	0 b	5,6 a	0 b
1	0,05	0 b	8 a	0 b
1	0,1	0 b	8 a	0 b
1	0,5	0 b	8 a	0 b
1	1	0 b	8 a	0 b
2	0	0 b	7,4 a	0 b
2	0,05	0 b	8 a	0 b
2	0,1	0 b	8 a	0 b
2	0,5	0 b	8 a	0 b
2	1	0 b	7,8 a	0 b

(1) DP= 0,2; CV= 20,2. (2) DP= 0,2; CV= 10,6. (3) DP= 0,2; CV= 28,3. NER- número de explantes responsivos. Dados originais foram transformados usando $(x+0,5)^{1/2}$.

Tabela 8. Conteúdo de frutose total em calos obtidos a partir de explantes foliares de *V. herbacea* cultivados *in vitro* por 30 dias. Os valores indicam a média de 3 repetições. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey, $P < 0,05$.

Linhagem	Frutose total	
	mg g ⁻¹ de massa seca (1)	mg g ⁻¹ de massa fresca (2)
Compacta	280,65 a	36,90 a
Friável	152,25 b	9,38 b

(1) DP: 18,8; CV: 8,6; (2) DP: 8,6; CV: 18,8.

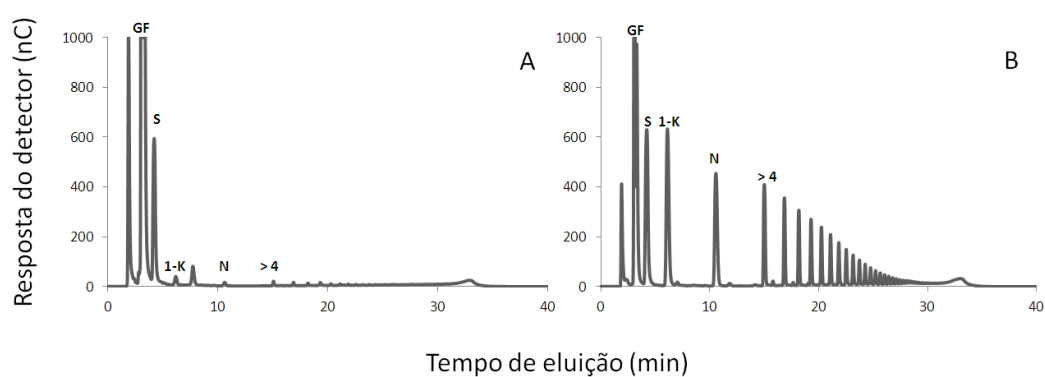


Figura 9. Perfis cromatográficos por HPAEC/PAD dos carboidratos solúveis em calos de *V. herbacea*: A) Calos friáveis; B) Calos compactos, cultivados *in vitro* por 30 dias. G, F, S, 1-K, N e >4 referem-se aos tempos de eluição de glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutanos com grau de polimerização maior do que 4, respectivamente.

Devido à alta taxa de contaminação observada na introdução ao cultivo *in vitro* de explantes foliares oriundos de plantas cultivadas em casa de vegetação, optou-se por utilizar explantes foliares oriundos de plantas cultivadas *in vitro*.

A tabela 9 apresenta os resultados do experimento de morfogênese realizado com explantes foliares derivados do cultivo *in vitro* por 30 dias. Os resultados indicam que a adição de cinetina ao meio de cultura nas doses de 1, 2 e 5 mg L⁻¹ e TDZ nas doses de 0,5, 1, 2 e 5 mg L⁻¹ estimularam apenas o desenvolvimento de calos compactos, enquanto 2,4-D nas doses de 0,5 e 1 mg L⁻¹ estimulou o desenvolvimento de calos friáveis (figura 10).

Em *V. herbacea*, nas condições experimentais utilizadas, observou-se o desenvolvimento de raízes, calos compactos e calos friáveis. Entretanto, não foi possível a regeneração de plantas inteiras regeneradas a partir do desenvolvimento de brotos ou embriões. Esses resultados diferem dos observados em outras espécies de Asteraceae ou

outras espécies acumuladoras de frutanos para as quais essa regeneração foi obtida facilmente. Em *Viguiera arenaria*, por exemplo, a formação de brotos em folhas foi observada com a suplementação do meio de cultura com 0,01 mg L⁻¹ de ANA e 0,2 mg L⁻¹ de BAP (Lucena 2010), em *C. intybus* (chicória), ocorreu uma intensa proliferação de brotos com a adição de cinetina e ácido indol-3-acético ao meio de cultura (Rehman *et al.* 2003) e em *Helianthus tuberosus*, a adição de BAP ao meio induziu a formação de gemas adventícias em explantes foliares (Taha *et al.* 2007). Na Amaranthaceae *Gomphrena officinalis*, gemas adventícias foram regeneradas em explantes caulinares com a adição de 5 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA (Mercier *et al.* 1992).

Os resultados negativos referentes à regeneração de brotos/embriões sugerem um grau de recalcitrância da espécie, de modo que novos testes como, aumento da concentração de sacarose no meio, aumento do fotoperíodo, alteração da qualidade da luz associados a diferentes reguladores vegetais, ou às diferentes proporções entre estes, devem ser realizados para se determinar as condições favoráveis ao desenvolvimento de brotos/embriões e a regeneração de plantas inteiras no cultivo *in vitro* em *V. herbacea*.

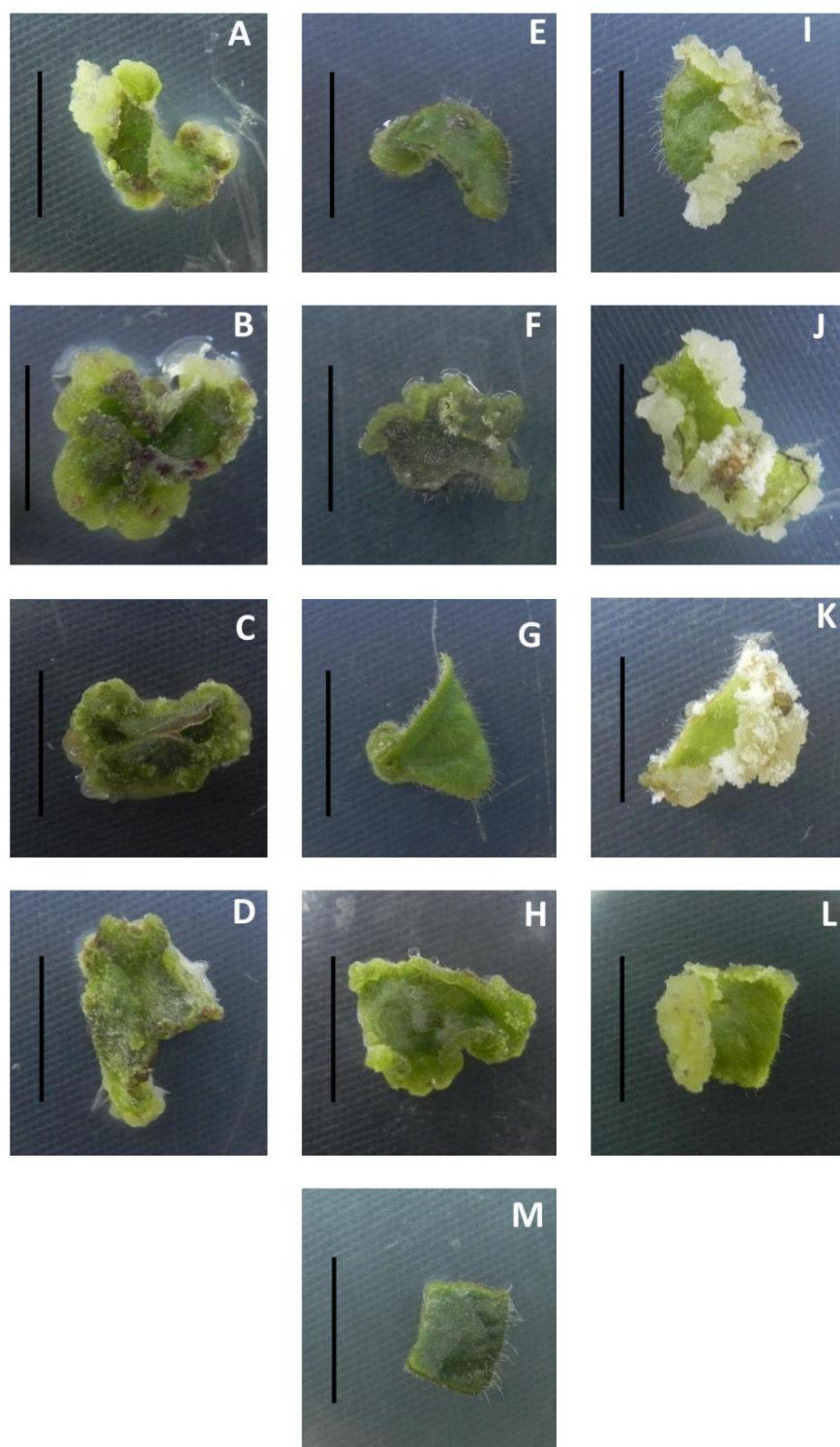


Figura 10. Calos obtidos por cultivo *in vitro* de explantes foliares, obtidos de plantas de *V. herbacea*, germinadas *in vitro*, cultivados em meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ Macronutrientes + TDZ, KIN e 2,4-D após 30 dias de cultivo. TDZ A) 0,5 mg L⁻¹, B) 1 mg L⁻¹, C) 2 mg L⁻¹, D) 5 mg L⁻¹; KIN E) 0,5 mg L⁻¹, F) 1 mg L⁻¹, G) 2 mg L⁻¹, H) 5 mg L⁻¹; 2,4-D I) 0,5 mg L⁻¹, J) 1 mg L⁻¹, K) 2 mg L⁻¹, L) 5 mg L⁻¹ e M) Controle sem regulador. (Barra= 1 cm)

Tabela 9. Cultivo *in vitro* de explantes foliares, obtidos de plantas de *V. herbacea*, germinadas *in vitro*, incubados em meio de cultura MS ½ Macronutrientes + TDZ, KIN e 2,4-D após 30 dias de cultivo. Cada repetição foi constituída de uma placa de Petri com 10 fragmentos foliares (n=3). Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey, $P < 0,05$.

		Calos		
Reguladores		Friaveis (1)	Compactos (2)	Raizes
(mg L ⁻¹)		NER (%)	NER (%)	NER (%)
Controle	0	0 (0) a	0 (0) a	0 (0) a
KIN	0,5	0 (0) a	0 (0) a	0 (0) a
	1	0 (0) a	4,6 (46) b	0 (0) a
	2	0 (0) a	3,3 (33) b	0 (0) a
	5	0 (0) a	6,3 (63) bc	0 (0) a
	0,5	0 (0) a	10 (100) c	0 (0) a
TDZ	1	0 (0) a	9,3 (93) c	0 (0) a
	2	0 (0) a	9,3 (93) c	0 (0) a
	5	0 (0) a	8,6 (86) c	0 (0) a
	0,5	5,6 (56) bc	0 (0) a	0 (0) a
2,4-D	1	10 (10) b	0 (0) a	0 (0) a
	2	6,6 (66) c	0 (0) a	0 (0) a
	5	1,3 (13) d	0 (0) a	0 (0) a

(1) DP= 0,187; CV= 14,78. (2) DP= 0,293; CV= 26,27. NER- número de explantes responsivos.
 Dados originais foram transformados usando $(x+ 0,5)^{1/2}$.

4.2 Estudo do metabolismo de frutanos em calos

O cultivo de calos representa um grande potencial como ferramenta para o estudo do metabolismo em plantas. No presente estudo, visou-se à avaliação do potencial da utilização de uma linhagem de calos friáveis de *V. herbacea* no estudo do metabolismo de frutanos.

A figura 11 mostra inóculos de calos friáveis no momento da instalação do experimento. Durante o período de cultivo o material apresentou um incremento de massa mais intenso entre 7 e 9 semanas de cultivo (tabela 10), o crescimento não interferiu no teor de frutose total (tabela 11) e o valor médio detectado em calos de *V. herbacea* foi de 222,15 mg g⁻¹ de massa seca (10,3 mg g⁻¹ de massa fresca), conteúdo inferior ao encontrado em rizóforos de plantas cultivadas em casa de vegetação, 607,2 mg g⁻¹ massa seca.

Apesar da análise quantitativa indicar valores significantes de frutose total nos calos, a análise cromatográfica não detectou a presença da série homologa da inulina nos calos friáveis obtidos de folhas de *V. herbacea*, e nem foram observadas diferenças nos perfis cromatográficos ao longo do período de cultivo. Foram detectados apenas glucose, frutose, sacarose e uma baixa proporção do trissacarídeo 1-cestose (figura 12) e a frutose detectada quantitativamente foi devida, principalmente, à frutose livre e à da sacarose.

A ausência de frutanos na linhagem de calos friáveis de *V. herbacea* após 5 meses de cultivo, utilizada neste experimento, difere do observado em calos recém-obtidos com apenas 30 dias de cultivo *in vitro* (figura 9) nos quais traços da série homologa da inulina foram identificados, possivelmente derivados do explante foliar utilizado. Difere também do observado em outras espécies acumuladoras de frutanos, como *V. discolor*, na qual os reguladores vegetais ANA e 2,4-D promoveram a síntese de frutanos em calos (Itaya *et al.* 2005), *Symphytum officinale*, na qual a zeatina promoveu em calos o acúmulo de 10% de massa seca em frutanos (Haab *et al.* 1991) e *Smallanthus sonchifolius* tratados com ANA e BAP (Oliveira *et al.* 2009), em que o acúmulo de frutanos em calos também foi observado.

Tabela 10. Produção de massa fresca e seca (g) em calos friáveis derivados de explantes foliares de *V. herbacea* cultivados em meio de cultura + 0,5 mg L de AIB, durante 9 semanas. Os valores representam a média de 3 repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco com 4 inóculos de calo com massa inicial de 0,3 g. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey, $P < 0,01$.

Tempo de cultivo (semanas)	Massa fresca (1)	Massa seca (2)
0	0,3309 a	0,0176 a
3	0,8498 a	0,0369 a
5	1,0176 a	0,0503 a
7	1,7622 a	0,0785 a
9	5,0289 b	0,2275 b

(1) DP= 0,5; CV= 29,7. (2) DP= 0,02; CV= 29,5.

Tabela 11. Conteúdo de frutose total em calos friáveis derivados de explantes foliares de *V. herbacea* cultivados em meio de cultura + 0,5 mg L de AIB, durante 9 semanas. Os valores representam a média de 3 repetições, sendo cada repetição constituída de um frasco com 4 inóculos de calo com massa inicial de aproximadamente 0,3 g. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, $P < 0,01$.

Semanas	mg g ⁻¹ de massa fresca (1)	mg g ⁻¹ de massa seca (2)
0	11,01 a	214,01 a
3	9,57 a	220,48 a
5	9,89 a	204,61 a
7	9,62 a	216,10 a
9	11,53 a	255,58 a
Média	10,32	222,15

(1) DP= 1,2; CV= 11,5. (2) DP= 27,0; CV = 12,5.

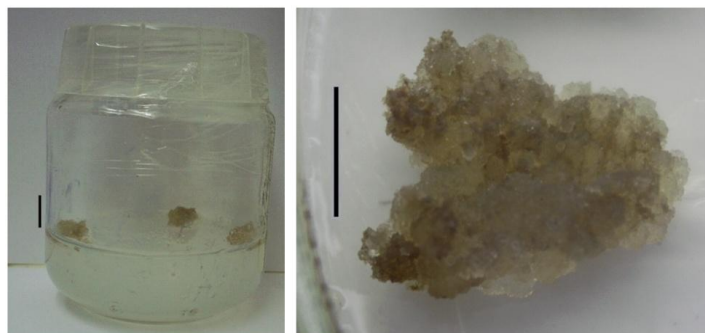


Figura 11. Calos de *V. herbacea* da linhagem friável, derivada de explantes foliares obtidos de plantas cultivadas em casa de vegetação. Cultivados em meio de cultura MS ½ macronutrientes suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de AIB. (Barra= 1 cm)

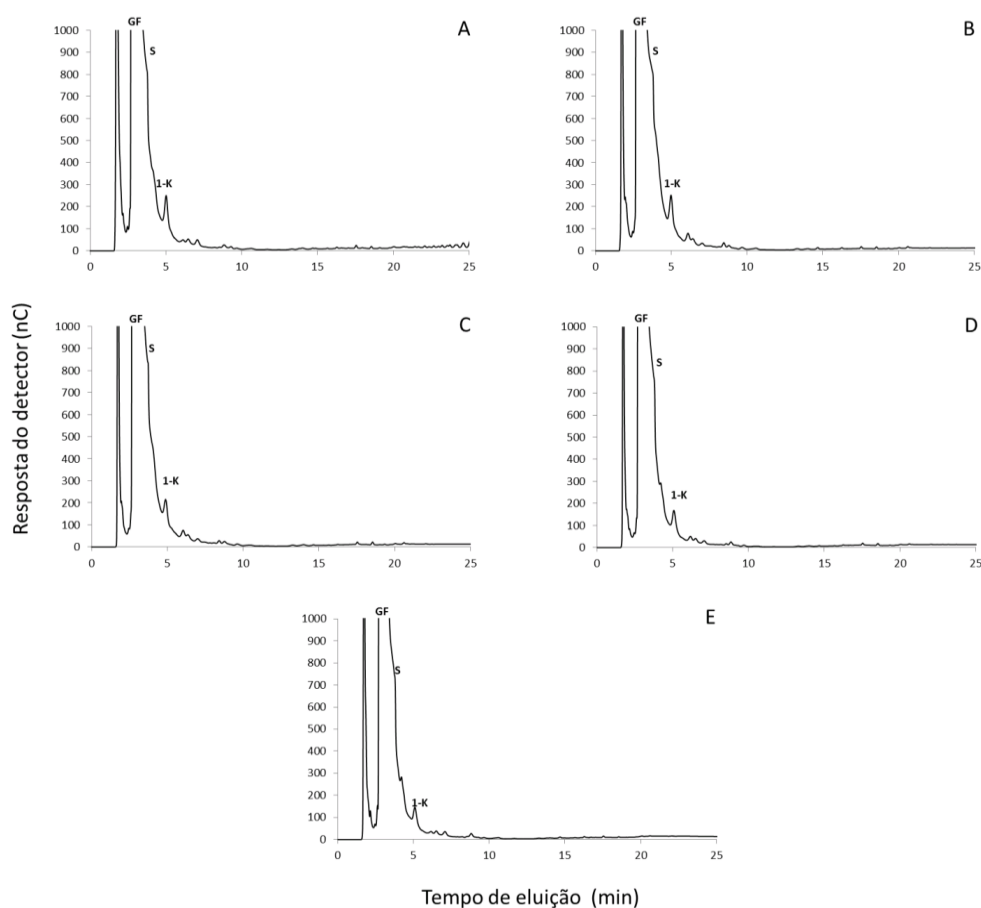


Figura 12. Perfis cromatográficos por HPAEC/PAD dos carboidratos solúveis presentes em calos friáveis obtidos a partir de explantes foliares de plantas de *V. herbacea* cultivadas em casa de vegetação e cultivados em meio de cultura MS ½ macronutrientes + 0,5 mg L⁻¹ de AIB: A) Inóculo inicial, B) 3 semanas de cultivo, C) 5 semanas de cultivo, D) 7 semanas de cultivo, E) 9 semanas de cultivo. G, F, S, 1-K, referem-se aos tempos de eluição de glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, respectivamente.

As atividades das enzimas 1-SST e 1-FFT em calos friáveis foram calculadas com base no tempo de incubação de 6h e estão representadas na figura 13. Apesar da ausência da série homóloga dos frutanos, foram detectadas atividades das enzimas de síntese desses carboidratos.

A 1-SST apresentou atividade próxima de zero, com exceção da terceira semana de cultivo quando foi detectada a formação de $13,8 \mu\text{g}$ de produto $\text{mg proteína}^{-1} \text{h}^{-1}$. A 1-FFT apresentou uma atividade máxima no inóculo inicial, de $116,8 \mu\text{g}$ de produto $\text{mg proteína}^{-1} \text{h}^{-1}$, e, em seguida, uma diminuição até a quinta semana de cultivo aumentando novamente até a nona semana.

Apesar da atividade da 1-FFT ter sido detectada em calos *in vitro*, a análise qualitativa dos carboidratos solúveis *in vivo* não mostra os produtos da sua atividade nos tecidos, a nistose (GP 4) ou frutanos com $\text{GP} > 4$. Isso possivelmente porque o substrato mais simples dessa enzima é a 1-cestose, produto da 1-SST, e dessa forma, a baixa atividade da 1-SST tanto *in vivo* quanto *in vitro*, limitou o acúmulo de frutanos pela baixa concentração de substrato. Existe uma concentração celular mínima de 1-cestose necessária para ativar a síntese de frutanos com GP maior que 3. Segundo Van den Ende e colaboradores (2006) em *Echinops ritro*, concentrações de 1-cestose nas células de aproximadamente 15 mM são necessárias para o início da síntese de inulina com GP maior que 3 (Cairns & Pollock, 1988).

Não foi verificada atividade da 1-FEH nos diferentes tempos de cultivo, mesmo após 24 h de incubação da enzima *in vitro* (dados não mostrados).

Os valores de atividade enzimática observados em calos friáveis de *V. herbacea* foram muito inferiores aos observados em plantas inteiras cultivadas *in vitro* (Figuras 24 e 30) e em plantas cultivadas em casa de vegetação, conforme reportado em diversos trabalhos realizados anteriormente (Portes & Carvalho 2006, Portes *et al.* 2008, Oliveira *et al.* 2010, Garcia *et al.* 2011). Essa baixa atividade da 1-SST também contrasta com o observado em calos de *S. sonchifolius* nos quais uma alta atividade da enzima 1-SST ($1700 \mu\text{g}$ de produto. mg de proteína $^{-1} \text{h}^{-1}$) foi observada (Oliveira *et al.* 2009).

Os resultados da atividade enzimática estão de acordo com os dados obtidos na análise dos perfis de carboidratos e indicam que a baixa atividade metabólica da via de síntese de frutanos em calos de *V. herbacea* nas condições experimentais utilizadas foi devida, especialmente, à baixa atividade da enzima 1-SST.

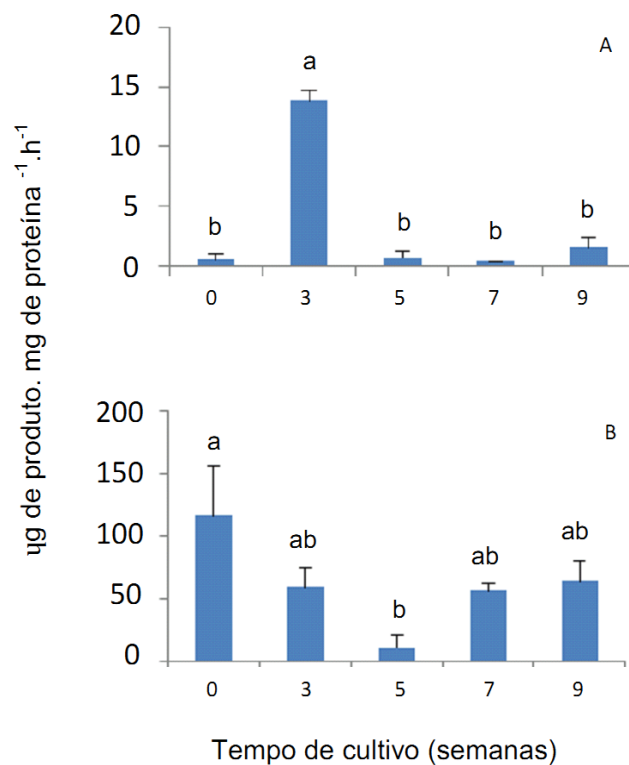


Figura 13. Atividade específica das enzimas 1-SST (A) DP: 1,03; CV: 30,80 e 1-FFT (B) DP: 36,38; CV: 59,16 em calos de *V. herbacea* cultivados por 9 semanas em meio de cultura MS ½ Macronutrientes + 0,5 mg L de AIB, após 6 h de incubação. Valores indicam a média de 3 repetições, as barras indicam o erro padrão. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey, $P < 0,05$.

4.3 Isolamento de cDNAs de interesse em *Vernonia herbacea*

Isolamento da sequência parcial dos genes *EF*, *1-SST* e *1-FFT*

Tendo em vista o interesse em analisar o perfil de expressão dos genes do metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea*, e que somente o gene de *1-FEH* já havia sido isolado dessa espécie, foi usada a estratégia de isolamento dos demais genes (*1-SST* e *1-FFT*, *EF*) por RT-PCR baseado em regiões consenso de sequências isoladas de outras espécies. Foi realizada busca no GenBank por genes ortólogos a *EF*, *1-SST* e *1-FFT* isolados de outras espécies de Asteraceae. Através do alinhamento das sequências obtidas no GenBank foi possível identificar regiões conservadas nos genes de interesse *EF*, *1-SST* e *1-FF*. As regiões conservadas foram utilizadas no desenho dos *primers* visando ao isolamento de sequência parcial dos genes *EF*, *1-SST* e *1-FF*. Os *primers* selecionados amplificam fragmentos com tamanhos previstos de 464, 384 e 561 pb, respectivamente (tabela 3). Devido à maior variabilidade nas sequências dos genes de *1-FFT*, foram desenhados *primers* degenerados para isolamento da sequência parcial desse gene em *V. herbacea*.

A figura 14 apresenta o resultado da reação de amplificação de fragmentos dos genes *EF*, *1-SST* e *1-FF*. A comparação dos fragmentos amplificados indicou que os mesmos apresentaram tamanhos próximos ao esperado. Os fragmentos foram isolados do gel de agarose, purificados e sequenciados, sendo obtidas sequências parciais para os genes *EF*, *1-SST* e *1-FFT*, com 400, 391 e 531 pb, respectivamente (figuras 15, 16 e 17). Os genes da *1-SST* e da *1-FFT* de plantas acumuladoras de frutanos, cujas sequências completas estão depositadas no GenBank, possuem tamanho médio que varia entre 1600 e 1900 pb para *1-SST* e 1800 a 2000 pb para *1-FFT*. Já para o gene *EF*, o tamanho médio das sequências depositadas no GenBank varia de 1600 a 1900 pb.

A análise do domínio proteico foi realizada através da ferramenta Blast P e identificou que ambas as proteínas correspondentes aos fragmentos obtidos dos genes *1-SST* e *1-FFT* de *V. herbacea* são relacionadas ao grupo das enzimas glicosil hidrolases, conforme esperado.

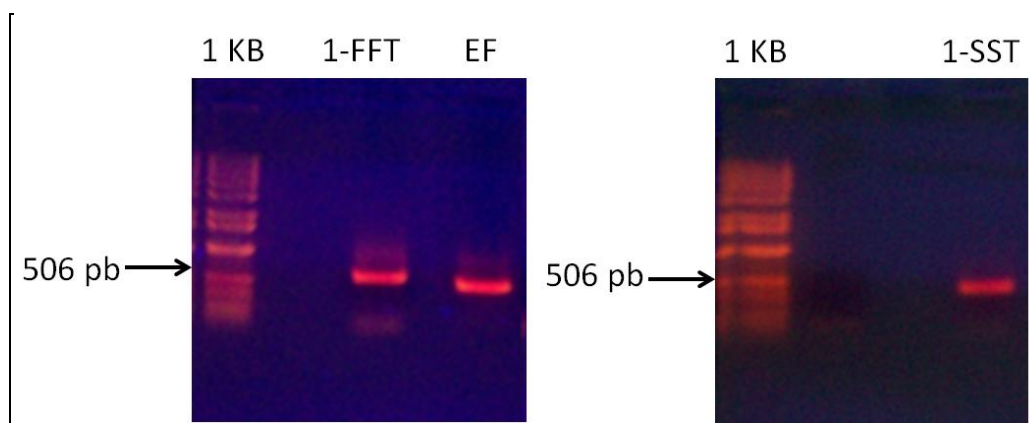


Figura 14. Amplificação por PCR de fragmentos correspondentes aos genes sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (*1-SST*), frutano:frutano 1-frutossiltransferase (*1-FFT*) e fator de alongamento 1- alpha (*EF*), marcador molecular de alto peso molecular – Invitrogen (1Kb).

```

5'CTGGAGGAATTGTACAAGCGTGTGATCGAGAGATTGAGAAGGAAGCTGCTGAGATGAACAAAA
GGTCGTTCAAATACGCCTGGGTGCTTGACAAGCTCAAGGCTGAGCGTGAACGTGGTATCACCATTG
ATATTGCCTTGTGGAAGTTTGAGACCACCAAGTATTACTGCACGGTCATTGATGCTCCTGGACATCG
TGACTTTATCAAGAACATGATTACTGGTACCTCCCAGGCCGATTGTGCTGTTCTTATCATTGATTCC
ACCACTGGTGGTTTTGAGGCTGGTATTTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCATGCTTTGCTTGCTT
TCACTCTTGGGGTCAAGCAAATGATTTGCTGCTGTAACAAGATGGATGCCACCACACCAAAATATT
CCAAGTCAAGGTATGA 3'

```

Figura 15. Sequência parcial (400 pb) do gene do fator de alongamento 1- alpha (*EF*) isolado de *V. herbacea*.

```

5'CCGTTGCGCCATGGTGCCCGACCNNTGGTACGACATTGAGGGCGTCATGACGGGCTCCGCCACCGT
CCTCCCCGACGGCCAGATCATCATGCTCTACACTGGCAACGCCTACGATCTCTCCCAACTACAGTG
CCTCGCGTATGCCGTCAACTCGTCTGACCCTCTCCTACTAGAGTGGAGAAAGTATGAGGGCAATCC
CATACTGTTCCCAACCACCGGGGTGGGGTATAAGGATTTTCGGGACCCATCTACTTTATGGATGGG
GCCCCGATGGTAAATGGAGGATGGTTATGGGGTCCAAGCATAACCAGACCATCGGTTGTGCCCTGAT
CTATCATACCACTAATTTTACGCATTTTCGAGCTTAATAAGGAGGTGCTTCATGCGGTACCC3'

```

Figura 16. Sequência parcial (391 pb) do gene da sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (*1-SST*) isolado de *V. herbacea*.

```

5'AGTCCCTGATACCGATATGTGGGAATGTGTGGATCTATACCCCGTCTCAACGATCAATGATAGCG
CGCTTGATATCGCGGCATACGGGCCGGGCATCAAGCACGTGATTAAAGAAAGTTGGGAGGGGCAT
GGGATGGATTGGTATTCGATCGGGACTTATGATGCATTCAATGATAAGTGGACCCCTGATAACCCT
GATCTGGACGTGGGTATCGGTTTAAGGTGCGATTACGGAAGGTTCTTTGCGTCAAAGAGTCTCTAC
GACCCGTTGAAGAAAAGGAGAGTCACTTGGGGTTATATTGCAGAATCGGATAGCCCGGACCAGGA
CCTCTCCAGAGGATGGGCTACAATCTATAATGTTGCAAGAACTGTGGTACTAGATAGAAAGACTGG
AATCCATCTGCTTCATTGGCCGGTCGAGGAAATCGAACTTTGAGATCCAAAGGTCATGAATTCAA
TGACATCAAGCTCGGGCCGGGCTCGATGATTCCACTGAAAGTAGGACAAGCTACACAGTTGGACAT
CGTTGC 3'

```

Figura 17. Sequência parcial (531 pb) do gene da frutano:frutano 1-frutosiltransferase (*1-FFT*) isolado de *V. herbacea*.

As sequências obtidas tiveram sua identidade confirmada através da comparação com sequências disponíveis no GenBank, com o emprego da ferramenta BLAST, disponível no NCBI. Nessa análise, o *e-value* (*expectation value*) refere-se ao resultado dos cálculos estatísticos e indica o grau de validade de um alinhamento, de forma que quanto menor este valor, menor é a probabilidade do alinhamento ocorrer ao acaso. O *Score* é a pontuação que uma determinada sequência recebe, dependendo do grau de correspondência encontrada com sequências dos bancos de dados.

Os resultados da análise pelo BLAST (tabela 12) indicaram alta identidade entre as sequências parciais dos genes de *V. herbacea* e os genes correspondentes de outras espécies de plantas. A sequência parcial do gene *EF* de *V. herbacea* apresentou 92% de identidade com *Prunus persia*, 91% com *Rosa multiflora*, 91% com *Populus trichocarpa*, 91% com *Poncirus trifoliata* e 91% com *Aralia elata*. A sequência parcial do gene *1-SST* apresentou maior identidade com os genes *1-SST* de *Cynara scolymus* (86%), *Hordeum vulgare* (86%) e *C. intybus* (82%). A sequência referente ao gene *1-FFT* apresentou maior identidade com os genes *1-FFT* de *Cynara scolymus* (83 %), *Lactuca sativa* (83%) e *Taraxacum officinale* (82%).

Com base nos resultados da análise de BLAST, foi possível confirmar o isolamento de sequências parciais dos genes *EF*, *1-SST* e *1-FF* de *V. herbacea*, com alta identidade com sequências isoladas previamente de outras espécies acumuladoras de frutanos.

Tabela 12. Resultado da comparação das sequências parciais dos genes sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST), frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT) e fator de alongamento 1- alpha (EF) de *V. herbacea*, com as sequências homólogas disponíveis no GenBank.

Sequência <i>V. herbacea</i>	Nº acesso	Tipo	Organismo	Score	E-value	Max ident
<i>EF</i>	FJ267653.1	Elongation 1-alpha factor	<i>Prunus persica</i>	566	6e-158	92%
	JN399225.1	Elongation 1-alpha factor	<i>Rosa multiflora</i>	560	3e-156	91%
	XM 002315249.1	predicted protein	<i>Populus trichocarpa</i>	555	1e-154	91%
	EU916202.1	Elongation fator 1	<i>Ziziphus jujuba</i>	555	1e-154	91%
	AY169969.1	Elongation 1-alpha factor	<i>Poncirus trifoliata</i>	547	2e-152	91%
	JX067859.1	Elongation 1-alpha factor	<i>Aralia elata</i>	544	3e-151	91%
<i>1-SST</i>	Y09662.1	Sucrose sucrose 1-frutossiltransferase	<i>Cynara scolymus</i>	422	1e -114	86%
	JQ346799.1	Sucrose sucrose 1-frutossiltransferase	<i>Cichorium intybus</i>	327	3e -86	82%
	U81520.1	Sucrose sucrose 1-frutossiltransferase	<i>Cichorium intybus</i>	322	1e -84	81%
	AK364837.1	Predicted protein	<i>Hordeum vulgare</i>	99	2e-17	86%
	AK363026.1	Predicted protein	<i>Hordeum vulgare</i>	99	2e-17	86%
<i>1-FFT</i>	AJ000481.2	Fructan fructan 1-fructosyltransferase	<i>Cynara scolymus</i>	475	1e-130	83%
	EU293871.1	Fructan fructan 1-fructosyltransferase	<i>Lactuca sativa</i>	468	2e-128	83%
	AJ829550.1	1,2-beta-fructan 1F-fructosyltransferase	<i>Taraxacum officinale</i>	448	3e-122	82%

Análise filogenética dos genes 1-SST e 1-FFT

As sequências de aminoácidos parciais dos genes 1-SST e 1-FFT isolados foram alinhadas a outras sequências de genes do metabolismo de frutanos depositadas no GenBank. A árvore filogenética construída comparando-se as sequências parciais das proteínas dos genes 1-SST e 1-FFT de *V. herbacea* com sequências de outras espécies mostrou que as sequências de *V. herbacea* apresentaram maior similaridade com os respectivos genes de outras espécies de Asteraceae, conforme esperado (figura 18).

Foram formados cinco grandes grupos: grupo I contendo sequências do gene 1-SST de *V. herbacea* e de outras Asteraceae, grupo II contendo as sequências do gene 1-SST de Poaceae, grupo III contendo sequencias do gene 1-FEH de Asteraceae e Poaceae, grupo IV

contendo as sequências do gene 1-FFT de Poaceae e grupo V contendo as sequências do gene 1-FFT de *V. herbacea* e de outras Asteraceae.

As enzimas de biosíntese de frutanos, assim como as invertases, são frutossiltransferases, diferindo entre si apenas em seus doadores e aceptores finais (Van Laere & Van den Ende 2002). De fato, análises filogenéticas indicam que os genes da síntese de frutanos evoluíram a partir de invertases vacuolares (Schroeven *et al.* 2009). Já os genes envolvidos na degradação de frutanos evoluíram a partir de invertases de parede celular que posteriormente adquiriram um sinal para a localização vacuolar (Van Laere & Van den Ende 2002). Em *V. herbacea* a análise de uma sequência de cDNA do gene 1-FEH, obtida por Asega e colaboradores (2008), também indicou uma maior relação deste com invertases de parede celular.

Os resultados das análises das sequências parciais dos genes de síntese de frutanos em *V. herbacea* reforçam a divergência entre as Divisões Liliopsida e Magnoliopsida, o que está de acordo com o modelo de origem polifilética proposto para a flora sintetizadora de frutanos (Ritsema & Smeekens 2003).

Os rizóforos de *V. herbacea* acumulam até 80% de sua massa seca na forma de frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich 1993). Além do potencial econômico como planta produtora de frutanos, *V. herbacea* é considerada um modelo para o estudo da influência de fatores ambientais no metabolismo destes compostos e da sua relação com a tolerância a esses fatores (Carvalho & Dietrich 1992, Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004, Carvalho *et al.* 2006, Portes & Carvalho 2006, Portes *et al.* 2008, Oliveira *et al.* 2010, Garcia *et al.* 2011).

Apesar da importância desta espécie como modelo experimental, até o momento apenas um estudo de clonagem e sequenciamento foi realizado com o gene 1-FEH (Asega *et al.* 2008). Dessa forma a obtenção de sequências, mesmo que parciais, de genes do metabolismo de frutanos em *V. herbacea* é de extrema importância, pois além de auxiliar o estudo da expressão destes genes, facilitam a realização da sua clonagem.

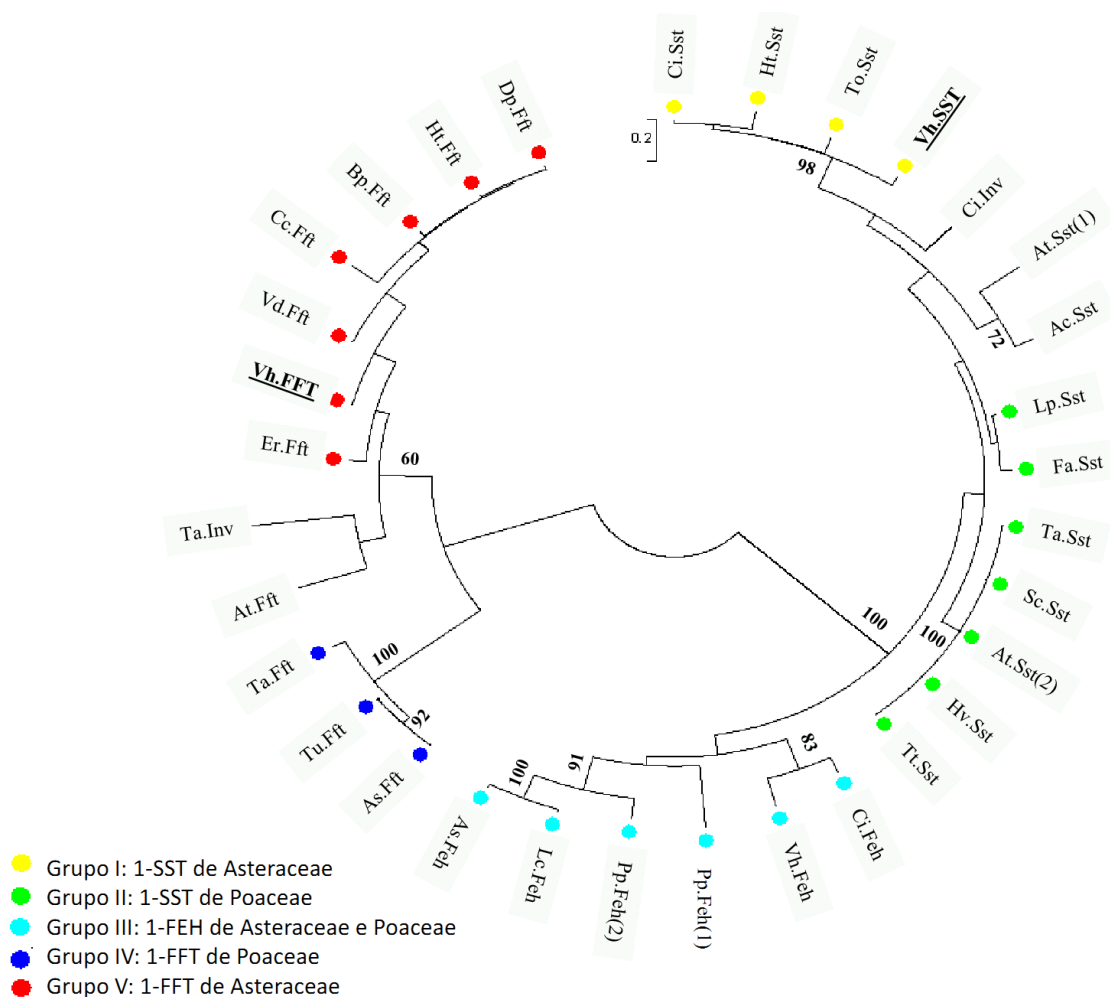


Figura 18. Árvore filogenética construída a partir de sequências de proteínas deduzidas dos genes sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-Sst), frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-Fft), 1- frutano exohidrolase (1-Feh) e invertase vacuolar (Inv), de *V. herbacea* e de outras espécies acumuladoras de frutanos, depositadas no GeneBank. Em negrito e sublinhado estão as sequências obtidas de *V. herbacea*. A legenda com as outras sequências, assim como o número de acesso no Genbank, estão disponíveis em Materiais e Métodos. A barra de escala representa valor de distancia igual a 0,2. Análise realizada usando Neighbor-Joining, com 1000 réplicas de bootstrap.

Validação dos *primers* para as análises de qRT-PCR

As sequências dos *primers* utilizados nos experimentos de qRT-PCR estão ilustradas na tabela 4. Os *primers* foram testados por uma reação de PCR, sendo possível observar a amplificação de bandas específicas com tamanhos próximos aos esperados: 1-FEH (199 pb), 18S RNA (102 pb), 1-SST (163 pb), EF (163 pb), 1-FFT (140 pb) (figura 19).

A análise da curva de desnaturação dos fragmentos amplificados utilizando os pares de *primers* selecionados (figura 20) indicou uma amplificação específica dos genes do metabolismo de frutanos e para o gene de referência *18S*. O gene de referência *EF* apresentou uma projeção abaixo da linha de base, o que pode estar associado a uma amplificação inespecífica; no entanto, a figura 19 mostra que o par de *primers* promoveu a amplificação de um único fragmento com o tamanho esperado.

A avaliação dos genes de referência foi feita com base na análise da expressão destes em amostras submetidas aos diferentes tratamentos. A figura 21 mostra que ambos os genes, *EF* e *18S*, apresentaram uma expressão estável.

A análise da estabilidade de expressão foi realizada utilizando o programa BestKeeper (Pfaffl, 2004) que determina o gene de referência mais estável com base no coeficiente de correlação (r), que corresponde à média geométrica dos valores CP dos genes avaliados. De acordo com o programa, o gene *18S* apresentou um valor de 0,822 ($p=0,004$) e o *EF* um valor de 0,872 ($p=0,001$) sendo o último indicado pelo programa como melhor candidato à gene de referência.

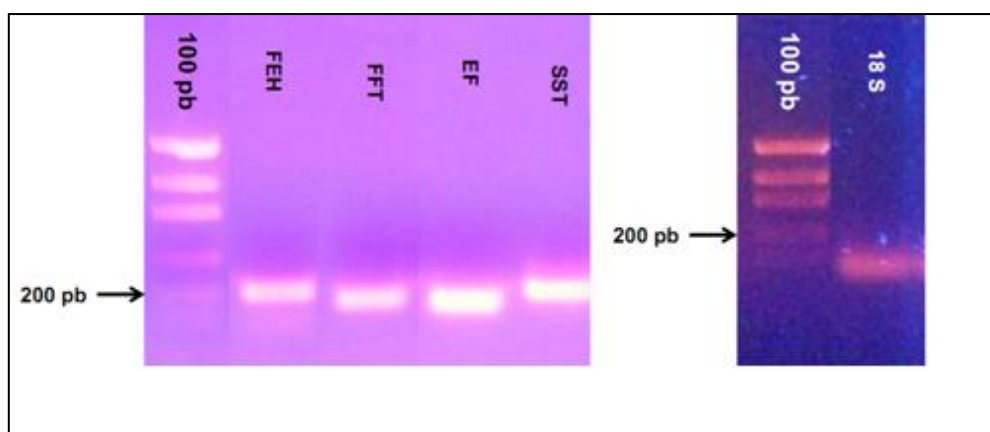


Figura 19. Amplificação por PCR de fragmentos correspondentes aos genes: sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (*1-SST*), frutano:frutano 1-frutossiltransferase (*1-FFT*) e fator de alongamento 1- α (*EF*), 18S RNA ribossomal (*18S*) e marcador molecular de baixo peso molecular – Invitrogen (100 pb).

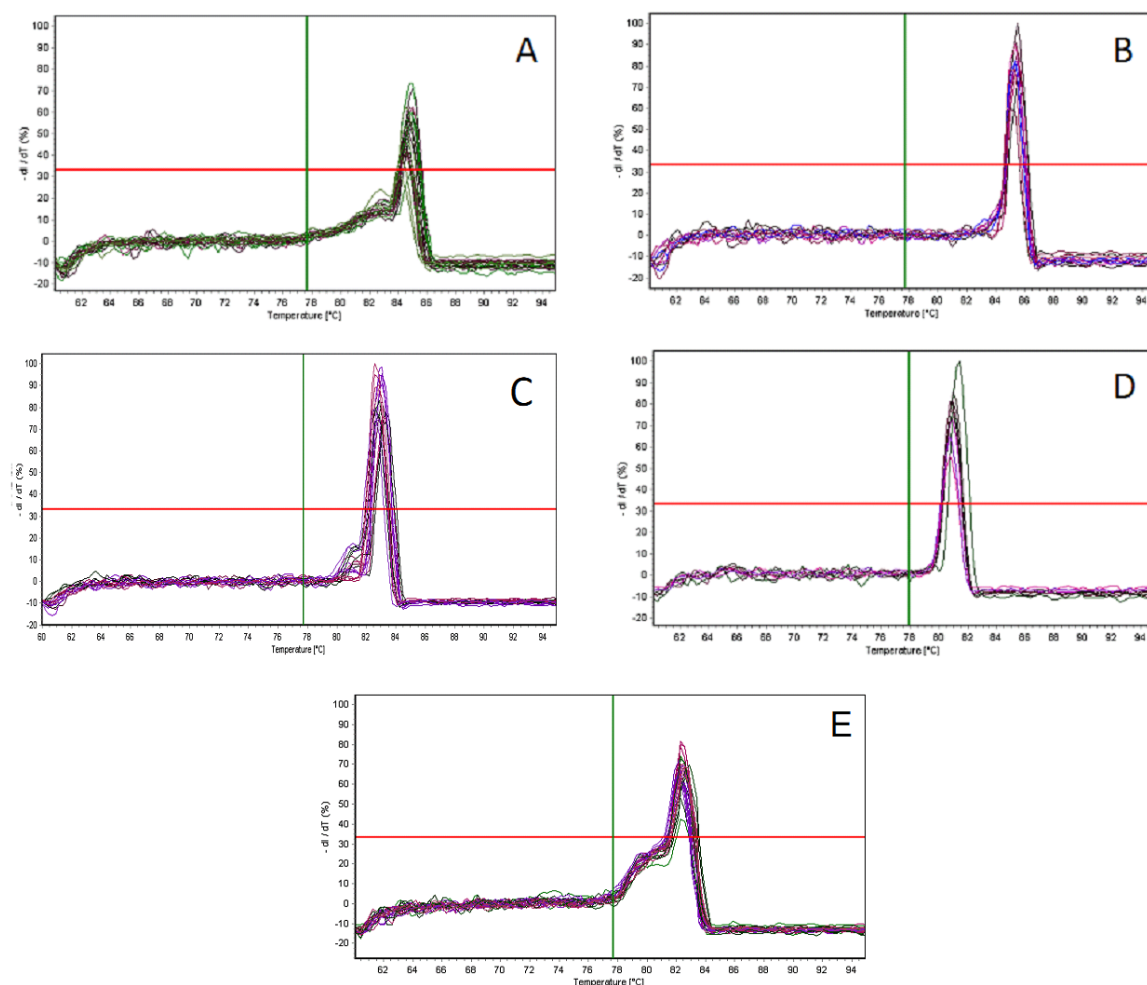


Figura 20. Curvas de desnaturação dos fragmentos amplificados, utilizando os pares de primers selecionados. A) 1-FEH, B) 1-SST, C) 1-FFT, D) 18S, E) EF.

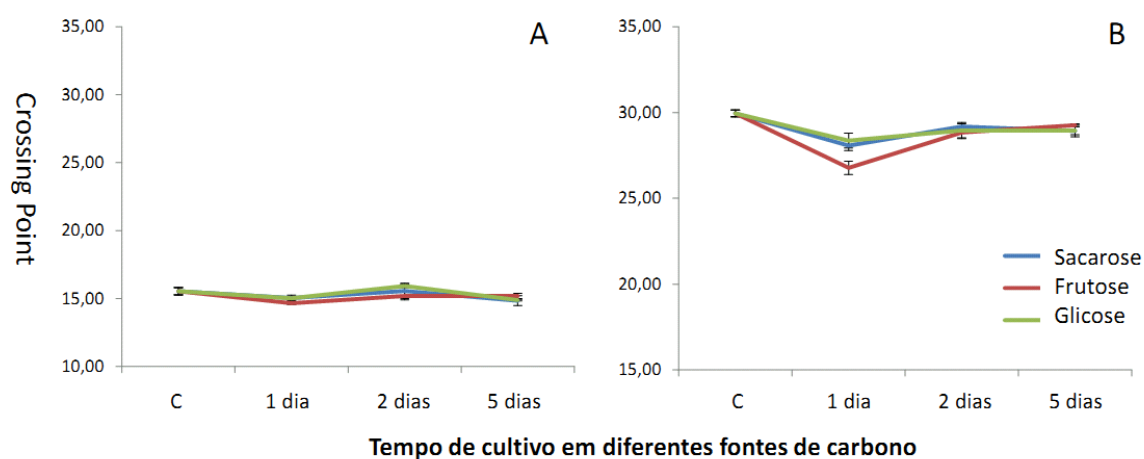


Figura 21. Avaliação da estabilidade dos genes de referência. A) 18 S RNA - rRNA e B) Fator de alongamento 1- α - EF, em rizóforos de plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro*. C- controle, plantas cultivadas em meio de cultura sem adição de carbono por 7 dias.

4.4 Estudo do metabolismo de frutanos em plantas cultivadas *in vitro*

4.4.1 Efeito de diferentes fontes de carbono

Plantas de *V. herbacea* com 5 meses de idade, obtidas por brotação de segmentos de rizóforos oriundos do cultivo *in vitro*, foram cultivadas na ausência de carbono por 7 dias e, em seguida, transferidas para meios de cultura suplementados com glucose, frutose ou sacarose. O objetivo desse experimento foi avaliar como diferentes fontes de carbono influenciam na reversão da condição de deficit energético para a condição de disponibilidade de carbono e de como essa reversão atua no metabolismo de frutanos.

Trabalhos anteriores envolvendo o cultivo da espécie em casa de vegetação indicaram uma grande variação de resultados nos períodos de transição do metabolismo de frutanos (Asega & Carvalho 2004, Garcia *et al.* 2011). Essa variação é associada à falta de sincronismo da resposta ao estímulo externo e ocorre provavelmente devido à grande variabilidade genética observada em populações naturais.

No presente trabalho optou-se pelo uso do cultivo *in vitro* como uma forma de minimizar essas variações. Entretanto, o tempo de resposta das plantas à suplementação do meio com carbono variou entre as repetições, dificultando a diferenciação das médias pela análise de variância. Dessa forma neste experimento os teores de frutose total e a atividade enzimática são discutidos com base em tendências.

O conteúdo de frutose total (tabela 13) da parte aérea nas plantas controle cultivadas na ausência de carbono foi de 63,02 mg g⁻¹ de massa seca. As plantas que receberam suplementação com sacarose e frutose mostraram uma tendência de aumento no conteúdo de frutose durante os cinco dias de cultivo e as cultivadas com glucose apresentaram queda no 5º dia.

Nos rizóforos de plantas controle o teor foi de 93,4 mg g⁻¹ massa seca e a suplementação do meio de cultura com sacarose, frutose ou glucose levou a um aumento desses teores, com diferença significativa no segundo dia de cultivo em glucose.

A tendência para menor acúmulo de frutose total nos rizóforos de plantas controle é resultado da instalação do déficit energético nessas plantas. Segundo Carvalho & Dietrich (1993) em rizóforos de *V. herbacea*, a redução na concentração de frutanos e o aumento de frutose livre ocorre entre as fases de brotação e floração, como resultado da hidrólise de frutanos, e está associada à liberação de energia para o crescimento quando a demanda energética da planta é mais elevada.

A análise qualitativa dos carboidratos solúveis por HPAEC/PAD indicou a presença da série homóloga da inulina em todos os órgãos da planta e em todos os tratamentos, não sendo observadas alterações significativas nos perfis de frutanos na parte aérea (figura 22) e nos rizóforos (figura 23). A comparação das duas partes da planta, entretanto, mostra uma maior proporção de hexoses (glucose e frutose) na parte aérea em relação aos frutanos.

As análises quantitativa e qualitativa dos açúcares solúveis das plantas cultivadas *in vitro* indicaram que os três açúcares utilizados como fontes de carbono no meio de cultivo, sacarose, frutose ou glucose atuaram de forma semelhante.

Tabela 13. Conteúdo de frutose total na parte aérea e em rizóforos de plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro*. Os valores representam a média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, $P < 0,05$. Sac - sacarose, Fru - frutose, Glu - glucose e C – plantas controle, sem adição de carbono.

Fonte de Carbono	Dias de cultivo	Frutose total mg g ⁻¹ de massa seca	
		Parte aérea (1)	Rizóforo (2)
Sac	1	112,70 a	209,36 ab
Sac	2	91,43 a	197,72 ab
Sac	5	106,65 a	184,92 ab
Fru	1	65,98 a	199,97 ab
Fru	2	117,50 a	205,27 ab
Fru	5	96,98 a	176,87 ab
Glu	1	72,26 a	215,24 ab
Glu	2	70,14 a	275,71 a
Glu	5	48,44 a	191,69 ab
C	0	63,02 a	93,43 b

(1) DP= 32,9; CV= 38,9; (2) DP= 55,0. CV = 28.2

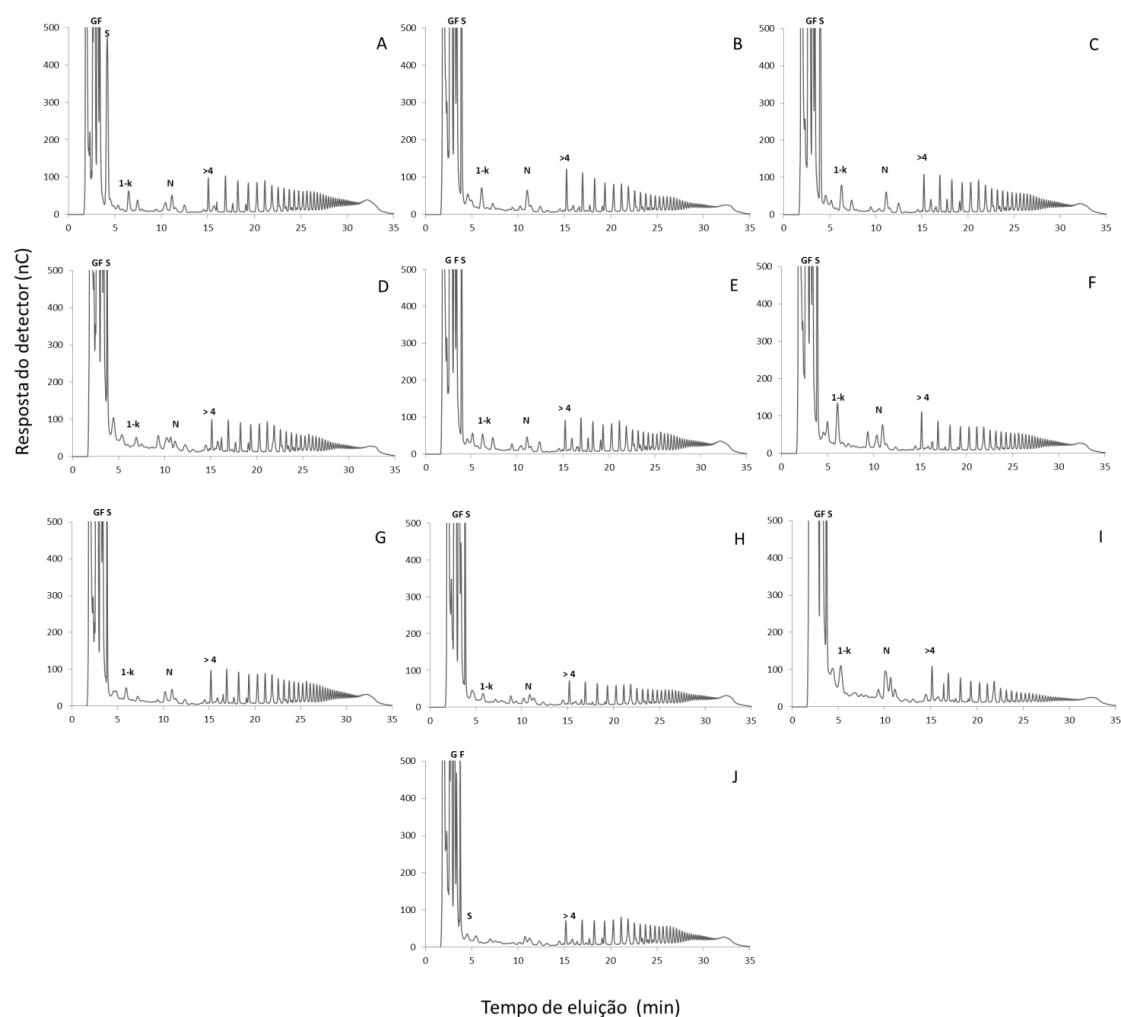


Figura 22. Perfis cromatográficos por HPAEC/PAD dos carboidratos solúveis da parte aérea de plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro*, sob déficit de carbono por 7 dias, controle (J) e, posteriormente, submetidas a diferentes fontes de carbono por 1, 2 e 5 dias. Sacarose A) 1 dia, B) 2 dias, C) 5 dias; Frutose D) 1 dia, E) 2 dias, F) 5 dias; Glucose G) 1 dia, H) 2 dias, I) 5 dias. G, F, S, 1-K, N e >4 referem-se aos tempos de eluição de glucose, frutose, sacarose, 1-kestose, nistose e frutanos com grau de polimerização maior que 4, respectivamente.

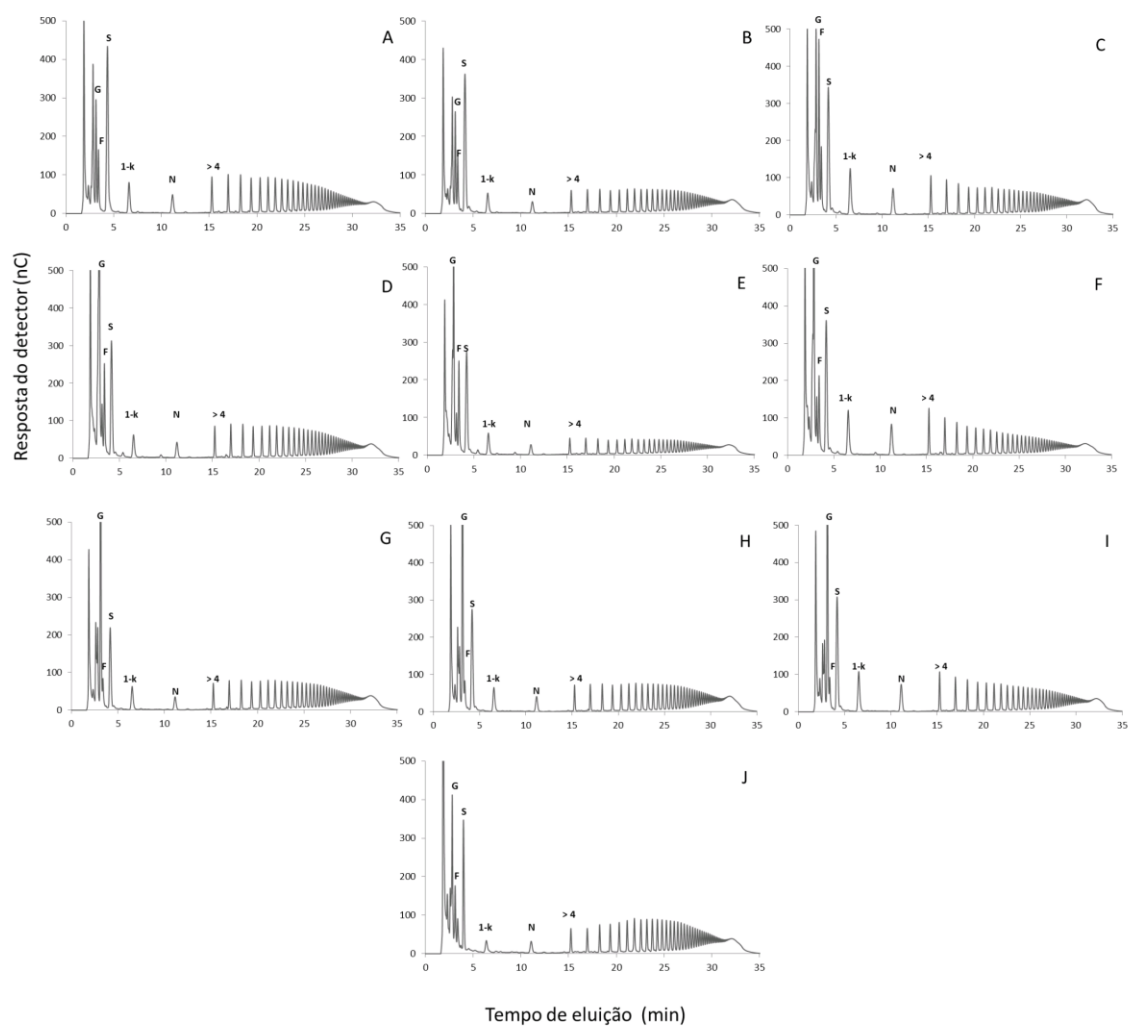


Figura 23. Perfis cromatográficos por HPAEC/PAD dos carboidratos solúveis em rizóforos de plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro*, sob déficit de carbono por 7 dias, controle (J) e, posteriormente, submetidas a diferentes fontes de carbono por 1, 2 e 5 dias. Sacarose A) 1 dia, B) 2 dias, C) 5 dias; Frutose D) 1 dia, E) 2 dias, F) 5 dias; Glucose G) 1 dia, H) 2 dias, I) 5 dias. G, F, S, 1-K, N e >4 referem-se aos tempos de eluição de glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutanos com grau de polimerização maior que 4, respectivamente.

A atividade das enzimas 1-SST, 1-FFT e 1-FEH apresentada na figura 24, foi calculada com base nos tempos de incubação de 4, 2 e 3 h, respectivamente.

Durante o período experimental, a atividade da 1-SST na parte aérea de plantas tratadas com frutose e glucose (figura 24A) foi semelhante à verificada nas plantas controle, enquanto nas plantas tratadas com sacarose, a atividade da 1-SST aumentou progressivamente com o tempo de cultivo.

Rizóforos de plantas controle (figura 24B) não apresentaram atividade de 1-SST, porém, após a transferência para os meios de cultura suplementados com as diferentes fontes de carbono, esta atividade foi detectada a partir do primeiro dia de cultivo nos tratamentos com glucose ou frutose, e a partir do segundo dia, no tratamento com sacarose. Aos 5 dias, a atividade da 1-SST atingiu os valores mais elevados, 101,2; 92,6 e 132,6 μg de produto mg proteína⁻¹ h⁻¹ para sacarose, frutose e glucose, respectivamente.

Em rizóforos, o perfil de expressão relativa do gene *1-SST* (Figuras 25B e 26B) acompanhou o perfil da atividade da enzima, com baixo acúmulo de transcrito nas plantas controle, cultivadas na ausência de fonte de carbono e aumento da expressão relativa após a transferência das plantas para os meios de cultura suplementados com sacarose, glucose ou frutose. Já na parte aérea, relação semelhante não foi observada, uma vez que a atividade das enzimas nos tratamentos com frutose e glucose foi semelhante ao controle e constante ao longo do período experimental, enquanto a expressão apresentou uma tendência de aumento.

Aos 5 dias de cultivo, a expressão relativa do gene *1-SST* normalizada com o gene de referência *18S* indicou um aumento de 27,4; 60,6 e 46,6 vezes em relação ao controle na parte aérea de plantas suplementadas com sacarose, frutose ou glucose, respectivamente (figura 25A). O perfil de expressão relativa de *1-SST* na parte aérea normalizado com o gene de referência *EF* foi similar ao do *18S*, sendo que a expressão apresentou um aumento de 16,2; 32,6 e 24,1 vezes em relação ao controle, nos tratamentos sacarose, frutose ou glucose, respectivamente (figura 26A). Foi possível identificar um pico na expressão do gene no primeiro dia de tratamento com sacarose, seguido de uma redução, enquanto que nos meios suplementados com frutose ou glucose, observou-se um aumento maior da expressão no quinto dia de cultivo.

Em rizóforos, a expressão relativa do gene *1-SST*, normalizada com o gene de referência *18S*, indicou um aumento de 90; 79,4 e 227,6 vezes em relação ao controle após 5 dias de cultivo em meio suplementado com sacarose, frutose ou glucose, respectivamente (figura 25B), enquanto a expressão normalizada com o gene de referência *EF* apresentou um

aumento de 82,6; 62,8 e 133,5 vezes em relação ao controle após 5 dias de cultivo com sacarose, frutose ou glucose, respectivamente (figura 26B).

A baixa expressão do gene *1-SST* observada nas plantas controle interferiu nos cálculos da expressão relativa, dificultando uma determinação mais precisa da expressão relativa deste gene. No entanto, observou-se uma tendência clara de aumento gradual da expressão ao longo do tempo de cultivo.

O aumento na atividade da enzima 1-SST em resposta ao aumento da disponibilidade de fotoassimilados foi descrito anteriormente para *V. herbacea* (Asega & Carvalho 2004, Portes & Carvalho 2006). Estudos da expressão do gene *1-SST* em outras espécies também indicam uma correlação entre disponibilidade de carbono e aumento da expressão. Em trigo (*Triticum aestivum*) a atividade das enzimas envolvidas na síntese de frutanos foi induzida pela sacarose além de outros açúcares como glucose, frutose, trealose e maltose (Martine-Noel *et al.* 2001). De modo semelhante, Kusch e colaboradores (2009), trabalhando com cultivo de raízes de chicória (*C. intybus*), observaram que a elevação da concentração de sacarose do meio de cultivo de 3 para 6 % promoveu aumento na transcrição dos genes *1-SST* e *1-FFT*.

Em rizóforos, a comparação dos níveis de expressão relativa com os de atividade da 1-SST sugere uma correlação entre ambas, havendo uma tendência de aumento da atividade e da expressão após a transferência das plantas da condição de déficit de carbono para os meios suplementados com sacarose, frutose e glucose. Na parte aérea foi observada a correlação entre atividade enzimática e expressão somente no tratamento com sacarose, sendo que nos tratamentos frutose e glucose, a expressão relativa apresentou um aumento maior apenas no quinto dia de cultivo, o qual não foi verificado na atividade enzimática, provavelmente devido à defasagem de tempo entre a transcrição e a tradução do gene e a ativação de uma enzima funcional.

Estudos envolvendo a biossíntese de frutanos identificaram que existe uma concentração mínima de sacarose a partir da qual tem início a atividade da 1-SST e a biossíntese de frutanos, sendo que o conhecimento sobre a biossíntese destes compostos está baseado neste fato (Cairns & Pollock, 1988, De Roover *et al.* 2000).

Dessa forma podemos supor que exista uma concentração mínima de sacarose necessária para estimular a transcrição desse gene. Assim, é provável que na parte aérea, a resposta mais rápida à sacarose promovendo indução da atividade e expressão do gene *1-SST* esteja relacionada à maior eficiência no transporte deste açúcar em relação à frutose e à glucose. Essa concentração mínima de sacarose necessária para o início da transcrição

também explicaria a maior atividade enzimática observada na parte aérea das plantas controle em relação aos rizóforos, uma vez que a inversão da razão fonte/dreno associada à fotossíntese, mesmo que em baixas taxas contribuíram para uma maior concentração de hexoses e sacarose na parte aérea (figura 22) em comparação com rizóforos (figura 23).

O fato da atividade da 1-SST acompanhar, em geral, as alterações da expressão do gene *1-SST* sugere a existência de um mecanismo de regulação transcricional controlado, possivelmente, pela disponibilidade de sacarose, frutose e glucose em *V. herbacea*.

Esse resultado está de acordo com o observado na literatura, em que análises de expressão de genes envolvidos no metabolismo de frutanos revelaram que alterações na transcrição são geralmente acompanhadas por alteração na atividade enzimática e no acúmulo de frutanos, sugerindo que a regulação desses genes se dá no nível transcricional, como observado em *V. herbacea* (Asega *et al.* 2011), *Hordeum vulgare* (Luscher *et al.* 2000, Wang *et al.* 2000), *C. intybus* (Van den Ende *et al.* 2000) e *Lolium perene* (Chalmer *et al.* 2003).

Os dados referentes à atividade da 1-FFT na parte aérea (figura 24C) não mostraram uma tendência clara de variação, enquanto, nos rizóforos (figura 24D), a atividade foi mais estável e semelhante ao controle, destacando-se apenas um aumento no primeiro dia sob sacarose. Não foram observadas alterações na atividade enzimática em função do tempo de cultivo ou da suplementação com as diferentes fontes de carbono.

Resultados obtidos anteriormente com a 1-FFT de *V. herbacea* mostraram que esta enzima não apresenta muitas variações durante o ciclo fenológico (Portes & Carvalho, 2006) e nem sob a influência de fatores ambientais como, altas concentrações de CO₂ (Oliveira *et al.* 2010), déficit hídrico (Garcia *et al.* 2011) e baixas temperaturas (Portes *et al.* 2008).

No entanto, a expressão relativa da *1-FFT* na parte aérea aumentou inicialmente em plantas tratadas com sacarose e gradualmente em plantas tratadas com frutose, enquanto nas tratadas com glucose, não houve aumento de expressão. Naquelas cultivadas com sacarose o aumento da expressão foi pronunciado já no primeiro dia de cultivo, resposta bem mais rápida do que em plantas tratadas com frutose, nas quais o aumento foi pronunciado apenas após 5 dias. Aos 5 dias de cultivo o cálculo da expressão relativa normalizado com o gene de referência *18S* indicou que, em relação ao controle, a expressão apresentou um aumento de 10,4; 10,2 e 3,1 vezes nos tratamentos com sacarose, frutose e glucose, respectivamente (figura 25C), enquanto que a expressão normalizada com o gene de referência *EF* apresentou um aumento de 6,2; 8,4 e 4,7 vezes em plantas sob estes tratamentos (figura 26C).

Em rizóforos, a expressão relativa da *1-FFT* aumentou no primeiro dia em plantas cultivadas nas três fontes de carbono, e permaneceu praticamente constante até o quinto dia de

cultivo. Neste ponto do experimento, a expressão da *1-FFT* normalizada com o gene de referência *18S*, aumentou 20; 17,4 e 21,5 vezes nas plantas tratadas com sacarose, frutose e glucose, respectivamente em relação às plantas controle (figura 25D). Quando normalizada com o gene de referência *EF*, a expressão apresentou um aumento de 16,2; 13,4 e 16 vezes nas plantas tratadas com sacarose, frutose e glucose, respectivamente (figura 26D).

A comparação dos dados da expressão relativa com os da atividade enzimática não permite o estabelecimento de uma correlação direta entre ambas. Esse resultado pode ser devido à existência de um mecanismo de regulação pós transcricional para o gene nessa espécie, o que contraria o conhecimento de que os genes do metabolismo de frutanos são regulados principalmente em nível de transcrição (Van den Ende *et al.* 2002).

Outra possibilidade pode estar relacionada às características dessa enzima, capaz de promover tanto o alongamento como a diminuição do comprimento das cadeias de frutanos, o que pode dificultar a precisão de detecção da atividade enzimática. De fato, na análise da incubação enzimática da *1-FFT* realizada neste trabalho foi possível identificar nas amostras com atividade enzimática mais elevada, a formação de fruto-oligossacarídeos com GP 5, além da nistose (GP 4) (figura 27). Como a determinação da atividade é feita com base na produção da nistose, essa reação sequencial pode influenciar na correta determinação da atividade da enzima.

Dessa forma, apesar de possuir doadores e aceptores preferenciais, a *1-FFT* é capaz de catalisar diversas reações de transferência de grupos frutossil, apresentando, no entanto eficiência menor que a observada quando utiliza substratos e doadores preferencias (Van den Ende 2002). Pode-se sugerir que uma baixa afinidade da *1-FFT* de *V. herbacea* pelo substrato 1-cestose influenciaria na determinação da atividade. Entretanto, segundo Itaya e colaboradores (2007), a *1-FFT* de *V. herbacea* tem afinidade com substratos de GP baixos, como a 1-cestose utilizada no presente trabalho, para promover o alongamento dos fruto-oligossacarídeos, de forma que a baixa afinidade pelo substrato não deve ser responsável pela inconsistência das respostas obtidas nas análises de atividade enzimática e expressão relativa do gene.

A *1-FEH* apresentou atividade elevada nas plantas controle, sob déficit de carbono. Esta condição parece ter promovido a mobilização de frutanos, resultado que, segundo Asega & Carvalho (2004), indica a instalação de um déficit energético que leva à mobilização das reservas de carbono nos tecidos. Em seguida, a transferência das plantas para o meio contendo carbono acarretou na redução da atividade e consequente redução na mobilização de reservas na parte aérea e nos rizóforos, sendo essa redução mais pronunciada no cultivo com frutose e

com glucose (figuras 24E, 24F). Ainda nos rizóforos, verificou-se uma tendência à diminuição gradual da atividade com o aumento do tempo de cultivo com sacarose e com frutose, mas especialmente em sacarose. Aos 5 dias não se observou diferenças nas atividades enzimáticas nos diferentes tratamentos, sugerindo que os três tipos de açúcares parecem atuar de forma semelhante na regulação da 1-FEH, reduzindo significativamente sua atividade e sua expressão (Figuras 24 E,F; 25 E,F e 26 E,F). Esses dados são consistentes com outros estudos que mostram que a sacarose inibe a atividade *in vitro* da 1-FEH como o de Asega *et al.* (2008) em *V. herbacea*, De Roover *et al.* (2009) em *C. intybus* e Marx *et al.* (1997) em *H. tuberosus*.

A análise da expressão relativa do gene *1-FEH* mostra que tanto na parte aérea (figuras 25E e 26E) quanto nos rizóforos (figuras 25F e 26F) a expressão foi mais elevada nas plantas controle, submetidas ao déficit de carbono. Quando transferidas para meio de cultura suplementado com carbono, verificou-se que a quantidade relativa do transcrito no primeiro dia de cultivo diminuiu tanto em rizóforos quanto na parte aérea, nos três tratamentos, sendo o resultado consistente para ambos os genes de referência.

Os dados estão de acordo com os observados na literatura, em que plantas submetidas a condições que limitaram a fotossíntese e a disponibilidade de açúcares induziram ao aumento da atividade do gene *1-FEH*, como a desfolha em *V. herbacea* (Asega *et al.* 2008), *Dactylis glomerata* (Yamamoto & Mino 1989) e *Lolium perene* (Morvan *et al.* 1997) ou baixas temperaturas em *V. herbacea* (Asega *et al.* 2008), *C. intybus* (Van den Ende *et al.* 2000) e *Triticum aestivum* (Van den Ende *et al.* 2005).

A redução na expressão relativa do gene *1-FEH* foi acompanhada pela redução na atividade enzimática, indicando a existência de um mecanismo de regulação transcricional para esse gene, influenciado direta ou indiretamente pelos teores internos de açúcares. Os resultados das análises de atividade e expressão do gene *1-FEH* observados nesse experimento estão de acordo com os observados previamente para o gene (Asega *et al.* 2008, Asega *et al.* 2011) e são consistentes com o papel da 1-FEH na mobilização das reservas de frutanos.

O baixo teor de frutanos observado em rizóforos de plantas controle (tabela 13) indica que o período de sete dias de cultivo em déficit de carbono iniciou a condição de déficit energético e mobilização de reservas, e que a transferência das plantas para o meio de cultura suplementado com sacarose, frutose ou glucose, promoveu a reversão desse déficit energético.

As análises indicam que sacarose, frutose e glucose atuam de forma semelhante na regulação do metabolismo de frutanos. A incubação na presença desses carboidratos no meio

de cultura promoveu o aumento da atividade/expressão do gene 1-SST e diminuição do gene 1-FEH, resultados esses que estão de acordo com a hipótese de um mecanismo de regulação único, porém com efeito inverso para os genes 1-SST e 1-FEH (Morvan *et al.* 1997, Asega & Carvalho 2004). A suplementação com esses açúcares também promoveu o aumento na expressão do gene *1-FFT* a qual não foi acompanhada do aumento na atividade enzimática, indicando a existência de algum mecanismo de regulação pós transcricional ou uma inconsistência circunstancial entre a atividade enzimática e a expressão gênica.

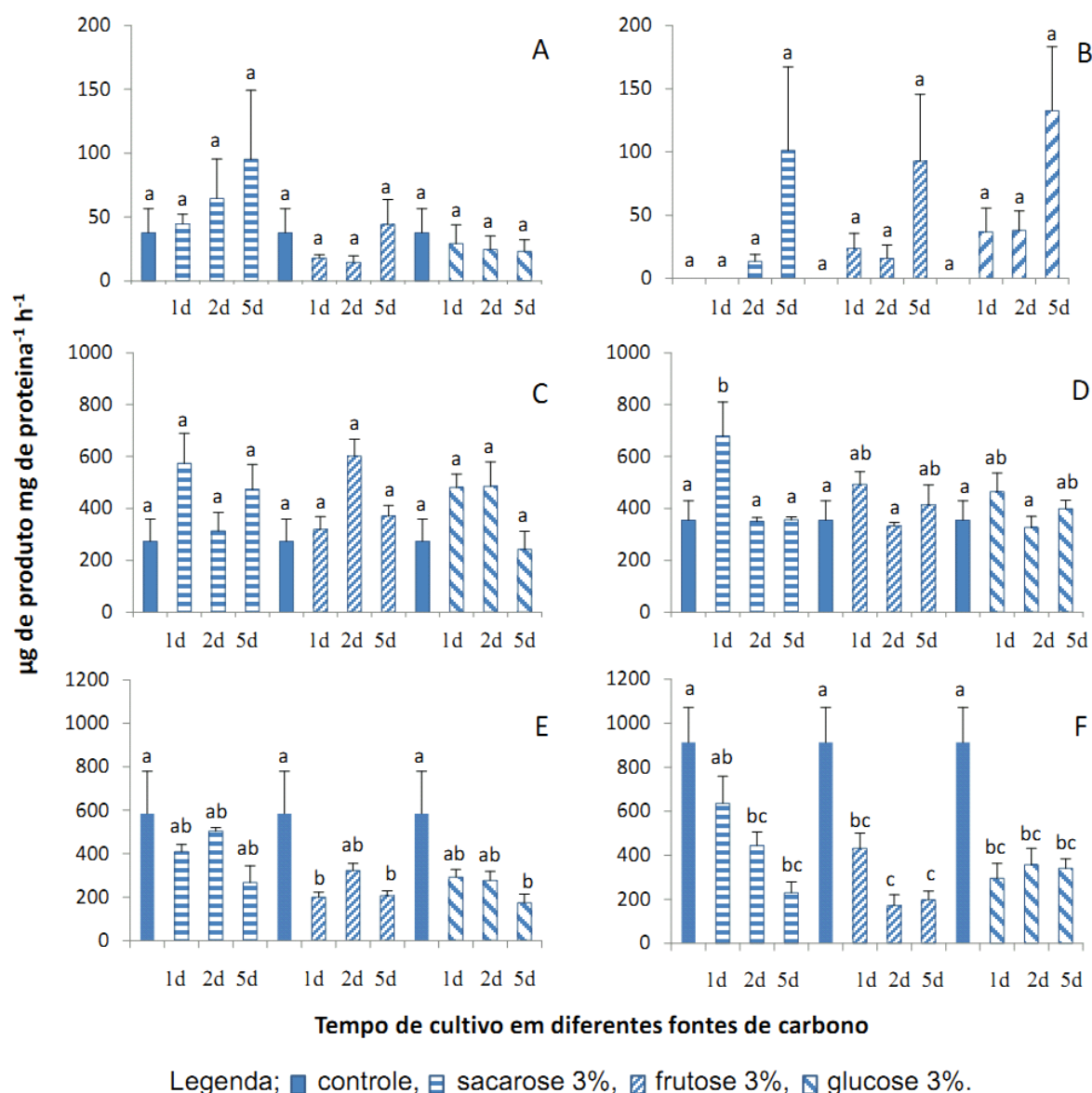


Figura 24. Atividades específicas de 1-SST, 1-FFT e 1-FEH em plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro* na ausência de carbono e, em seguida, submetidas a diferentes fontes de carbono: 1-SST - A) parte aérea, B) rizóforo; 1-FFT - C) parte aérea, D) rizóforo; 1-FEH - E) parte aérea, F) rizóforo. Valores indicam a média de 3 repetições, as barras indicam o erro padrão. Letras comparam as médias nos diferentes tempos e tratamentos diferem pelo teste de Tukey $P < 0,05$. A) DP: 39,2 CV: 99,3; (B) DP: 56,3 CV: 124,2; (C) DP: 134,3 CV: 32,5; (D) DP: 110,1 CV: 26,4; (E) DP: 125,0 CV: 38,7; (F) DP: 142,5 CV: 35,5.

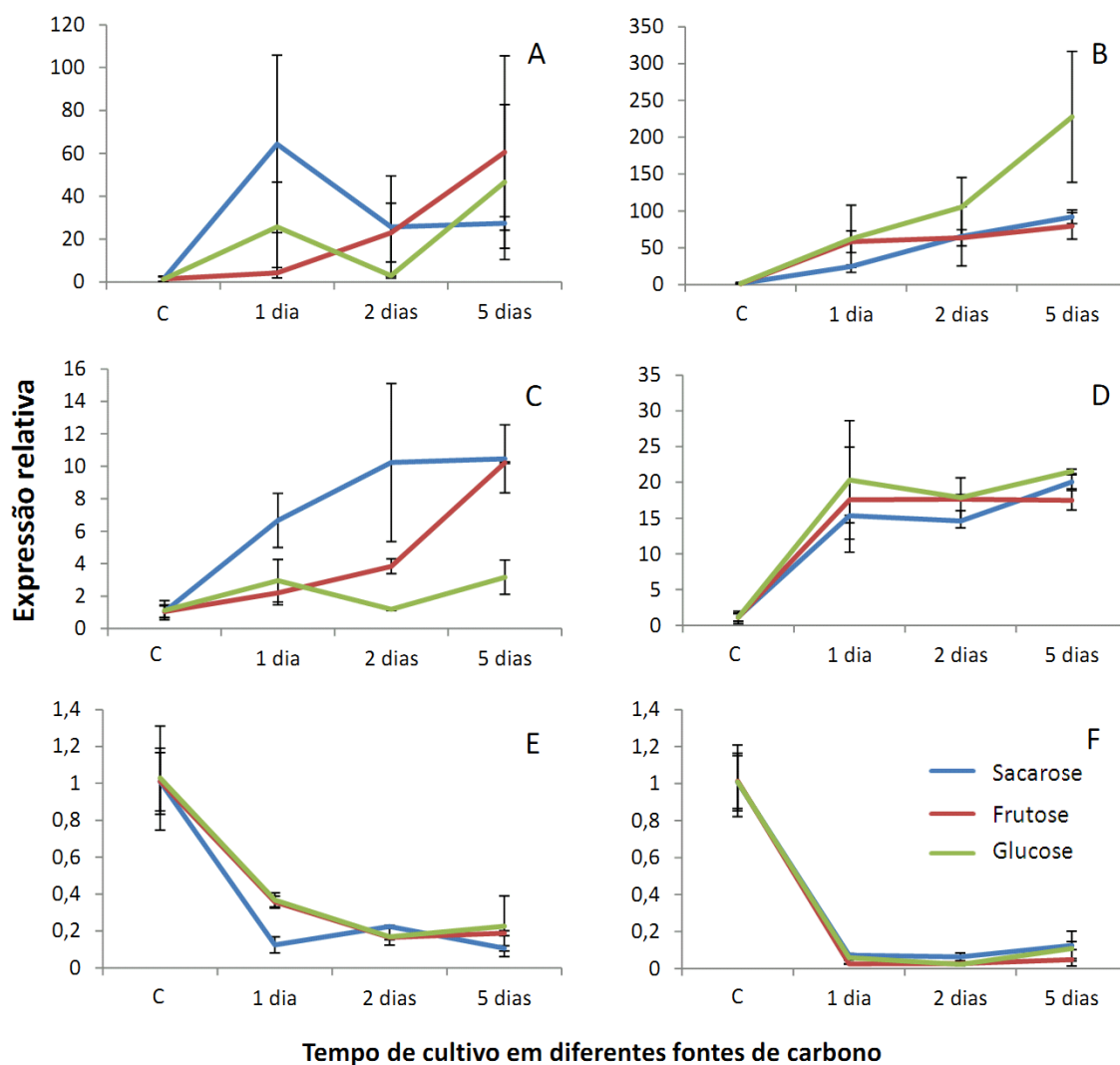


Figura 25. Expressão relativa dos genes *1-SST*, *1-FFT* e *1-FEH*, utilizando o gene *18S* como referência, em plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro* na ausência de carbono (C – controle) e, em seguida, submetidas a diferentes fontes de carbono. *1-SST* - A) parte aérea, B) rizóforo; *1-FFT* - C) parte aérea, D) rizóforo; *1-FEH* - E) parte aérea, F) rizóforo. As barras representam $\pm$ erro padrão (n=2).

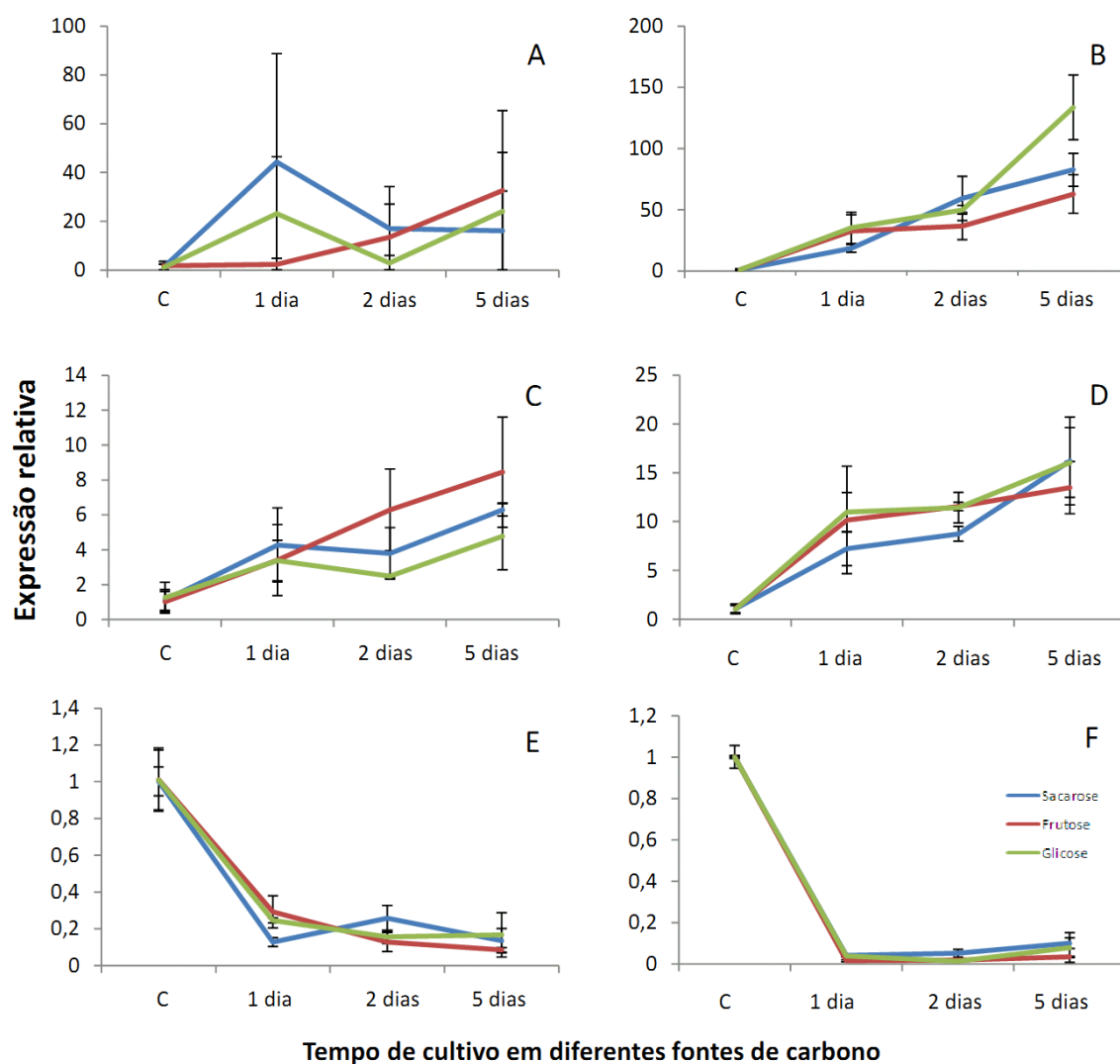


Figura 26. Expressão relativa dos genes *1-SST*, *1-FFT* e *1-FEH*, utilizando o gene *EF* como referência, em plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro* na ausência de carbono (C – controle) e, em seguida, submetidas a diferentes fontes de carbono. *1-SST* - A) parte aérea, B) rizóforo; *1-FFT* - C) parte aérea, D) rizóforo; *1-FEH* - E) parte aérea, F) rizóforo. As barras representam $\pm$ erro padrão (n=2).

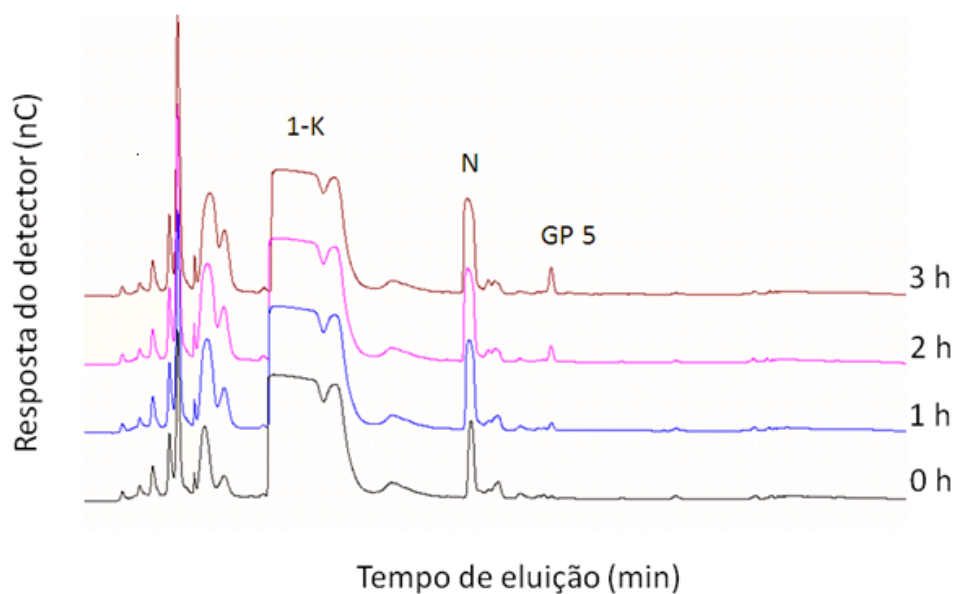


Figura 27. Perfis cromatográficos por HPAEC/PAD dos produtos de incubação da 1-FFT de rizóforos de plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro*, utilizando o trissacarídeo 1-cestose como substrato (1-K – GP 3) em diferentes tempos de incubação. N – nistose (GP 4) e GP 5, frutano com GP 5.

4.4.2 Efeito de diferentes concentrações de sacarose

Plantas de *V. herbacea* com 5 meses de idade, obtidas por brotação de segmentos de rizóforos oriundos do cultivo *in vitro* foram cultivadas por 30 dias em meio de cultura suplemetantado com 0, 3, 6 e 9 % de sacarose.

O cultivo de plantas em meio de cultura sem sacarose (tabela 14) promoveu o intenso consumo das reservas das plantas, levando a uma diminuição do teor de frutose total na parte aérea de 72,5 para 0,16 mg g⁻¹ de massa seca e em rizóforos de 108,6 para 24,8 mg g⁻¹ de massa seca. Já o cultivo em meio de cultura suplementado com 6 e 9% de sacarose promoveu um aumento no conteúdo de frutose total de 1,5 e 3,2 vezes na parte aérea e 2,8 e 3,7 vezes em rizóforos, respectivamente. Os conteúdos mais elevados tanto na parte aérea quanto nos rizóforos foram observados no meio contendo 9% de sacarose (230,9 e 408,5 mg g⁻¹ de massa seca, respectivamente).

Neste experimento o teor de frutose nos rizóforos, 408,5 mg g⁻¹ de massa seca foi mais próximo ao de 607,2 mg g⁻¹ de massa seca observado em rizóforos de plantas cultivadas em casa de vegetação. Maior acúmulo de frutanos em plantas cultivadas *in vitro* em meio de cultivo suplementado com doses elevadas de sacarose também foi verificado em *Agave tequilana* e *A. inaequidens*, nas quais a transferência de plantas cultivadas em meio de cultura suplementado com 3% para 8% de sacarose promoveu o aumento na expressão dos genes *1-SST* e *1-FFT* e consequentemente maior acúmulo de frutanos (Suarez-González *et al.* 2013).

Os resultados da análise qualitativa por HPAEC/PAD (figura 28) indicaram a presença da série homóloga da inulina na parte aérea e nos rizóforos em todas as concentrações de sacarose utilizadas. Entretanto na ausência da fonte de carbono foram observados apenas traços da série homóloga da inulina em ambos tecidos. Não foram observadas diferenças no padrão de distribuição das moléculas de inulina entre os tratamentos com 3, 6 e 9% de sacarose, mas a comparação entre parte aérea e rizóforos mostra uma maior proporção de hexoses (glucose e frutose) na parte aérea.

A concentração de 9% de sacarose no meio de cultura estimulou a produção de inulina nos tecidos *in vitro*, enquanto a ausência de sacarose propiciou o consumo das reservas das plantas. Essa dependência de fonte de carbono externa e o consumo elevado da reserva pode ser explicada pela baixa taxa fotossintética normalmente observada em plantas cultivadas *in vitro* (Grout 1988).

O potencial osmótico reduziu gradativamente com o aumento da concentração de sacarose meio de cultura, de -0,34 para -0,92 MPa em meio de cultura com 0 e 9% de

sacarose, respectivamente (figura 29). Garcia e colaboradores (2011) associaram valores de potencial osmótico do solo de -1 MPa com o aumento da atividade das enzimas de síntese de frutanos em plantas. Logo, além da maior disponibilidade de sacarose, o baixo potencial osmótico observado em meio de cultura suplementado com 9% de sacarose pode ter contribuído para o maior acúmulo de frutanos observado nesse tratamento.

Tabela 14. Conteúdo de frutose total na parte aérea e no rizóforo de plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose por 30 dias. Os valores representam a média de 4 repetições. Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey, $P < 0,01$.

Sacarose (%)	Frutose total mg g ⁻¹ de massa seca	
	Parte aérea ⁽¹⁾	Rizóforo ⁽²⁾
0	0,16 a	24,80 a
3	81,03 ab	98,38 a
6	108,84 b	305,04 b
9	230,90 c	408,57 c

(1) DP=41,4; CV= 39,3 ; (2) DP= 48,6; CV = 23,2.

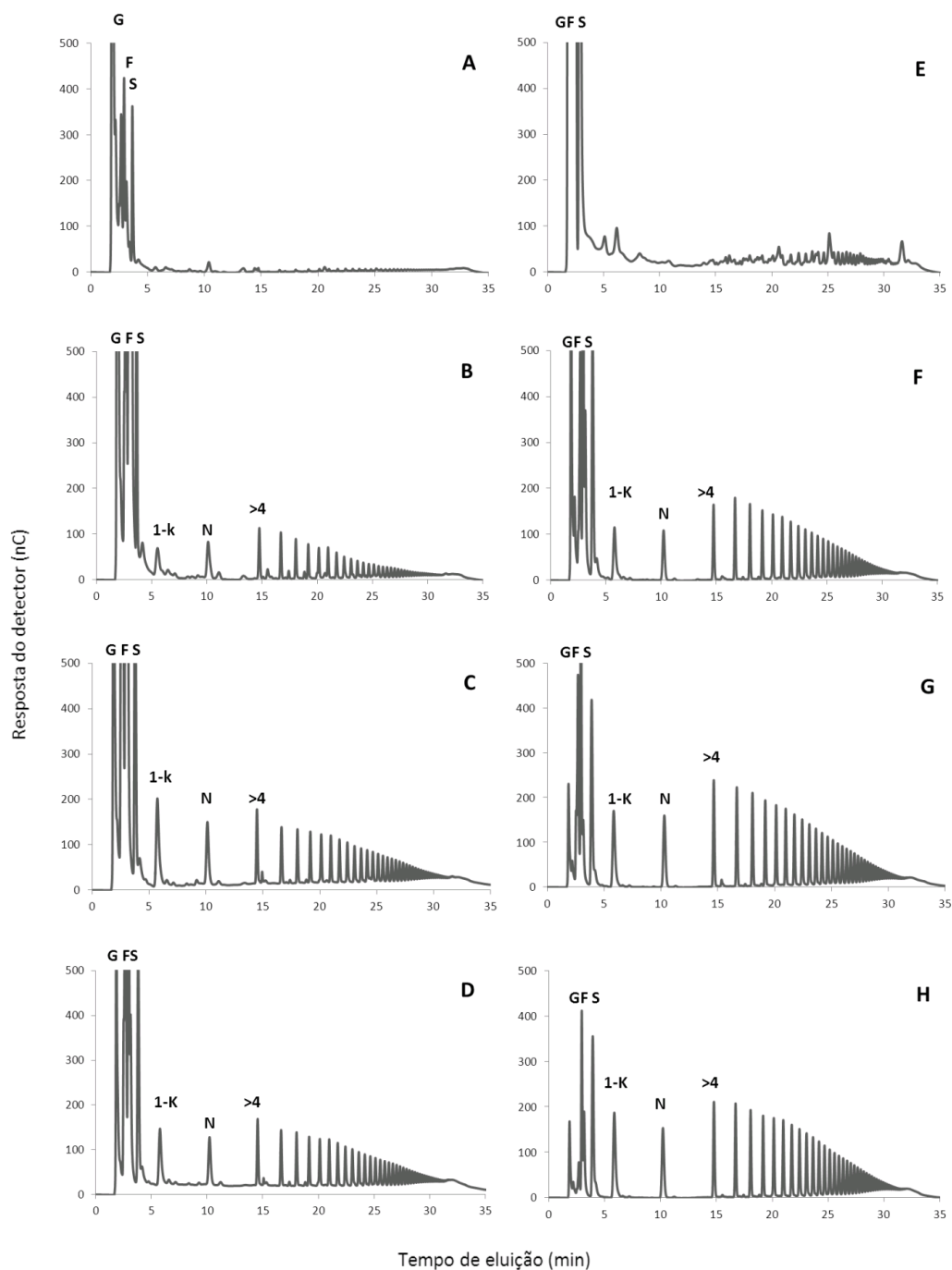


Figura 28. Perfis cromatográficos por HPAEC/PAD dos carboidratos solúveis de plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro* por 30 dias em diferentes concentrações de sacarose. Parte aérea: A) 0%; B) 3%; C) 6%; E) 9%. Rizóforo: E) 0%; F) 3%; G) 6%; H) 9%. G, F, S, 1-K, N e >4 referem-se aos tempos de eluição de glucose, frutose, sacarose, 1-cestose, nistose e frutanos com grau de polimerização maior que 4, respectivamente.

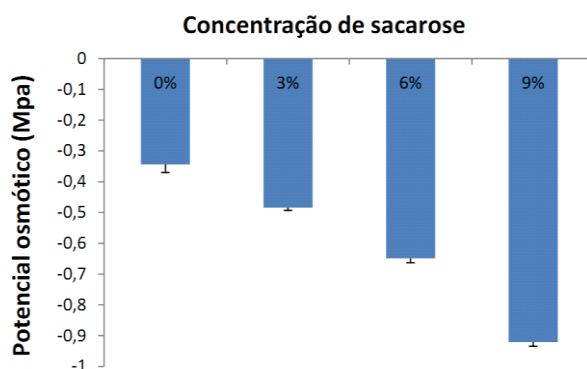


Figura 29. Potencial osmótico do meio de cultura MS $\frac{1}{2}$ macronutrientes sem fonte de carbono e com diferentes concentrações de sacarose. Os valores representam a média de três repetições e as barras representam o desvio padrão da média (n=3).

A atividade das enzimas 1-SST, 1-FFT e 1-FEH foram calculadas com base nos tempos de incubação de 4, 2 e 3 h, respectivamente.

A atividade da 1-SST apresentou um padrão de atividade semelhante na parte aérea (figura 30A) e nos rizóforos (figura 30B), sendo próxima de zero na ausência de sacarose, aumentando linearmente com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultura. Sob 9% de sacarose, a atividade enzimática média observada foi de 595,4 e 969,6 μg de produto mg de proteína⁻¹ hora⁻¹ para parte aérea e rizóforos, respectivamente, valores cerca de 34 e 334 vezes maiores aos observados no cultivo sem sacarose.

Segundo Kusch e colaboradores (2009), além de servir como substrato para a síntese de frutanos, a sacarose atua na regulação do gene 1-SST, estimulando sua transcrição quando em altas concentrações. Para esses autores, a relação entre carbono e nitrogênio no cultivo *in vitro* tem um papel determinante no estímulo à síntese de frutanos. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com essas observações uma vez que tanto na parte aérea como nos rizóforos a sacarose promoveu aumento na atividade da enzima 1-SST, propiciando um maior acúmulo de frutanos.

Com relação à 1-FFT na parte aérea (figura 30C), observou-se que, semelhantemente à 1-SST, ocorreu um aumento linear da atividade em função do aumento da concentração de sacarose no meio de cultivo, sendo que em 9% de sacarose a atividade enzimática foi de 891,2 μg de produto mg de proteína⁻¹ hora⁻¹, cerca de 5 vezes maior do que a detectada no cultivo sem sacarose.

Em rizóforos, embora as variações apresentadas na atividade da 1-FFT não foram significativas (figura 30D), observou-se uma diminuição entre as plantas cultivadas na

ausência de sacarose (745,7 μg de produto mg de proteína⁻¹ hora⁻¹) e as que receberam 3% deste açúcar no meio (406,9 μg de produto mg de proteína⁻¹ hora⁻¹). A partir desta concentração, verificou-se aumento significativo da atividade, sendo que no tratamento com 9% de sacarose a atividade enzimática observada foi de 1021,5 μg de produto mg de proteína⁻¹ hora⁻¹.

A atividade da 1-FEH (figuras 30E e 30F) em meio de cultura livre de sacarose foi de 504,3 e 1294,2 μg de produto mg de proteína⁻¹ hora⁻¹ para parte aérea e rizóforos, respectivamente. Já no cultivo em meio suplementado com sacarose, a atividade foi inferior e não apresentou variação entre os tratamentos com 3, 6 e 9% de sacarose. A média da atividade, considerando as 3 concentrações de sacarose foi de 198,5 e 302,3 μg de produto mg de proteína⁻¹ hora⁻¹ para parte aérea e rizóforos, respectivamente. Os resultados indicam que, ao contrário do observado para as enzimas de síntese, a 1-FEH teve sua atividade inibida já aos 3% de sacarose no meio de cultura.

Esses resultados evidenciam o papel da sacarose na regulação 1-FEH inibindo sua atividade, conforme demonstrado para *H. tuberosus* (Marx *et al.* 1997) e *V. herbacea* (Asega *et al.* 2008) e estão de acordo com o observado no experimento sobre o efeito de diferentes fontes de carbono no metabolismo de plantas cultivadas *in vitro* (figura 24). São também consistentes com o papel desta enzima na despolimerização de frutanos conforme modelo proposto por Edelman & Jefford (1968) para o metabolismo de frutanos em tubérculos de *Helianthus tuberosus* e confirmado por Koops & Jonker (1996) e Lucher *et al.* (1996).

O cultivo por 30 dias na ausência de sacarose promoveu a atividade da 1-FEH e inibiu a 1-SST em rizóforos e parte aérea. Já o cultivo em meio com diferentes concentrações de sacarose promoveu um efeito intenso na regulação da atividade enzimática, inibindo a atividade da 1-FEH a partir de 3% e promovendo a atividade da 1-SST, proporcionalmente ao aumento da concentração de sacarose no meio. A 1-FFT apresentou um aumento na atividade proporcional ao aumento na concentração de sacarose na parte aérea, enquanto em rizóforos a atividade foi mais elevada (799,3) na ausência de sacarose, seguida de uma menor atividade no tratamento 3% de sacarose (350,7) e posterior aumento com o aumento da concentração de sacarose.

Esses resultados indicam uma regulação diferenciada das atividades das enzimas 1-SST e 1-FFT em rizóforos, sugerindo a existência de um mecanismo de regulação diferencial entre os genes. Esses resultados contrastam com os obtidos por Kusch e colaboradores (2009) em *C. intybus* em que bloqueadores de canais de cálcio preveniram a

indução das enzimas 1-SST e 1-FFT de forma semelhante, sugerindo um mecanismo de regulação comum.

Uma possível explicação para a diferença entre o padrão da atividade enzimática (figura 24C e D) e o padrão da expressão relativa (figuras 25C e D; 26C e D) da 1-FFT poderia ser a existência de um mecanismo de regulação pós-transcricional. Outra possibilidade é a existência de mais de uma isoforma desse gene, sendo uma preferencialmente expressa em condições que favoreçam a síntese, enquanto, a outra em condições que favoreçam a despolimerização.

A alta atividade da 1-FFT observada apenas em rizóforos na ausência de sacarose sugere um papel desta enzima no processo de mobilização da inulina armazenada em associação à 1-FEH em rizóforos de *V. herbacea*. O aumento da atividade da 1-FFT juntamente com a 1-FEH em situações que induzem a despolimerização de frutanos foi observada em raízes de *C. intybus* cultivadas *in vitro* sob baixas temperaturas (Kusch *et al.* 2009). Em *V. discolor*, a atividade estável após a desfolha foi associada ao papel multifuncional da 1-FFT (Degasperi *et al.* 2003). Em *V. hebbacea* a desfolha promoveu a redução na atividade da 1-SST e aumento na 1-FEH, enquanto a atividade da 1-FFT foi constante ao longo do período analisado, o que pode ser associado ao papel da enzima na síntese e na mobilização dos frutanos (Asega & Carvalho 2004).

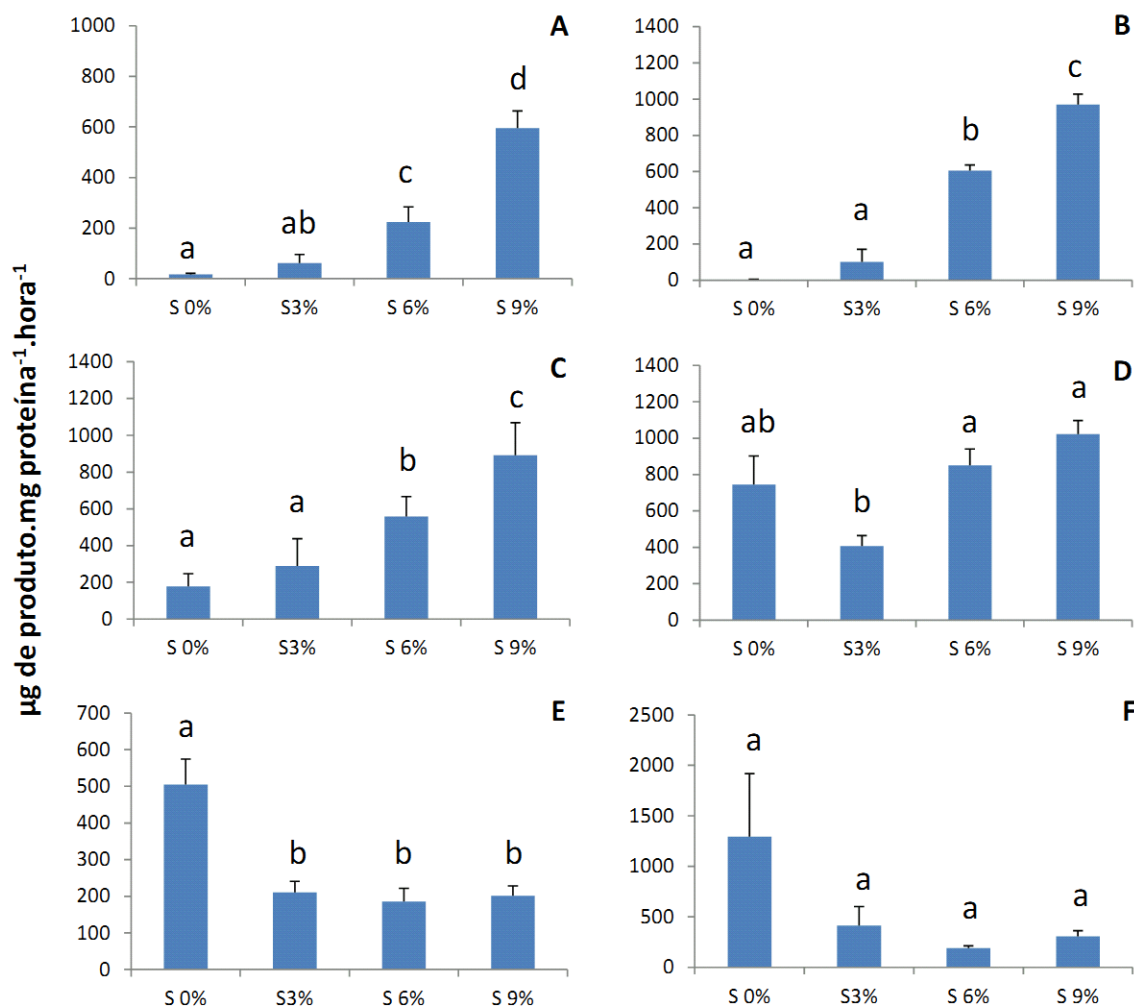


Figura 30. Atividade específica das enzimas do metabolismo de frutanos em plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose por 30 dias. 1-SST - A) Parte aérea, B) Rizóforo ; 1-FFT - C) Parte aérea, D) Rizóforo; 1-FEH - E) Parte aérea, F) Rizóforo. Valores indicam a média de 4 repetições, as barras indicam o erro padrão. Letras comparam as médias nos diferentes tempos e tratamentos diferem pelo teste de Tukey $P < 0,05$. (A) DP: 95.8, CV: 42.6; (B) DP: 96.3, CV: 22.9; (C) DP: 264.1, CV: 55.0; (D) DP: 203.9, CV: 29.9; (E) DP: 88.4, CV: 32.1; (F) DP: 655.4, CV: 119.1.

5 CONCLUSÃO

A utilização de aquênios de *Vernonia herbacea* como explantes permitiu o estabelecimento do cultivo de plantas *in vitro*, e o enraizamento de segmentos nodais oriundos dessas plantas permitiu a sua multiplicação. No entanto, o crescimento lento nas condições utilizadas limitou a utilização da técnica para a multiplicação de plantas.

O cultivo *in vitro* promoveu alterações na razão fonte/dreno em plantas de *Vernonia herbacea*, promovendo o acúmulo de inulina na parte aérea associado ao lento crescimento e baixo acúmulo em rizóforos.

O cultivo de explantes foliares em meio de cultura suplementado com diferentes reguladores não induziu a regeneração de gemas ou embriões adventícios, no entanto, permitiu a obtenção de duas linhagens de calos, uma compacta (BAP) e outra friável (AIB). A comparação do metabolismo de frutanos nas duas linhagens identificou a influência do balanço auxina/citocinina em sua regulação.

O sequenciamento parcial do cDNA dos genes *EF*, *1-FFT* e *1-SST* permitiu a construção de *primers* específicos para as análises de qRT-PCR, e a análise filogenética dos genes *1-SST* e *1-FFT* mostrou que as sequências de *V. herbacea* apresentaram maior similaridade com os respectivos genes de outras espécies de Asteraceae do que com os de Poaceae.

A avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono indicou que o déficit energético estimulou a atividade e expressão da 1-FEH e inibiu a da 1-SST, sendo o inverso observado quando o déficit energético foi interrompido. A expressão da *1-FFT* acompanhou o padrão observado para *1-SST*, mas não apresentou correlação com a atividade enzimática. Os resultados indicaram que sacarose, frutose e glucose atuam de forma semelhante na regulação do metabolismo de frutanos em *V. herbacea*.

A avaliação do efeito de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura indicou que concentrações mais elevadas de sacarose (9%) promoveram um aumento no teor de frutanos das plantas, sendo esse aumento associado à redução da atividade da 1-FEH e ao aumento da atividade das enzimas 1-SST e 1-FFT. O cultivo em meio de cultura livre de sacarose promoveu aumento na atividade da 1-FEH e 1-FFT nos rizóforos, indicando o papel dessas enzimas no processo de despolimerização. Os resultados sugerem a existência de um mecanismo independente para a regulação dos genes 1-SST e 1-FFT.

Os resultados obtidos reforçam o papel da sacarose na regulação do metabolismo de frutanos e mostram que a técnica de cultivo *in vitro* apresenta um grande potencial para estudos do metabolismo de frutanos.

6 PERSPECTIVAS

O trabalho foi pioneiro no cultivo *in vitro* de *Vernonia herbacea* e cria a possibilidade de realização de novos ensaios visando à melhor compreensão dos mecanismos de regulação do metabolismo de frutanos, como por exemplo, a avaliação do papel do potencial osmótico, de alterações nutricionais e da influência do balanço auxina/citocinina.

A obtenção de sequências parciais dos genes envolvidos na síntese de frutanos facilita a clonagem futura desses genes e de estudos envolvendo a expressão heteróloga ou de transformação genética.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asega, A.F. & Carvalho, M.A.M.** 2004. Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiology and Biochemistry* 34: 313-319.
- Asega, A.F.** 2003. Enzimas do metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 98p.
- Asega, A.F., Nascimento, J.R. & Carvalho, M.A.** 2011. Increased expression of fructan 1-exohydrolase in rhizophores of *Vernonia herbacea* during sprouting and exposure to low temperature. *Journal of Plant Physiology* 168: 558-65.
- Asega, A.F., Nascimento, J.R.O., Schroeven, L., Van den Ende, W. & Carvalho, M.A.M.** 2008. Cloning, characterization and functional analysis of 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Ruby. *Plant Cell Physiology* 49: 1185-1195.
- Baskin, C.C. & Baskin, J.M.** 2001. Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic. Press San Diego.
- Blakely, S.T., Mislo, B.L., Basi, N.S. & Painter, R.H.** 1995. Dietary fructose alters the insulin-like effects of dietary vanadate in adipocytes from rats. *Nutrition Research* 15: 25-35.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Capito, S.M.P. & Filisetti, T.M.C.C.** 1999. Inulina: Um ingrediente alimentar promissor. *Cadernos de nutrição* 18: 1-11.
- Cairns, A. J. & Pollock, C. J.** 1988. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. *New Phytologist* 109: 399-405.
- Carvalho, M. A. M. & Dietrich, S. M. C.** 1993. Variation in fructan content from underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby in different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Carvalho, M. A. M., Pinto, M. M. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21: 275-280.
- Carvalho, M. A. M., Zaidan, L. B. P. & Dietrich, S. M. C.** 1997. Growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. *New Phytologist* 136: 153-161.

- Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2001. Frutanos: ocorrência, estrutura e utilização, com ênfase em plantas do cerrado brasileiro. In *Fibra dietética em iberoamérica: tecnologia y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos* (F.M. Lajolo, F. Saura-Calixto, E.W. Penna & E.W. Menezes, eds.). Varela: São Paulo.
- Chalmers, J., Johnson, X., Lidgett, A. & Spangenberg, G.** 2003. Isolation and characterisation of a sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal of Plant Physiology* 160: 1385–1391.
- Coutinho, L.M.** 2002. Eugen Warming e o Cerrado Brasileiro: um século depois. A.L. Klein (org), Unesp/Imprensa oficial do Estado de São Paulo. São Paulo.
- Cury, G.** 2008. Sistemas subterrâneos de Asteraceae do Cerrado paulista: abordagens anatômica, ecológica e reprodutiva. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 95p.
- Cuzzuol, G. R. F., Carvalho, M. A. M. & Zaidan, L. B. P.** 2008. Fructan production in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby is related to adequate nitrogen supply and period of cultivation. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 95-103.
- Cuzzuol, G. R. F., Carvalho, M. A. M., Barbedo, C. J. & Zaidan, L. B. P.** 2003. Crescimento e produção de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas à adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 81-91.
- Cuzzuol, G. R. F., Carvalho, M. A. M., Zaidan, L. B. P. & Furlani, P. R.** 2005. Soluções nutritivas para cultivo e produção de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 911-917.
- Darbyshire, B. & Henry, R.J.** 1978. The distribution of fructan in onions. *New Phytologist* 81: 29-34.
- De Klerk, G. J., Keppel, M., Ter Brugge, J. & Meekes, H.** 1990. Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. *Journal of Experimental Botany* 46: 965-972.
- De Roover, J., Van den Branden, K., Van Laere, A. & Van den Ende, W.** 2000. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose 1-fructosyl transferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L). *Planta* 210: 808–814.
- De Roover, J., Van Laere, A., De Winter, M., Timmermans, J. & Van Der Ende, W.** 1999. Purification and properties of a second fructan exohydrolase from roots of *Cichorium intybus*. *Physiology plant* 106: 28-34.

- 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. Fructans interact strongly with model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 1375: 36-42.
- Edelman, J. & Jefford, T.G.** 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* 67: 517-531.
- Ehneß, R. & Roitsch, T.** 1997. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *C. rubrum* by cytokinins. *Plant Journal* 11: 539-548.
- Eiten, G.** 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review* 38: 201-341.
- Felippe, G.M. & Dale, J.E.** 1990. The effects of phosphate supply on growth of plants from the Brazilian Cerrado: experiments with seedlings of annual weed, *Bidens gardneri* Baker (Compositae) and the tree, *Qualea grandiflora* (Mart.) (Vochysiaceae). *Oecologia* 82: 81-86.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Dietrich, S.M.C., Chu, E.P., Carvalho, M.A.M.; Vieira, C.C.J. & Graziano, T.T.** 1986. Reserve carbohydrate in underground organs of native brazilian plants. *Revista Brasileira de Botânica* 9: 159-166.
- Fukai, K., Ohno, S., Goto, K., Nanjo, F. & Hara, Y.** 1997. Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science & Plant Nutrition* 43: 171–177.
- Gallagher, J.A., Cairns, A.J. & Turner, L.B.** Fructan in temperate forage grasses: agronomy, physiology and molecular biology. In: Shiomi N, Benkeblia N, Onodera S, eds. Recent advances in fructo-oligosaccharides research. Trivandrum, India: Research Signpost, 2007. P. 15–46.
- Garcia, P.M.A., Asega, A.F., Silva, E.A. & Carvalho, M.A.M.** 2011. Effect of drought and re-watering on fructan metabolism in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 664-670.
- Gechev, T.S., Van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I. & Laloi, C.** 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioassays* 28: 1091-1101.
- George, E.F.; Hall, M.A. & De Klerk, J.** 2008. Plant propagation by tissue culture 3rd Edition. Springer. Aberystwyth.

- Grigoriadou, K.; Krigas, N. & Maloupa, E.** 2011. GIS-facilitated *in vitro* propagation and *ex situ* conservation of *Achillea ocuta*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 107: 531-540.
- Grout, B.W.W.** 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro* and the stress of transplanting. Acta Horticulturae 230: 125-135.
- Guerra, M.P. & Nodari, R.O.** Apostila de biotecnologia: introdução ao conceito de biotecnologia. LFDGV/CCA – UFSC: D.A. Steinmacher, 2006. 41p. (Material de Apoio) , Disponível em: <http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila%20Biotecnologia.pdf>. Acesso em: 30 set. 2007.
- HaaB, D., Abou-Mandour, A.A., Blaschek, W., Franz, G. & Czygan, F.C.** 1991. The influence of phytohormones on growth, organ differentiation and fructan production in callus of *Symphytum officinale* L. Plant Cell Reports 10: 421-424.
- Hale, A.D., Pollock, C.J. & Dalton, S.J.** 1987. Polysaccharide production in liquid cell suspension cultures of *Phleum pratense* L. Plant Cell Report 6: 435-438.
- Handro, W. & Floh, E.I.S.;** Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: Torres, A.C. & Caldas, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCT/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.203-212.
- Hansen, H. & Grossmann, K.** 2000. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. Plant Physiology 124: 1437-1448.
- Haully, M.C.O. & Moscatto, J. A.** 2002. Inulina e Oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prebiótico e importância na indústria de alimentos. Ciências Exatas e Tecnológica 23: 105-118.
- Hazarika, B.N.** 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Science 85: 1704-1712.
- Hellwege, E.M., Czapla, S., Jahnke, A., Willmitzer, L. & Heyer, A.G.** 2000. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97: 8699–8704.
- Hellwege, E.M., Raap, M., Gritscher, D., Willmitzer, L. & Heyer, A. G.** 1998. Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. FEBS Letters 427: 25-28.

- Hendry, G.A.F. & Wallace, R.K.** The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: Suzuki, M. & Chatterton J.N, (eds). Science and Technology of Fructans. CRC Press, Boca Raton, 1993. p. 119-139.
- Hendry, G.A.F.** 1987. The ecological significance of fructan in a contemporary flora. *New Phytologist* 106: 201-216.
- 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.** 1995. Fructan and the ecology and evolution of the Compositae - The Compositae. Royal Botanic Gardens. Kew.
- Hincha , D.K., Popova, A.V. & Cacela, C.** 2006. Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, Vol. 3, A. Leitmanova Liu, (Ed.), Elsevier, Amsterdam.
- Hincha, D.K., Hellwege, E.M., Heyer, A.G. & Crowe, J.H.** 2000. Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *European Journal of Biochemistry* 267: 535-540.
- Hincha, D.K., Zuther, E., Hellwege, E.M. & Heyer, A.** 2002. Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* 12: 103-110.
- Irvani, N., Solouki, M., Omid, M., Zare, A.R. & Shahnazi, S.** 2010. Callus induction and plant regeneration in *Dorema ammoniacum* D., an endangered medicinal plant. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100: 293–299.
- Isejima, E.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1991. Partição de matéria seca durante o desenvolvimento de *Viguiera discolor*. *Revista Brasileira de Botânica* 14: 107-114.
- Isejima, E.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1993. Dynamics of fructans in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by phenology. *Plant Cell Physiology* 34: 723-727.
- Itaya, N.M., Asega, A.F., Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2007. Hydrolase and fructosyltransferase activities implicated in the accumulation of different chain size fructans in three Asteraceae species. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 647-56.
- Itaya, N.M., Vaz, A.P.A., Kerbauy, G.B. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2005. Produção de frutanos em calos e plântulas clonadas in vitro de *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) *Acta Botanica Brasilica* 19: 579-586.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. & Gibson, T.J.** 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Science* 23: 403-405.

- Jermyn, M.A.** 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature* 177: 38-39.
- Kandler, O. & Hopf, H.** Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. In: Preiss, J. (Ed) *The Biochemistry of Plants*, New York: Academic Press. 1980. p.221-270.
- Kawakami, A., Sato, Y. & Yoshida, M.** 2008. Genetic engineering of Rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *Journal of Experimental Botany* 59: 793-802.
- Kerbaudy, G.B.** 2008. *Fisiologia vegetal* 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara.
- Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van den Ende, W. & Cuypers, A.** 2013. Plants sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant Cell Environment* doi:10.1111/pce.12061
- Koda, Y. & Okazawa, Y.** 1983. Influence of environmental, hormonal and nutritional factors on potato tuberization *in vitro*. *Japanese Journal of Crop Science* 52: 582-591.
- 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 tuber of *Helianthus tuberosus* "Colombia": II Purification of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferases and reconstitution of fructan synthesis *in vitro* with purified sucrose: sucrose fructosyltransferases and fructan: fructan fructosyltransferases. *Plant Physiology* 110: 1167-1175.
- Koroleva, O.A., Tomos, A.D., Farrar, J.F., Gallagher, J. & Pollock, C.J.** 2001. Carbon allocation and sugar status in individual cells of barley leaves affects expression. Of Sucrose: fructan 6-fructosyltransferase gene. *Annals of Applied Biology* 138: 27-32.
- Kosaric, N., Cosentino, G.P. & Wieczorek, A.** 1984. The Jerusalem artichoke as an agricultural crop. *Biomass* 5: 1-36.
- Kusch, U., Greine, S., Meyer, A.D., Corbière-Diviale, H., Harms, K. & Rausch, T.** 2009. Dissecting the regulation of fructan metabolism in chicory (*Cichorium intybus*) hairy roots. *New Phytologist* 184:127-140.
- Lajolo, F.M.** Alimentos funcionais. 1998. Notícias SBAN. Informativo da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, São Paulo.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, L.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G.** 2007. Clustal W and X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

- Lentini, Z. & Earle, E. D.** 1991. *In vitro* tuberization of potato clones from different maturity groups. *Plant Cell Reports* 9: 691- 695.
- Livingston, D.P. & Henson, C.A.** 1998. Apoplastic sugars, fructans, fructan exohidrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiology* 116: 403-408.
- Lucena, L.R.F.** 2010. Desenvolvimento *in vitro* e imunolocalização de 5-metilcitosina em raízes tuberizadas e não tuberizadas de *Viguiera arenaria* Baker (Asteraceae). Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 67p.
- Lüscher, M., Hochstrasser, U., Boller, T. and Wiemken, A.** 2000. Isolation of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytologist* 145: 225–232.
- Luscher, M., Erdin, C., Sprenger, N., Hochstrasser, U., Boller, T. & Wiemkem, A.** 1996. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus*. *FEBS Letters* 385: 39-42.
- Maleux, K. & Van den Ende W.** 2007. Levans in excised leaves of *Dactylis glomerata*: effects of light, sugars, temperature and senescence. *Journal of Plant Biology* 50: 671–675.
- Mantovani, W. & Martins, F. R.** 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira Botânica* 11: 101-112.
- Maroufi, A., Bockstaele, E.V. & Loose, M.** 2010. Validation of reference genes for gene expression. Analysis in chicory (*Chichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *Molecular Biology* 11:15.
- Martinez-Noel, G.M.; Toggetti, J.A., Pontis, H.G.** 2001. Protein kinase and phosphatase activities are involved in fructan synthesis initiation mediated by sugars. *Planta* 213: 640-646.
- Marx, S.P, Nosberger, J. & Frehner, M.** 1997. Seasonal variation of fructan- β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β -(2,1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *New Phytologist* 135: 267-277.
- Mercier, H., Vieira, C.C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1992. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* – a Brazilian medicinal plant. *Plant Cell, tissue and Organ Culture* 28: 249-254.

- Moreira, M. F., Appezzato-Da-Gloria, B. & Zaidan, I.B.P.** 2000. Anatomical aspects of IBA-treated microcuttings of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. Brazilian Archives of Biology and Technology 43: 221-227.
- Morvan, A., Challe, G., Prud'homme, M.P., Le Saos, J. & Boucaud, 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.
- 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.
- Murashige, T.Q. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-479.
- Nelson, C.J. & Spollen, W.G.** 1987. Fructan. Physiologia Plantarum 71: 512-519.
- Niness, K.R.** 1999. Inulin and oligofructose: what they are? Journal of Nutrition 129: 1402-1406.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y. & Shigeoka S.** 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. Plant Physiology 147: 1251-1263.
- Noshad, D., Miresmaili, S., Riseman, A. & Ekramoddoullah, A.** 2009. *In vitro* propagation of seven *Daphne L.* species. Plant Cell Tissue and Organ Culture 96:201-209.
- Oliveira, V.F., Itaya, N. M., Floh, E. I. S. & Carvalho, M. A. M.** 2009. Frutanos em calos de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob. Hoehnea 36: 89-97.
- Oliveira, V.F., Zaidan, L.B.P., Braga, M.R., Aidar, M.P.M. & Carvalho, M.A.M.** 2010. Elevated CO² atmosphere promotes plant growth and inulin production in the cerrado species *Vernonia herbacea*. Functional Plant Biology 37: 223-231.
- Orthen, B.** 2001. Sprouting of the fructan- and starch-storing geophyte *Lachenalia minima*: Effects on carbohydrate and water content within the bulbs. Physiologia Plantarum 113: 308-314.
- Pak, N.** 2006. Inulina y fructooligasacáridos: propiedades nutricionales y funcionales. In: Carbohidratos em Alimentos Regionales Iberoamericanos (M.F. Lajolo & E. W. Menezes, eds.) edusp – Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 337-356.
- Peres, L.E.P.** 2002. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento 25: 44-48.

- Perez-Tornero, O., Tallon, C.I. & Porras, I.** 2010. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100: 263–271.
- Peshev, D., Vergauwen, R., Mioglia, A., Hideg, E. & Van den Ende, W.** 2013. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *Journal of Experimental Botany* 64:1025–1038.
- Pfaffl, M.W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.
- Pfaffl, M.W., Tichopád, A., Prgomet, C. & Neuvians, T.P.** 2004 Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26: 509-515.
- Pilon-Smits, E.A.H., Ebskamp, M.J.M., Paul, M.J., Jeuken, M.J.W., Weisbeek, P.J. & Smeekens, S.C.M.** 1995. Improved performance of transgenic fructan accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* 107: 125-130.
- Pilon-Smits, E.A.H.; Terry, N., Sears, T. & Van Dun, K.** 1999. Enhanced drought resistance in Fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 313-317.
- Pollock, C.J. & Cairns, A.J.** 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review Plant Physiology Molecular Biology*, 42: 77-101.
- Pollock, C.J., Cairns, A.J., Sims, I.M. & Housley, T.L.** Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. In: Zamski, E. & Shaffer, A.A. (eds). *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source – Sink Relationships*. Marcel Dekker Inc, New York. 1996. p. 97-113.
- Pontis, H. G. & del Campillo, E.** Fructans: Dey P. M. & Dixon, R. A. (eds). In *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*, Academic Press, London, 1985. p. 205–227.
- Portes, M.T. & Carvalho, M.A.M.** 2006. Spacial distribution of fructans metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell) Rusby (Asteraceae) 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 affects fructan metabolizing enzymes in different regions of the rhizophores of *Vernonia herbacea*. *Journal of Plant Physiologist* 165: 1572-1581.

- Rao, R.S.P., Andersen, J.R., Dionisio, G. & Boelt, B.** 2011. Fructan accumulation and transcription of candidate genes during cold acclimation in three varieties of *Poa pratensis* Journal of Plant Physiology 168: 344-351.
- Rehman, R.J., Israr, M. Srivastava, P.S., Bansai, K.C. & Abdin, M.Z.** 2003. *In vitro* regeneration of witloof chicorrey (*Cichorium intybus* L.) from leaf explants and acumulation of esculin. In vitro Cellular & Development Biology 39: 142-146.
- Ritsema, T. & Smeekens, S.C.M.** 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. Current Opinion in Plant Biology 6: 223-230.
- Roitsch, T.** 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. Current Opinion in Plant Biology 2: 198:206.
- Roitsch, T. & Ehneß, R.** 2000. Regulation of source/sink relations by cytokinins. Plant Growth Regulation 32: 359-367.
- Santa-Cruz, A., Martinez-Rodriguez M.M., Perez-Alfocea, F., Romero-Aranda, R. & Bolarin, M.C.** 2002. The rootstock effect on the tomato salinity response depends on the shoot genotype. Plant Science 162: 825-831.
- Santarius, K.A.** 1973. The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. Planta 113: 105–114.
- Saos, F.L.G., Hourmant, A., Esnault, F. & Chauvin, J.E.** 2002. *In vitro* Bulb Development in Shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum Group): Effects of Anti-gibberellins, Sucrose and Light. Annals Botany 89: 419-425.
- Sasaki, R.M., Rondon, J.N., Zaidan, L.B.P. & Felipe, G.M.** 1999. Germination of seeds from herbaceous plants artificially stored in cerrado soil. Revista Brasileira de Biologia 59: 271-279.
- Schroeven, L., Lammens, W., Kawakami, A., Yoshida, M., Van Laere, A. & Van den Ende, W.** 2009. Creating S-type characteristics in the F-type enzyme fructan:fructan 1-fructosyltransferase of *Triticum aestivum* L. Journal of Experimental Botany 60: 3687–3696.
- Scofield, G.N., Ruuska, S.A., Aoki, N., Lewis, D.C., Tabe, L.M. & Jenkins, C.L.D.** 2009. Starch storage in the stems of wheat plants: localization and temporal changes. Annals of Botany 103: 859–868.
- Skoog, F. & Miller, C.O.** 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposium of the Society of Experimental Biology 11: 118-231.

- Spollen, W.G. & Nelson, C.J.** 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* 106: 329-336.
- Stoyanova S, Geuns J, Hideg E & Van den Ende W.** 2011. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 62: 207–214.
- Suárez-González, E.M., López, M.G., Délano-Frier, J.P. & Gómez-Leyva.** 2013. Expression of the 1-SST and 1-FFT genes and consequent fructan accumulation in *Avave tequilana* and *A. inaequidens* is differentially induced by diverse (a)biotic-stress related elicitors. *Journal of Plant Physiology*.
- Taha, H.S., El-sawy, A.M. & Bekheet, S.A.** 2007. *In vitro* studies on jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus*). and enhancement of inulin production. *Journal of Applied Sciences Research* 3: 853-858.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. *Fisiologia vegetal – 3ª Edição*. Artmed. Porto Alegre.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Tamura, K., Sanada, Y., Tase, K. & Yoshida, M.** 2011. Pp6-FEH1 encodes an enzyme for degradation of highly polymerized levan and is transcriptionally induced by defoliation in timothy (*Phleum pratense* L.). *Journal of Experimental Botany* 62: 3421-3431.
- 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.
- Thorpe, T.A.** Morphogenesis and regeneration. In: Vasil, I.K.; Thorpe, T.A. (Ed.). *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. p.17-36.
- Torres, C.A., Caldas, L.S. & Buso, J.A.** 1999. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Serviço de Produção de Informação. Brasília.
- Van den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J., Verhaert, P. & Van Laere, A.** 2000. Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. *Plant Journal* 24: 447-458.
- Van den Ende, W. & Van Laere, A.** 1996. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during growth, storage and forcing. *Journal of Plant Physiology* 149: 43-50.
- Van den Ende, W. & Van Laere, A.** 2002. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment* 25: 803-813.

- Van den Ende, W., Yoshida, M., Clerens, S., Vergauwen, R. & Kawakami, A.** 2005. Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist* 166: 917-932.
- Van den Ende, W., Michiels, A., Van Wonterghem, D., Clerens, S., De Roover, J. & Van Laere, A.** 2001. Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEH IIA and 1-FEH IIB). Mass finger-print of the 1-FEH II enzymes. *Plant Physiology* 126: 1186–1195.
- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Boogaerts, D., Le Roy, K., Arckens, L. & Van Laere, A.** 2006. Cloning and functional analysis of a high DP fructan:fructan 1-fructosyl transferase from *Echinops ritro* (Asteraceae): comparison of the native and recombinant enzymes. *Journal of Experimental Botany* 57: 775–789.
- Van den Ende, W., De Roover, J. & Van Laere, A.** 1999. Effect of nitrogen concentration of fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 105: 2-8.
- Van Den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J. & Van Laere, A.** 2002. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal* 2: 1281-1295.
- Van den Ende, W., Michiels, A., Van Wonterghem, D., Clerens, S., De Rover, J. & Van Laere, A.** 2001. Defoliation induces 1-FEH II (fructan, 1-exohydrolase of two isoforms (1-FEH IIA AND feh IIB). Mass fingerprint of the 1-FEH enzymes. *Plant Physiologist* 126: 1186-1195.
- Van den Ende, W., Van Wonterghem, D., Verhaert, P., Dewil, E., De Loof, A. & Van Laere, A.** 1996. Purification and characterization of 1-SST, the key enzyme initiating fructan biosynthesis in young chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Physiology plant* 98: 455-466.
- Velten, S.B. & Garcia, Q.S.** 2005. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Eremanthus* (Asteraceae), ocorrentes na Serra do Cipó, MG Brasil. *Acta Botânica Brasileira* 19: 753-761.
- Vereyken, I.J., Chupin, V., Demel, R.A., Smeekens, S.C.M. & Kuijff, B.D.** 2001. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 1510: 307-320.

- Vergauwen, R., Van Laere, A. & Van den Ende, W.** 2003. Properties of Fructan:Fructan 1-Fructosyltransferases from Chicory and Globe Thistle, Two Asteracean Plants Storing Greatly Different Types of Inulin1. *Plant Physiology* 133: 1–11.
- Vieira, C.J., Braga, M.R. & Figueiredo-Ribeiro R. C. L.** 1995. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St. – Hill. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 42: 233-238.
- Vijn, I. & Smeekens S.** 1999. Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120: 351-359.
- Wang, C., Van den Ende, W. & Tillberg, J.** 2000. Fructan accumulation induced by nitrogen deficiency in barley leaves correlates with the level of sucrose : fructan 6-fructosyltransferase mRNA. *Planta* 211: 701-707.
- Wiemkem, A., Sprenger, N. & Boller, T.** Fructans – an extension of sucrose by sucrose. In Pontis, H.G., Salerno, G.L. & Echeverria, E.J. (Eds). *Current Topics in Plant Physiology*, ASPP, Rockville, Md. 1995. p.179-189.
- Xie, Z., Jiang, D., Dai, T., Jing, Q. & Cao, W.** 2004. Effects of exogenous ABA and cytokinin on leaf photosynthesis and grain protein accumulation in wheat ears cultured in vitro. *Plant Growth Regulation* 44: 25-32.
- Yamamoto, S. & Mino, Y.** 1989. Mechanism of Phleinsase Induction in the Stem Base of Orchardgrass after Defoliation. *Journal of Plant Physiology* 134: 258-260.
- Zhou, H., Li, M., Zhao, X., Fan, X. & Guo, A.** 2010. Plant regeneration from in vitro leaves of the peach rootstock ‘Nemaguard’ (*Prunus persica* x *P. davidiana*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 101: 79-87.

ANEXO 1

SR.EF	ATGTCGACTCTGGCAAGTCCACAAC TACC GGCCACTTAATT TACAAGTTGGGTGGTATTG
HT.EF	-----
CS.EF	ATGTCGACTCCGGCAAGTCTACCACCA CTGGTCACTTGATCTACAAGCTAGGAGGTATTG
GH.EF	ATGTCGACTCCGGCAAGTCCACAACCA CCGGTCACTTGATCTACAAGCTAGGAGGTATTG
CI.EF	ATGTCGACTCCGGCAAGTCTACAACCA CCGGTCACTTGATCTACAAGCTTAGGAGGTATCG
CT.EF	ATGTCGACTCCGGAAGTCGACCACCA CCGGCCACTTGATCTACAAGCTTGGTGGCATTG
AA.EF	-----
SC	atgtcgactccggccccgtctaca <u>aaccacgcgtcacttgatctaca</u> aagcttggagggtattg
SR.EF	ACAAACGTGTGATTGAAAGATTCGAGA AAGAAGCTGCTGAAATGAACAAAAGGTCATTCA
HT.EF	-----
CS.EF	ACAAGCGTGTGATCGAAAAGATTGAGA AGGAAGCTGCTGAGATGAACAAAACGTTTCATTCA
GH.EF	ACAAGCGTGTGATCGAAAAGTTTCGAAA AGGAAGCCGCAGAAATGAACAAAAGATCTTTCA
CI.EF	ACAAGCGTGTGATCGAACGTTTTCGAGA AGGAAGCCGCTGAGATGAACAAAACGTTTCATTCA
CT.EF	ACAAGCGTGTGATTGAGCGTTTTTGAGA AGGAAGCTGCTGAGATGAACAAAACGTTTCTTCA
AA.EF	-----
SC	acaagcgtgtgatcgaa cgtttcgagaaggaagccgctgagatgaacaa acgttcattca
SR.EF	AATACGCATGGGTTCTTGACAAGCTCAA AGCTGAACGTGAAGAGGTATCACCATTGATA
HT.EF	-----
CS.EF	AGTACGCATGGGTTCTTGACAAACTTA AGGCAGAGCGTGAACGTGGTATTACCATCGATA
GH.EF	AGTACGCATGGGTCTTTGACAAACTGA AGGCCGAGCGTGAACGTGGTATCACCATCGATA
CI.EF	AGTACGCATGGGTGCTCGACAAACTTA AGGCCGAGCGTGAACGTGGTATCACCATCGATA
CT.EF	AGTATGCCTGGGTGCTAGACAAGCTTA AGGCCGAACGTGAACGTGGTATCACCATTGACA
AA.EF	-----
SC	agtacgcatgggt
SR.EF	TTGCATTGTGGAAGTTTGAAACCACCAA TACTACTGCACCGTCATTGATGCACCTGGAC
HT.EF	-----
CS.EF	TTGCCTTGTGGAAGTTTGAGACCACAAA TACTACTGTACCGTCATTGATGCCCCCTGGTC
GH.EF	TCGCCCTCTGGAAGTTTGAAACCACCAA TACTACTGCACAGTCATCGATGCTCCTGGAC
CI.EF	TCGCTCTATGGAAGTTTCGAAACAACCA AGTACTACTGCACAGTCATCGATGCCCCCGGAC
CT.EF	TTGCCTTGTGGAAGTTTCGAGACCAACA AGTACTACTGCACGTGTCATCGATGCTCCTGGAC
AA.EF	-----AGACCACCAAGTACTACTGCACGTGTCATTGATGCTCCTGGAC
SR.EF	ATCGTGACTTCATCAAGAACATGATTACT GGTACTTCTCAAGCTGATTGTGCGGTTCTCA
HT.EF	-----
CS.EF	ATCGTGATTTTCATCAAGAACATGATTACT GGTACTTCCCAGGCTGATTGTGCTGTTCTCA
GH.EF	ATCGTGATTTTCATCAAGAACATGATTACT TGAACCTCCCAGGCTGACTGTGCCGTCCTTA
CI.EF	ATCGTGATTTTCATCAAGAACATGATTACT GTTACCTCCCAGGCCGATTGTGCCGTCCTCA
CT.EF	ATCGTGACTTTTATCAAGAATATGATCACC GTTACCTCTCAGGCCGACTGTGCTGTCTCTCA
AA.EF	ATCGTGACTTTTATCAAGAACATGATTAC GGTGACATCCCAAGCTGACTGTGCAGTGCTTA
SR.EF	TCATTGATTCCACAAC TGGTGGTTTTTGAAGCTGGTATTTCAAAGACGGTCAAACCCGTG
HT.EF	-----GTG
CS.EF	TCATTGACTCCACCACTGGTGGTTTTTGA GGTGGTATCTCTAAGGATGGTCAGACCCGTG
GH.EF	TCATCGACTCTACCACTGGTGGTTTTTGA AGCTGGTATCTCCAAGGATGGACAGACCCGTG
CI.EF	TCATCGACTCCACCACTGGTGGTTTTTGA AGCTGGTATCTCCAAGGACGGTCAGACCCGTG
CT.EF	TTATCGACTCCGCCACTGGTGGTTTTTGA AGCTGGGATCTCCAAAGATGGTCAGACTCGTG
AA.EF	TCATTGACTCCACAAC TGGTGGTTTTTGAAGCTGGTATTTCAAAGACGGTCAGACCCGTG
SC	*** cgtg
SR.EF	AACATGCTCTTCTTGCTTTCCTCTTGGT GTGAAACAAATGATTTGCTGCTGTAACAAGA
HT.EF	AGCACGCTCTTCTTGCTTTCAC CCTCGGTGTCAAGCAAATGATCTGCTGCTGTAACAAGA
CS.EF	AGCATGCTCTTCTTGCTTTCCTCTTGGT GTGAAAGCAAATGATCTGTTGTTGTAACAAGA
GH.EF	AGCATGCTCTGCTTGCTTTCCTCTTGGT GTGAAAGCAAATGATCTGCTGCTGTAACAAGA
CI.EF	AGCACGCTCTTCTTGCTTTCAC CCTTGGTGTGAAACAAATGATCTGCTGTTGTAACAAGA
CT.EF	AGCATGCTTTTACTTGCTTTCAC CCTTGGTGTGAGGCAAATGATCTGTTGTTGTAACAAGA
AA.EF	AGCATGCTCTTCTTGCTTTCCTCTTGGT GTGAAAGCAAATGATTTGCTGTTGTAACAAGA
SC	* * * * * agcatgctcttcttgc tttcaccccttgggtgt caaacaaatgatctgctgtgtgaacaaga

SR.EF	TGGATGCCACTACTCCGAAGTACTCAAAGGCGAGGTATGAAGAAATCGTCAAGGAAGTTT
HT.EF	TGGATGCCACCACACCGAAGTACTCAAAGGCGAGGTATGATGAAATTGTCAAGGAAGTTT
CS.EF	TGGATGCTACCACTCCCAAGTACTCCAAGAGCAGATACGAGGTAATCGTCAAGGAAGTTT
GH.EF	TGGATGCTACTACCCCAAGTACTCAAAGTCCCGATATGAGGAAATCGTGAAGGAAGTTT
CI.EF	TGGATGCCACTACCCCCAAGTACTCCAAGTCCAGGTACGAGGAAATCGTGAAGGAAGTTT
CT.EF	TGGATGCTACCACCCCAAGTACTCCAAGGCTAGGTATGATGAAATTATCAAGGAAGTGG
AA.EF	TGGATGCCACCACACCAAAATACTCCAAGGGAAGGTATGAAGAAATCGTCAAGGAAGTTT
	***** ** ** ** **
SC	tggatgccactaccccccaagtactccaagtccagggtatgagg <u>aaatcgtgaaggaagttt</u>
SR.EF	CATCATACTTGAAGAAGGTCGGTTACAACCCCGACAAAATCCCATTCTGTCCTCAATTTCTG
HT.EF	CATCCTACTTGA AAAAGGTTGGATACAACCCCGACAAAATCCCATTGTGCCAATCTCTG
CS.EF	CTTCATACTTGAAGAAGGTTGGTTACAACCCAGACAAAATCGCTTCGTTCCCATCTCTG
GH.EF	CATCGTACTTGAAGAAGGTTGGGTACAACCCAGACAAAATCCCGTTCGTTCCCAATCTCTG
CI.EF	CATCTACTTGAAGAAGGTCGGATACAACCCAGACAAAATCCCATTCTGTCCTCAATCTCTG
CT.EF	CATCCTACCTCAAGAAAGTTGGATACAATCCTGACAAAATCCCATTGTTCATCTCTG
AA.EF	CATCTTACTTGAAGAAGGTTGGATACAACCCCGACAAAATCCCATTGTGCCAATCTCTG
	* * * * *
SC	<u>catcat</u> acttgaagaaggttggatataccagacaaaatcccattcgtcccaatctctg
SR.EF	GATTTGAAGGCGACAACATGATTGAAGATCCACCAACCTCGACTGGTACAAGGGTCCGA
HT.EF	GTTTTGAGGGAGACAACATGATTGAGAGGTCCACCAATCTTGACTGGTACAAGGGTCCAA
CS.EF	GTTTTGAAGGTGACAACATGATTGAAGATCAACCAACCTTGACTGGTACAAGGGTCCCTA
GH.EF	GGTTTGAAGGTGACAACATGATTGAGCGGTCAACCAACCTTGACTGGTACAAGGGCCCAA
CI.EF	GATTGAGAGGTGACAACATGATTGAGAGGTCAACCAACCTTGACTGGTACAAGGGACCAA
CT.EF	GTTTTGAGGGAGATAACATGATTGAGAGGTCAACCAATCTTGACTGGTACAAGGGTCCAA
AA.EF	GTTTTGAAGGAGACAACATGATTGAGAGGTCAACCAACCTTGACTGGTACAAGGGTCCCA
	* * * * *
SC	gttttgaaggtgacaacatgattgagaggtcaaccaaccttgactggtacaaggggtccaa
SR.EF	CCCTACTTGAAGCACTTGACCAGATCAATGAACCGAAAAGACCATCAGACAAACCTCTTC
HT.EF	CCCTTCTTGAAGCTCTTGACCAATCAATGAGCCCAAGAGACCCTCAGACAAGCCTCTTC
CS.EF	CCCTCCTTGATGCTCTTGACCAGATCAATGAGCCCAAGAGACCATCAGACAAGCCCCTTC
GH.EF	CCCTGCTTGAAGCACTTGACCAGATCAACGAGCCAAAGAGACCTTCCGACAAGCCACTCC
CI.EF	CTCTCCTTGACGCTCTTGACCAGATCAACGAGCCCAAGAGACCATCAGACAAGCCCCTCC
CT.EF	CTCTTCTTGAAGCACTTGACCAGCTTAATGAACCAAGAGGCCATCAGACAAGCCCCTTC
AA.EF	CTCTTCTTGAAGCTCTTGACCAGATCAACGAACCAAGAGACCATCAGACAAGCCCCTTC
	* * * * *
SC	ctctccttgacgctcttgaccagatcaacgagcccaagagaccatcagacaagcccctcc
SR.EF	GTCTACCACTTCAAGACGTGTACAAGATTGGTGGTATTGGAACCGTGCCAGTTGGTCGTG
HT.EF	GTCTCCCACTTCAGGATGTGTACAAGATCGGTGGTATTGGAAGTGTGCCAGTGGGACGTG
CS.EF	GTCTACCCCTTCAAGACGTGTACAAGATCGGTGGTATTGGTACTGTGCCAGTGGGTCTG
GH.EF	GCCTCCCACTTCTGGACGTTTACAAGATTGGAGGCATTGGAAGTGTGCCAGTTGGACGTG
CI.EF	GTCTCCCACTTCAAGACGTGTACAAGATCGGTGGTATTGGAAGTGTGCCAGTNCGGCGTG
CT.EF	GTCTGCCACTCCAGGATGTCTACAAGATTGGTGGAAATCGGAA-----
AA.EF	GTCTCCCACTTCAGGATGTGTACAAGATTGGTGG-----
	* * * * *
SC	gtctcccacttcaagacgtgtacaagatcggtggtattgg

Alinhamento da região conservada das sequências de genes Fator de alongamento 1- alpha (EF) disponíveis no Genbank: SR.EF – *Stevia rebaudiana* (AY157315.1), HT.EF – *Helianthus annuus x Helianthus debilis* (AY094064.1), CS.EF – *Chrysanthemum seticuspe f. boreale* (AB679278.1), GH.EF – *Gerbera hybrid* (EU126916.1), CI.EF – *Cichorium intybus* (AY378166.1), CT.EF – *Carthamus tinctorius* (HQ891310.1), AA.EF – *Ageratina adenophora* (EF413022.1), SC – sequência consenso. Os asteriscos indicam resíduos idênticos nas sequências. Entre parênteses estão os códigos das sequências no GenBank. Em negrito e sublinhados estão destacados os trechos das sequências utilizadas para a construção dos *primers* utilizados no sequenciamento do gene.

ANEXO 2

CI. SSTa	ACCCAGAATCAGCCATATGGGG--CAACATCACATGGGGCCACTCCGTATCACGAGACA
CI. SSTb	ACCCAGAATCAGCCATATGGGG--CAACATCACATGGGGCCACTCCGTATCACGAGACA
TO. SST	ACCCCGAATCTGCCATCTGGGG--TAACATCACATGGGGCCATTCCATATCAAGGGACA
HT. SST	ACCCTCAATCTGCCATCTGGGG--CAACATCACATGGGGCCACTCCGTATCGAAAGACA
AT. SST	ATCCGACAGGTGTAGCTGGGACTATACAATTTTCATGGGGCCACGCCGTTTCTAAGGATC
AC. SST	ATCCAAACGGCTCGGCCTGGGACTACAGCATCTCCTGGGGCCATGCTGTATCCAAGGACA
TA. SST	ACCCGTGCGGCTCCGTGTGGGAGCCCCAAATCGTGTGGGGCCACGCCGTGTCCAAGGACC
HV. SST	ACCCGTGCGGGTCCGTGTGGGAGCCGCAAAATAGTGTGGGGCCACGCCGTGTCCAAGGACC
LP. SST	ACCCAAAGGGCGACAGCTGGGG--CAACATCGCGTGGGGCCACGCCGTGTCCAAGGACA
	* *
SC	accnnaatcngccatntggggnnncaacatcacatggggccactccgtatcacgagaca
CI. SSTa	TGATCAACTGGTTCCATCTCCCATTCGCCATGGTCCCGGACCATTGGTACGACATCGAAG
CI. SSTb	TGATCAACTGGTTCCATCTCCCATTCGCCATGGTCCCGGACCATTGGTACGACATCGAAG
TO. SST	TGATCAATTGGTTCCATCTACCATTTCGCTATGGTTCCAGATCACTGGTACGATATCGAAG
HT. SST	TGATCAACTGGTTCCATCTCCCTTTTCGCCATGGTTCCTGACCATTGGTACGACATCGAAG
AT. SST	TCCTCCATTGGAACCTACCTCCCATGGCTCTGAGGCCGGACCCTGGTACGACAGGAAAAG
AC. SST	TGATCCATTGGCTGCATCTGCCCTGTTCGCCATGGTACCCGACCCTGGTATGACAGCAAGG
TA. SST	TCATTCACTGGCGCCACCTCCCGCCGGCTTGGTGCCCGACCAGTGGTACGACATCAAGG
HV. SST	TGATCCACTGGCGCCACCTCCCGCCGGCTTGGTGCCCGACCAGTGGTACGACATCAAGG
LP. SST	TGGTCAACTGGCGCCACCTCCCTCTCGCCATGGTTCCTGACCAGTGGTACGACAGCAACG
	* *
SC	<u>tgatcaactggttccatctc</u> ccattcgccatggtcccgaccattggtacgacatcgaag
CI. SSTa	GGGTCATGACCGGATCCGCCACAGTACTCCCCAACGGTCAGATCATCATGCTCTACACTG
CI. SSTb	GGGTCATGACCGGATCCGCCACAGTCTCCCCAACGGTCAGATCATCATGCTCTACACTG
TO. SST	GTGTCATGACTGGGTCCGCTACTATGCTCCCAGACGGTCAAATCATTATGCTTTATACCG
HT. SST	GTGTCATGACGGGTTCCGCTACAGTCTCCCTAATGGTCAAATCATCATGCTTTACTCGG
AT. SST	GCGTCTGGTCCGGCTACTCCACGTTGTTGCCTGACGGTCGGATTGTGGTGTGTACACCG
AC. SST	GGGTCTGGTCCGGGTATGCCACACCCCTTCCTGACGGTCGTATCATTGTCTCTACACCG
TA. SST	GCGTCTCACC GGCTCCATCACC GTGCTCCCCGACGGCAAGGTCATCCTCCTCTACACGG
HV. SST	GCGTGTCTACCGGCTCCATCACC GTGCTCCCCGACGGCAAGGTCATCCCCCTCTATACCG
LP. SST	GCGTCTCACC GGCTCCATCACC GTGCTCCCCGACGGCCAGGTCATCCTGCTCTACACCG
	* *
SC	gngtctntgaccggnntccgccacngtntctcccnacgggtcagatcatctntgctttacacng
CI. SSTa	GCAACGCGTACGATCTCTCCCAAGTTACAGTGCTTAGCATAACGCGTCAACTCATCTGATC
CI. SSTb	GCAACGCGATGATCTTTCCCAAGTTACAATGCTTAGCATAACGCGTCAACTCATCTGATC
TO. SST	GTAACGCATACGATCTGGCTCAGTTGCAGTGTTTAGCGTACGCTGTTAACTCATCAGATC
HT. SST	GCAACGCGTATGATCTCTCCCAAGTACAATGCTTGCGGTACGCTGTCAACTCGTCGGATC
AT. SST	GCGGTACCAAAGAATTAGTGCAAGTCCAAAACCTCGCCGTGCCCGTCAATCTCTCCGACC
AC. SST	GAGGCACCGACCAACTCGTGCAAGTCCAGAATCTCGCCGAGCCCGTGACCCATCTGACC
TA. SST	GGAACACCGAGACCTTTGCGCAGGTGACCTGCCTCGCGGAGCCCGCCGACCCGAGCGATC
HV. SST	GCAACACCGAGACCTTCGCCCCAGGTGACGTGCCTCGCCGAGCCCGCCGACCCGAGCGACC
LP. SST	GCAACACCGACACCTTAGCCCCAGGTGCCTCGCCACGCCCCGCCGACCCGTCCGACC
	* *
SC	gcaacacnnangatctnnccagntncantgcntngennangccgtccacnctntengatc
CI. SSTa	CTCTCCTTCTGGAATGGAAAAAGTACGAAGGAAACCCAATTTTGTTCACCACCGCTGGTG
CI. SSTb	CTCTCCTTCTGGAATGGAAAAAGTACGAAGGAAACCCATTTTGTTCACCACCGCTGGTG
TO. SST	CGCTTCTTTTGGAAATGGAAAAATATGAGGGAAATCCAATATTGTTCCTCCACCTGGAG
HT. SST	CACTTCTTATAGAGTGGAAAAATATGAAGGTAACCCGTCTTACTCCACACCACAGGAG
AT. SST	CTCTCCTCCTCGAGTGGGAAGAAGTCTCACGTCAATCTATACTTGTTCACCTCCTGGGCA
AC. SST	CCCTCCTTATCGAATGGAAAGAAATCCAACGGCAACCCCATCCTCATGCCACCTCCCGGAG
TA. SST	CCCTCCTCCGCGAGTGGGTCAAGCACCCCGCCAACCCCGTCGTGTTCCCGCCCCCGGGCA
HV. SST	CGCTCCTCCGCGAGTGGGTGAAGCACCCGGCGAACCCCGTCGTGTTCCCGCCGCGGGCA
LP. SST	CGCTCCTCCGCGAGTGGGTCAAGCACCCCGCCAACCCCATCCTCTACCTCCCCCGGGCA
	* *
SC	cnctccttctngaattggaaaaagtaacnangnaaccnntntggttcccnccnctggnG
CI. SSTa	TGGGATACAAAGATTTTCGAGATCCATCCACATTATGGATGGGT--CCTGATGGGGAAT
CI. SSTb	TGGGATACAAAGATTTTCGAGACCCATCCACATTATGGATGGGT--CCTGATGGGGAAT
TO. SST	TGGGGTACAAGGATTTCCGGGACCCATCTACGTTATGGAGGGGT--CCAGATGGGGACT
HT. SST	TAGGCTACAAGGACTTTCCGGGACCCATCCACATTGTGGTTCGGGC--CCTGATGGTGAAT
AT. SST	TTGAAGACCAAGACTTCAGGATCCTTTCCAGTATGGTACAATGAATCGGACTCCAGGT
AC. SST	TCGGCCCTCATGACTTCGCTGACCCGTTCCCTGTCTGGTACAATGAGTCCGATTCCACTT
TA. SST	TCGGCATGAAGGACTTCGCGACACCCACACCGCGTGGTTCGACGAGTCCGACGGCACGT
HV. SST	TCGGGATGAAGGACTTCGCGACACCCACGACGGCGTGGTTCGACGCCAGCGACGGCACGT
LP. SST	TCGGCTCAAGGACTTCGCGACACCCCTCACCCTGTTTCGACCACTCCGACCAACCT
	* *
SC	tnggntacaangacttccngnaccntccacnntntggttnngnnnnnnnngatggnnnnt
CI. SSTa	GGAGAATGGTAATGGGGTCCAAACACAATGA-AACTATT--GGTGTGCATTGGTCTACC

CI.SSTb	GGAGAATGGTAATGGGGTCCAAGCACACGA-GACTATT--GGTTGTGCATTGGTTTACC
TO.SST	GGATAATGATCATGGGGTCTAAACATAACCA-GACTATT--GGTTGTGCACTGGTTTATC
HT.SST	ATAGAATGGTAATGGGGTCCAAGCACACGA-GACTATT--GGCTGTGCTTTGATTTACC
AT.SST	GGCATGTTGTGATTGGCTCCAAG--GATCCGGAGCACTACGGCATTGTCTCATCTACA
AC.SST	GGCACATGCTTATCGGGTCCAAG--GACGATAACCATTACGGCACTGTACTCATCTACA
TA.SST	GGCGCACCATCATCGGGTCCAAGAAGCACTCGGACCACTCCGGCATCGTCTTCTCCTACA
HV.SST	GGCGCACCATCATCGGGTCCAAGAAGCACTCGGACCACTCGGGCATCGTCTTCTCCTACA
LP.SST	GGCGCACCCTCATCGGGTCCAAGGACGACGACGGCCACGCCGGCATCATCTCAGCTACA
	* * * * *
SC	ggnnnatggtatnggggtccaaagnacnacgangacnattnnngnnntgnattgntntaca
CI.SSTa	GTACTACTAATTTTACGCATTTTGAACGAACGAGGAGGTACTCCACGCAGTCCCCCA--
CI.SSTb	GTACTACTAATTTTACACATTTTGAAGCTGAACGAGGAGGTACTCCACGCAGTCCCCA--
TO.SST	GTACTTCTAATTTTACGCATTTTGAAGCTTAGCGAGGAGCCACTTCATGCTGTTCCCCA--
HT.SST	ATACCACTAATTTTACGCATTTTGAATGAAAGAGGAGGTGCTTCATGCAGTCCCCA--
AT.SST	CCACCAAAGACTTCGTCAACTTCACTCTGCTCCCCAACATCCTCCACTCCACCAAGCAGC
AC.SST	CTACCAAGGACTTTGAACCTACACGCTTCTTCGGGACATTTTGCATAAGACCAAGGACA
TA.SST	AGACCAAGGACTTCCTCAGCTACGAGCTGATGCCGGGTACATGTACCGCGGGCCCCAAGG
HV.SST	AGACCAAGGACTTCGTGAGCTACGAGCTGATGCCGGGTACATGTACCGCGGGCCCCAAGG
LP.SST	AGACCAAGGACTTCGTCAACTACGAGCTCATGCCGGGAACATGCACCGCGGGCCCCGACG
	** * * * *
SC	ataccannnattnnnnnantntngagctganccnnggagnnnctncaacncngnnccccca
CI.SSTa	-TACTGGTATGTGGGAATGTGTGGACCTATACCTGTGTCCACCACGCA-----CA
CI.SSTb	-TACTGGTATGTGGGAATGTGTGGACCTGTACCCCGTGTCCACCACGCA-----CA
TO.SST	-TACCGGAATGTGGGAGTGTGTGGATCTGTACCTGTTTCTACCACGCA-----CA
HT.SST	-TACTGGTATGTGGGAATGTGTGATCTTTACCCGGTGTCCACCCTACA-----CA
AT.SST	CCGTCCGCATGCTGGAATGCGTCGACTTGTTCCTCGGTGCGCCACCACCGACTCCCGAGCA
AC.SST	GTGTGGGCATGCTCGAGTGTGTGGATCTGTACCCGGTAGCGACGACTGGGAACAGATCG
TA.SST	GCACCGCGAGTACGAGTGCATCGACCTCTACGCCGTGCGCGGGGGCCG---CAAGGCCA
HV.SST	GCACCGCGAGTACGAGTGCATCGACCTCTACGCCGTGCGGGGGCGGCAG---CAGGGCCA
LP.SST	GCACCGGAATGTACGAGTGCATCGACCTCTACCCCGTGCAGGCAACTCGTCCGAGATGC
	** * * * *
SC	<u>tactggtatgtgggaatgtgt</u> ggacctntaccnngttnccaccacncaannnnnnnnnca
CI.SSTa	CGAATGGGTTGGACATGAAG-----GATAATGGGCCGAATGTTAAATATATTTTGAAC
CI.SSTb	CGAATGGGTTGGAAATGAAG-----GATAATGGGCCGAATGTTAAATATATTTTGAAC
TO.SST	CGAATGGATTGGATATGATG-----GATAATGGGCCGAATGTTAAATATATTTTGAAC
HT.SST	CAAACGGGCTGGACATGGTG-----GATAACGGGCCAAATGTTAAGTACGTGTTGAAC
AT.SST	ACCAGGCCCTCGACATGACGACGATGAGGCCGGGGCCGGGGTTGAAGTACGTGCTTAAGG
AC.SST	GGAACGGGCTTGAATGAAG--GGCGGATCCGGA--GGGGATCAAGCATGTGCTTAAGG
TA.SST	GCGACATGTACAACCTCGACG-----GCCGAGGACGTGCTGTACGTGCTCAAGG
HV.SST	GCGACATGTACAACCTCGACG-----GCCGAGGACGTGCTGTACGTGCTCAAGG
LP.SST	TCGGCGCGACGACTCGCCC-----G-----GCGTGCTCTCGTGCTCAAGG
	* * * * *

Alinhamento das sequências dos genes 1-SST utilizadas para o planejamento de *primers*: CI.SSTa – *Cichorium intybus* (JQ346799.1), CI.SSTb – *Cichorium intybus* (U81520), TO.SST – *Taraxacum officinale* (AJ250634), HT.SST – *Helianthus tuberosus* (AJ009757), AT.SST – *Agave tequilana* (DQ535031), AC.SST – *Allium cepa* (AJ006066), TA.SST – *Triticum aestivum* (AB029888), HV.SST – *Hordeum vulgare* (AJ567377), LP.SST – *Lolium perenne* (AY245431), SC – sequência consenso. Os asteriscos indicam resíduos idênticos nas sequências. Entre parênteses estão os códigos das sequências no GenBank. Em negrito e sublinhados estão destacados os trechos das sequências utilizadas para a construção dos *primers* utilizados no sequenciamento do gene.

ANEXO 3

HT.FFT	CTGGACAGGT---CCCGATGGAAAGCATAGGATGATCATGGGAACTAAACGTGGCA----
VD.FFT	CTGGACGGGT---CCCGATGGAAAGCACAGGATGATCATGGGATCTAAACGTGGCA----
CS.FFT	TTGGACGGGT---CCCGATGGAAACATCGGATGATCATAGGGACTAAACGAAATA----
ER.FFT	TTGGACGGGT---CCGGATAATATACATCGGATGATAATAGGGACTAGGCGAAATA----
TA.FFTa	GTGGTTCCGACAACCTCCGACAACACGTGGCGCATCATCATGGCTCCAAGAATGATACCGA
TA.FFTb	GTGGTTCCGACAACCTCCGACAACACGTGGCGCATCATCATGGCTCCAAGAACGACACGGA
	*** * * * * * * * *
HT.FFT	--ATACAGGCATGGTACTTGTCTTACTATACCACTGATTACACGAACTACGAGTTGTTGGA
VD.FFT	--ATACAGGAGTGGTACTCGTTTACCATAACCACTGATTTACAAACTACGAGTTGTTGGA
CS.FFT	--CTACAGGACTCGTACTTGTATACCATACCACTGATTTACAAACTACGTAATGTTGGA
ER.FFT	--ACACAGGACTTGTCTTGTCTTACCATAACCAAGATTTACATAAACTACGAGCTACTGGA
TA.FFTa	CCACTCCGGCATTGTATTACGTACAAGACCAAGGACTTCGTACGTACGAGATGATACCG
TA.FFTb	CCACTCCGGCATTGTCTTTCACGTACAAGACCAAGGACTTCGTACGTACGAGTTGATACC
	* * * * * * * * * * * * *
SC	nnatacaggantngtacttgtttaccataaccacngatttcacnaactacgagn <u>tggttga</u>
HT.FFT	TGAGCCGTTGCACT-CTGTTCC--CAACACCGATATGTGGGAATGCGTCGACTTTTACCC
VD.FFT	TGAACCGTTGCACT-CGTTTCC--CAACACCAATATGTGGGAATGCGTCGACTTTTACCC
CS.FFT	CGAGCCGTTGCACT-CGTTCCC--CAACACTGATATGTGGGAATGTGTCGACCTTTACCC
ER.FFT	TGAGCCATTGCATT-CGGTCCC--TGATTCTGGTATGTGGGAATGTGTGGATCTTTACCC
TA.FFTa	GGGGTACCTGTACCGCGGCCCGCCGGCACC GGCGCATGTACGAGTGCATCGACCTGTACGC
TA.FFTb	GGGGTACTTGTACCGCGGCCCGCCGGCACC GGCGCATGTACGAGTGCATCGACATGTTCCG
	* * * * * * * * * * * * *
SC	<u>ngagccgttgcactnc</u> gggtcccnnaacaccgatatgtgggaatgcgtcgacntttaccc
HT.FFT	GGTTT-CGTAAACC--AATGATAGTGCACCTTGATATGGCGGCCTATGGGTCGGGTATCAA
VD.FFT	AGTTT-CATTAACC--AATGATAGTGCACCTTGATATTGCGGCCTACGGGCGCGGTATCAA
CS.FFT	TGTGT-CAACGACC--AACGATAGTGCACCTTGATGTTGCGGCCTATGGTCCGGGTATCAA
ER.FFT	GGTTT-CAACCATG--AACGACACCGCCTTGATGTTGCGGCCTATGGTTCGGGCATCAA
TA.FFTa	CGTTGGCGGTGGCCGCAAGGCCAGCGACATGTACAACCTGACCGCCAA--GGATGTGTT
TA.FFTb	CGTCGGCGGTGGCCGCAAGGCCAGCGACATGTACAATTCGACGCCAA--GGACGTGCT
	* * * * * * * * * * * * *
HT.FFT	ACACGTTATTAAAGAAAGTTGGGAGGGACATGGAATGGATTGGTATTCAATCGGGACATA
VD.FFT	ACACGTTATAAAAGAAAGTTGGGAGGGACATGCAATGGATTTTATTCAATCGGGACATA
CS.FFT	GCATGTGCTTAAAGAAAGTTGGGAGGGACACGCGATGGACTTTTACTCGATCGGGACATA
ER.FFT	CGATGTGCTGAAAGAGAGTTGGGAGGGACACGCAAGGACTTCTATTTCGATCGGGACATA
TA.FFTa	GTACGTGCTCAAGGAGAGCAGCGACGATGACCGCGCGACTATTACGCGCTCGGGAGGTT
TA.FFTb	GTACGTGCTCAAGGAGAGCAGCGACGACGACCGCGCGACTATTACGCGCTCGGGAGGTT
	* * * * * * * * * * * * *
SC	acacgttatnaaagaaagtgtgggaggacatgcaanggactnntatttcgatcgggacata
HT.FFT	TGACGCGATAAATGATAAATGGACTCCCGATAAACC CGAACTAGATGTGGTATCGGGTT
VD.FFT	TGACGCGATAAACC GATAAATGGACTCCCGATAAACC CGAACTAGATGTGGTATCGGGTT
CS.FFT	CGATGTGCTTAAAGATAAGTGGACACCCGATAATCCCGAACTAGACGTGGTATCGGGTT
ER.FFT	TGATGCGATAAACGATAAGTGGTGGCCTGATAAACCAGAATTAGACTTGGGTATGGGGTG
TA.FFTa	CGACGCGAGCGGCCAACACATGGACGCGGATCGACACCGAGCAGGAACTCGGCGTCGCGCT
TA.FFTb	CGACGCGGCGGCCAACACATGGACGCGGATCGACACCGAGCGGGAACCTCGGCGTCGCGCT
	* * * * * * * * * * * * *
SC	tgacgcgntnaacgataaatggacncccgataaccnngaactagangtcggtatcggtt
HT.FFT	ACGGTGCGATTACGGGAGGTTTTTTGCATCAAAGAGTCTTTATGACCCATTGAAGAAAAG
VD.FFT	ACGGTGTGATTACGGTAGGTTTTTTGCATCAAAGAGTCTTTATGACCCATTGAAGAAAAG
CS.FFT	GCGGTGCGATTACGGAAGGTTCTTTGCGTCGAAGAGCCTCTACGACCCGTTGAAGAAAAG
ER.FFT	GCGATGCGATTACGGGAGATTCTTTGCATCCAAGACCCCTCTACGACCCATTAAAGAAAAG
TA.FFTa	GCGGTACGACTATGGCAGGTACGACGCGTCCAAGTCTTCTACGACCCCGTGAAGCAGCG
TA.FFTb	GCGGTACGACTATGGCAGGTACGACGCGTCCAAGTCTTCTACGACCCCGTGAAGGAGCG
	* * * * * * * * * * * * *
SC	acggtgcgattacggnaggttttttgcacnaagagtcctttatgaccnttgaagaaaag
HT.FFT	GAGGATCACTTGGGGTTATGTTGGAGAATCAGATAGTGCTGATCAGGACCTCTCTAGAGG
VD.FFT	GAGGATCACTTGGGCTTATGTTGCAGAATCAGATAGTCTTGATCAGGACCTCTCTAGAGG
CS.FFT	AAGAGTCACTTGGGGTTATGTTGCGGAATCCGACAGTTACGACCAAGACGCTCTCTAGAGG
ER.FFT	AAGGGTGACTTGGGGATACGTCGCTGAATCAGACAGTGGAGATCAGGACCGATCCAGAGG
TA.FFTa	GCGGATCGTCTGGGGGTACGTTGTCGAGACCGACTCCTGGAGCGCCGACGCGCCAAAGG
TA.FFTb	GCGGATCGTCTGGGGGTACGTCGTCGAGACCGACTCCTGGAGTGCCGATGCGGCCAAAGG
	* * * * * * * * * * * * *
SC	gaggatcacttggggttatgttgcngaatacagacagtgngnatcangacctctctagagg

HT.FFT	ATGGGCTACTGTTTATAATGTTGGAAGAACAATTGTACTAGATAGAAAGACCGGGACCCA
VD.FFT	ATGGGCTCATGTTTATAATGTTGGAAGAACAATTGTACTAGATAGAAAGACCGGGACCCA
CS.FFT	ATGGGCTACTATTATAATGTTGCAAGGACCATTGTACTCGATCGGAAGACTGGAACCCA
ER.FFT	ATGGTCCAATATTACAATGTTGCTAGAACCGTAATGCTAGACAGAAAGACCGGAACCAA
TA.FFTa	GTGGGCCAACCTCCAGTCGATTCCGAGAACGGTGGAGCTTGACGAGAAGACCGGACGAA
TA.FFTb	GTGGGCCAACCTTCAGTCGATTCCGAGAACGGTGGAGCTTGACGAGAAGACCGGACAAA
	*** * * * * ** * * * * * * * * * * * * * * *
SC	atgggctaattttatatattgttgaagaacnattgtactngataggaagaccgggaccca
HT.FFT	TTTACTTCATTGGCCCGTTGAGGAAGTCGAGAGTTTGAGATACAACGGTCAGGAGTTTAA
VD.FFT	TTTACTTCATTGGCCCGTTGAGGAAGTCGAGACTTTGAGATACAACGGTCGGGAGTTTAA
CS.FFT	TCTACTTCAATGGCCCGTTGGAGGAAATCGAGAGCTTGAGATCCAACGGTCATGAATTCAA
ER.FFT	TCTACTTCAATGGCCAGTGGAGGAAATTGAGAGTTTGAGGTCCAAAGTTCATGAATTCAA
TA.FFTa	CCTCATCCAATGGCCCGTTGGAGGAGCTCGATACCCTCCGCATCAACACCACCGATTTTCA
TA.FFTb	CCTCATCCAATGGCCCGTTGGAGGAGCTCGATACCCTCCGCATCAACACCACCGATCTCAG
	* *
SC	tttacttcattggccngttgaggaantcgaganttttgagatncaacggtcnnganttttaa
HT.FFT	AGAGATCAAGCTAGAGCCCGGTTCAATCATTCCACTCGACATAGGCACGGCTACACAGTT
VD.FFT	AGAGATCGAGCTAGAACC CGGTTTCGATCGTTCCACTCGACATAGGCACGGCTACACAGTT
CS.FFT	AAATATAACACTTGAGCCCGGTCGATCATTCCTCCGACGTAGGCTCAGCTACGCAGTT
ER.FFT	TGAGATCGAGCTCCAGCCAGGTTCCATCATTCCACTCGAAGTAGGCTCACTACACAGTT
TA.FFTa	CGGTATCACTGTCCGTGCCGATCCGTCGTCTCCCTCCCTCCCTCCACAGACCTCCCAACT
TA.FFTb	CGGTATCACTGTCCGTGCCGATCCGTCGTCTCCCTCCCTCCCTCCACAGACCTCCCAACT
	** *
SC	ngagatcaanctngancccgntcnatcattccactcgacntaggnccng <u>ctacncagtt</u>
HT.FFT	GGACATAGTTGCAACATTTGAGGTGGATCAAGCAGCGTTGAACGCGACAAGTGAAACCGA
VD.FFT	GGACATAGTTGCAACATTTGAGGTGGATCAAGCTGCATTGAACGCGACAAGTGAAACCGA
CS.FFT	GGACATCGTTGCAACATTTGAGGTGGATCAAGAGGCGTTAAAAGCAACAAGTGACACGAA
ER.FFT	GGACATAGTTGCAACATTTGAGGTGAATAAAGATGCATTGCAAGAGACAAATGTGAATTA
TA.FFTa	CGACATCGAGGCATCCTTCCGCATCAACGCCTCCGCCATTGAGGCCCTCAATGAGGTTGA
TA.FFTb	CGACATCGAGGCATCCTTCCGCATCAACGCCTCCGTCATCGAGGCCCTCAATGAGGTTGA
	***** *
SC	<u>ggacatagttgcaa</u> catttgaggtggatcaagcngcnttnaangcnacaagtganacnna
HT.FFT	TGATATTTATGGTTGCACCACTAGCTTAGGTGCAGCCCCAAAGGGGAAGTTTGGGACCATT
VD.FFT	TGATACATATGGTTGCACCACAAGCTTAGGTGCGACTGAAAGGGGAAGTTTGGGACCATT
CS.FFT	CGACGAATACGGTTGCACCACAAGTTTCGGGTGCAGCCCCAAAGGGGAAGTTTGGGACCATT
ER.FFT	CAACGAGTACGGTTGCACCACTAGCAAAGGTGCATCGCAGAGGGGAAGACTCGGACCATT
TA.FFTa	CGTCGGGTACAACCTGCACCTGACAGCGGCGCCGCCACCCGCGGCGCGCTCGGCCCCCTT
TA.FFTb	CGTCAGCTACAACCTGCACCATGACAGCGGCGCCGCCACCCGCGGCGCGCTCGGCCCCCTT
	* *
SC	cgatanntatggttgaccacnagctnnggtgcnnccnaaaggggaagtttnggaccatt
HT.FFT	TGGTCTTGCGGTTCTAGCCGATGGAACCCCTTTCTGAGTTAACTCCGGTTTATTTCTATAT
VD.FFT	TGGTCTTGCGGTTCTAGCCGATGGAACCCCTTTCTGAGTTAACTCCGGTTTATTTCTACAT
CS.FFT	CGGGATTGCAAGTTCTTGCCACGGAACCCCTTTCCGAGTTAACTCCGGTGTATTTCTACAT
ER.FFT	TGGGATTATTGTTCTTGCTGACGGCAACCTGTTGGAGTTAACTCCAGTCTATTTCTACAT
TA.FFTa	CGGCATTCTTGCTCGCCAATGTCGCCCTGACAGAACGGACGGCGGTGTACTTTTATGT
TA.FFTb	CGGCATTCTCGTCTCGCCAACGCCGCCCTGATAGAACAGACGGCGGTGTACTTTTATGT
	** *
SC	tggnccttgnngttctngccnatggaaccctttcngagtttaacnccggtntatttctacat

Alinhamento das sequências dos genes *1-FFT* utilizadas para o planejamento de *primers*: HT.FFT – *Helianthus tuberosus* (AJ009756.1), VD.SST – *Viguiera discolor* (AJ811625.1), CS.FFT – *Cynara scolymus* (AJ000481.2), ER.FFT – *Echinops ritro* (AJ811624.1), TA.FFTa – *Triticum aestivum* (AB088410.1), TA.FFTb – *Triticum aestivum* (AB088409.1), SC – sequência consenso. Os asteriscos indicam resíduos idênticos nas sequências. Entre parênteses estão os códigos das sequências no GenBank. Em negrito e sublinhados estão destacados os trechos das sequências utilizadas para a construção dos *primers* utilizados no sequenciamento do gene.