

ATHOS POLI RIGUI DA SILVA

Níveis endógenos de ácido abscísico e ácido indol-3-acético e sua relação com o metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby

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

SÃO PAULO
2014

ATHOS POLI RIGUI DA SILVA

Níveis endógenos de ácido abscísico e ácido indol-3-acético e sua relação com o metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby

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

ORIENTADORA: MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

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

Silva, Athos Poli Rigui da

S586n Níveis endógenos de ácido abscísico e ácido indol-3-acético e sua relação com o metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby / Athos Poli Rigui da Silva - São Paulo, 2014.

77 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014

Bibliografia.

1. Asteraceae. 2. Cerrado. 3. Inulina. I. Título

CDU: 582.998.0

Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me apoiarem nas escolhas feitas e nos momentos difíceis, por me estimularem a buscar sempre o melhor e pelas facilidades fornecidas. Pela criação e educação e principalmente pelo amor e carinho.

À minha orientadora Dra. Maria Angela Machado de Carvalho pela oportunidade oferecida, acompanhamento, orientação, excelentes conselhos, ótima convivência e todas as demais qualidades a mim direcionadas.

À grande amiga e colaboradora Dra. Vanessa Fátima de Oliveira, por tudo que fez por mim desde a iniciação científica e durante toda a realização deste trabalho. Pelo incentivo, estímulo, carinho, amizade e bons momentos compartilhados.

À Dra. Marília Gaspar, pela excelência na colaboração, pelos ensinamentos, dedicação, ajuda e apoio em todas as fases do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Eduardo Purgatto, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela colaboração, dedicação e orientação na realização das análises de ABA e AIA.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, pela oportunidade em realizar este trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida por meio do Programa Nacional de Desenvolvimento da Botânica (PNADB), e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Mary Monteiro, Ana Alice, Pedro e Maria Aparecida, a todos os pesquisadores por todas as facilidades fornecidas ao longo do período, em particular, à Dra. Rita de Cássia L. Figueiredo-Ribeiro, coordenadora do projeto do PNADB/CAPES.

Ao Núcleo de Pesquisa – Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, particularmente ao seu diretor, Dr. João Del Giudice Neto e funcionários, pelo apoio prestado durante as coletas de material biológico.

Aos meus grandes amigos Bruno Paluan, Bruno Pontes, Diana Hernandez, Fernanda Vizioli, Jéssica Piccoli, Lara Kenny, Luiza Bagarollo, Marina Ortelan e Natália Miranda, por me incentivarem e apoiarem em todos os sonhos e desafios que escolhi e por todos os momentos memoráveis e alegres carinhosamente lembrados.

Ao amigo e companheiro de Biologia Molecular, Flávio Trevisan, por me ajudar, e muito, com toda a paciência, no desenvolvimento das análises de expressão gênica.

Aos também grandes amigos ligados ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, Aline Hell, Evandro Vieira, Daiane Mignoni, Emanuela Oliveira, Fernanda Zaninete, Glaucia Rodrigues, João Paulo Naldi, Juliana Zerlin, Kássia Fardin, Kelly Simões, Leila Díaz, Ludmila Raggi, Paulo Moreno, Patrícia Pinho e Roseli Betoni, por todos os momentos alegres na rotina de trabalho no Botânico, pelo carinho, companheirismo e todo o incentivo ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Emerson Alves da Silva, do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, pela ajuda em coletas, elaboração e interpretação de alguns resultados e à Dra. Carla Ferragut, do Núcleo de Pesquisa em Ecologia, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos funcionários Wagner de Freitas Ciarelli, Paulo Rodrigues de Souza e Welton Cleo Pereira da empresa AES Tietê S/A e Sebastião de Oliveira Filho da International Papel do Brasil Ltda, pelo fornecimento dos dados meteorológicos utilizados neste trabalho.

À Rosemeire Bom Personi, Cândica Vieira, Liliana Medeiros, Vera Cambréa e Laura Araújo Tomé, professoras da Universidade Metodista de São Paulo, pela formação que me deram na graduação e pela inspiração e exemplo de como executar um trabalho com excelência.

E a todos os demais contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XI
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	16
3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E DO STATUS HÍDRICO DAS PLANTAS E DO SOLO	17
3.2.1. CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E DO AMBIENTE DE COLETA.....	17
3.2.2. TEOR DE UMIDADE DO SOLO.....	18
3.2.3. TEOR DE ÁGUA DAS PLANTAS E POTENCIAL HÍDRICO (Ψ_w) DOS RIZÓFOROS	19
3.3. ANÁLISE DOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE ÁCIDO ABCÍSIKO E ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASSAS COM MONITORAMENTO SELETIVO DE ÍONS (CG-EM-MSI)	19
3.4. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	21
3.4.1. EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA	21
3.4.2. ENSAIO ENZIMÁTICO	22
3.5. ANÁLISE DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS.....	23
3.5.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS	23
3.5.2. ANÁLISE QUALITATIVA DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS PRESENTES NOS EXTRATOS BRUTOS E NA FRAÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS	24
3.6. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	24
3.7. ANÁLISE DOS DADOS	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. CONDIÇÕES CLIMÁTICAS NO PERÍODO.....	29
4.2. STATUS HÍDRICO DO SOLO E DAS PLANTAS NAS DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO..	32

4.3. NÍVEIS ENDÓGENOS DE ÁCIDO ABSCÍSICO E ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO EM PLANTAS DE <i>VERNONIA HERBACEA</i> EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO	33
4.4. ANÁLISES DO TEOR DE FRUTANOS EM RIZÓFOROS DE <i>VERNONIA HERBACEA</i> EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO	35
4.5. ANÁLISE DAS ENZIMAS 1-SST, 1-FFT E 1-FEH NAS DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS DE <i>VERNONIA HERBACEA</i>	42
4.6. EXPRESSÃO GÊNICA DO METABOLISMO DE FRUTANOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE <i>VERNONIA HERBACEA</i>	44
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5. DISCUSSÃO	47
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
8. ANEXOS	75

RESUMO

Frutanos são oligo- e polissacarídeos de frutose, originados da sacarose, que, além da função de reserva em plantas, contribuem para a tolerância à seca e às baixas temperaturas que ocorrem no Cerrado. *Vernonia herbacea*, Asteraceae do Cerrado, apresenta crescimento sazonal, e acumula frutanos do tipo inulina em seus órgãos subterrâneos de reserva, os rizóforos. A síntese destes carboidratos ocorre predominantemente nos segmentos mais jovens dos rizóforos (segmentos distais) e se dá pela ação de duas enzimas: sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST), que catalisa a síntese do trissacarídeo 1-cestose e, frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT) que promove tanto o alongamento como a diminuição das cadeias. A sua despolimerização ocorre principalmente nos segmentos próximos a inserção dos ramos aéreos (segmentos proximais) pela atuação da frutano 1-exohidrolases (1-FEH). O presente trabalho foi realizado com o objetivo de se estudar as relações, já descritas para outras espécies, entre os reguladores hormonais ácido abscísico (ABA) e ácido indol-3-acético (AIA) e o metabolismo de frutanos, em plantas de *V. herbacea* nos períodos de transição para a dormência (outono e inverno) e para a brotação (inverno e primavera). As plantas foram coletadas em área de Cerrado na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (SP) em diferentes fases de desenvolvimento para análises de frutanos, da atividade e expressão gênica das enzimas do seu metabolismo, do teor endógeno de ABA e AIA nos rizóforos e parte aérea, além das medidas do teor de água nas plantas e umidade do solo. Correlações positivas entre o aumento de temperatura, de ABA e teor de água na parte aérea das plantas, sugere uma estratégia para a manutenção do status hídrico. O aumento da taxa de precipitação nos meses de primavera e verão (período vegetativo) foi concomitante ao aumento da atividade e expressão do gene da 1-SST nos segmentos distais dos rizóforos. Neste mesmo período a atividade e expressão da 1-FEH foi reduzida, enquanto sua

maior atividade e expressão ocorreu na brotação e, especialmente nos segmentos proximais. O aumento da 1-FEH foi acompanhado de níveis próximos de zero de ABA nos segmentos proximais e distais dos rizóforos, o que deixa claro a associação com a mobilização de carboidratos para a emissão e crescimento de novos ramos. A emissão dos primeiros ramos na brotação foi acompanhada de altos níveis endógenos de AIA na parte aérea e aumento do teor de fruto-oligossacarídeos nos segmentos distais dos rizóforos, mostrando a atuação deste hormônio no desenvolvimento e alongamento dos novos tecidos e favorecimento da síntese de reservas. O status hídrico das plantas não mostrou evidências de estresse hídrico nos períodos analisados, apontando que outros sinalizadores do ambiente podem estar associados à entrada das plantas em dormência e na brotação.

Palavras-chave: Asteraceae, carboidratos de reserva, Cerrado, inulina, órgãos de reserva.

ABSTRACT

Fructans are fructose-based oligo and polysaccharides synthesized from sucrose, which, in addition to reserve compounds in plants, are known to confer tolerance to drought and low temperature, characteristics of the Cerrado. *Vernonia herbacea* is an Asteraceae from the Cerrado with seasonal growth that accumulates inulin-type fructans in their rhizophores. The synthesis of these carbohydrates occurs predominantly in young segments of the rhizophores (distal segments) by the action of sucrose:sucrose 1-fructotransferase (1-SST), that catalyses the formation of the trisaccharide 1-cellobiose and fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) that operates in both the increase and in the decrease of the chain size. The depolymerization occurs mainly in segments of the rhizophores near the buds that originate new shoots (proximal segments) by the action of fructan 1-exohydrolase (1-FEH). The aim of the present work was to study the association described for other species, of the growth regulators abscisic acid (ABA) and indole-3-acetic acid (IAA), and fructans metabolism in plants of *V. herbacea* during the transition to the dormant phase (autumn and winter) and to the sprouting phase (winter and spring). Plants were collected in a cerrado area at the Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (SP) at different development phases for analyses of fructans, activities and gene expression of related enzymes in rhizophores, analyses of endogenous ABA and IAA in rhizophores and aerial organs and measurements of the water content in plants and of soil moisture. Positive correlations between the increase in temperature, in ABA and water content in shoots, suggested an strategy for maintaining the water status. The increase of precipitation in spring and summer (growth seasons) is associated with an increase in 1-SST activity and gene expression in distal segments of rhizophores. In the same period the activity and expression of 1-FEH was reduced, its highest activity and expression was detected during sprouting, especially in the basal segments. The increase in 1-FEH was accompanied by near-zero levels of ABA in the

basal and apical segments of rhizophores, making clear the association with fructan mobilization for the growth of new shoots. Additionally, this was accompanied by high levels of endogenous IAA in shoots and increased levels of fructo-oligosaccharides in the distal segments of the rhizophores, indicating the role of this hormone in the development and growth of new tissues, and thus in the synthesis of reserve compounds. The water status of the plants indicated that drought stress was not imposed to the plants in the field at any of the developmental stages analysed in this study, pointing to the existence of other environmental signals associated with the entry of plants in dormancy and in sprouting.

Key words: Asteraceae, carbohydrate reserves, Cerrado, inulin, reserve organs.

1. INTRODUÇÃO

Frutanos, oligo- e polissacarídeos de frutose, são carboidratos de reserva, originados da sacarose que estão presentes em 15% das Angiospermas (Hendry & Wallace, 1993). 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 espécies pertencentes à família Poaceae (Pollock *et al.*, 1996). Sua complexidade estrutural pode variar de acordo com o tipo de ligação glicosídica entre as unidades de frutose, com a presença ou ausência de ramificações das cadeias e com a posição da molécula de sacarose terminal ou interna à cadeia.

Frutanos do tipo inulina consistem de cadeias lineares de unidades de frutose com ligações do tipo β (2,1), tendo o trissacarídeo 1-cestose como seu precursor e ocorrendo predominantemente em dicotiledôneas, principalmente em Asterales. Fleanos ou levanos, também de cadeias lineares, possuem as unidades de frutose unidas por ligações do tipo β (2,6), tendo a 6-cestose como o trissacarídeo inicial e sendo encontrados em monocotiledôneas, como nos gêneros *Dactylis* e *Poa*, da ordem Poales. Os graminanos são constituídos de cadeias mistas, formadas a partir da bifurcose, com ligações β (2,1) e β (2,6), sendo encontrados, por exemplo, em trigo e cevada da ordem Poales. As neoséries de frutanos podem apresentar ligações do tipo β (2,1), como na neosérie de inulina, ou β (2,6), na neosérie de fleano. Nestas, o trissacarídeo que dá origem à série é a neocestose, na qual a glicose é interna e não na extremidade da molécula, como é o caso da 1-cestose e da 6-cestose. As neoséries são encontradas em Liliaceae (como cebola e aspargo) e em Poales (como aveia e plantas do gênero *Lolium*) (Figura 1) (Pollock *et al.*, 1996; Ritsema & Smeekens, 2003).

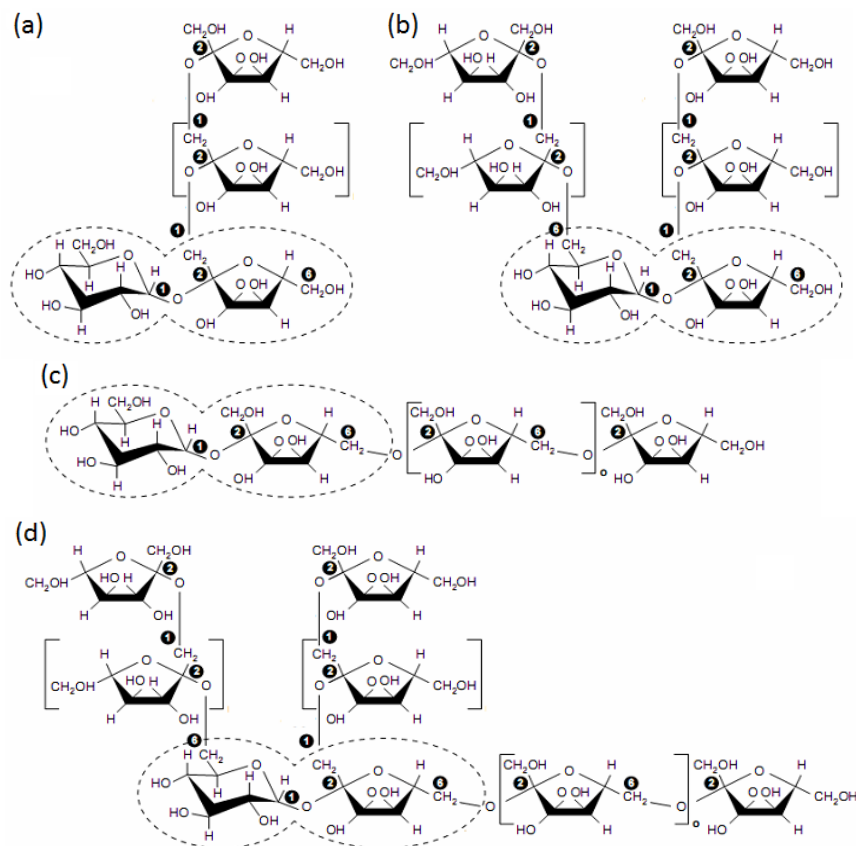
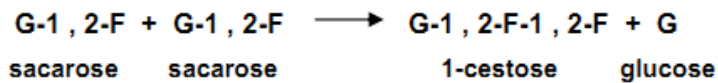
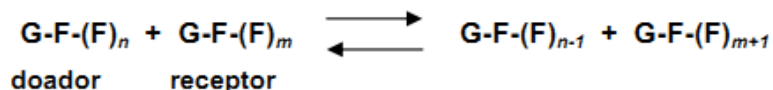


Figura 1. Estrutura dos diferentes tipos de frutanos encontrados nas espécies de plantas superiores. (a) inulina, (b) neosérie da inulina, (c) levano e (d) frutanos de cadeia mista. A molécula de sacarose sobre a qual a molécula de frutano é sintetizada está circulada (Ritsema & Smeekens 2003, modificado).

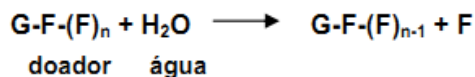
A síntese de frutanos do tipo inulina se dá pela ação conjunta das enzimas sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99), que catalisa irreversivelmente a formação do trissacarídeo 1-cestose a partir de duas moléculas de sacarose como mostrado abaixo:



E da frutano:frutano 1-frutosiltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100), que atua no alongamento das cadeias de frutanos, transferindo unidades de frutose de uma molécula doadora para uma receptora (Edelman & Jefford, 1968; Luscher *et al.*, 1996). Como a 1-FFT tem ação reversível, sua atuação também favorece a diminuição do comprimento da cadeia como mostrado abaixo:



. A mobilização dos frutanos se dá por ação de frutano 1-exohidrolases (1-FEH, EC 3.2.1.153) que retiram sequencialmente unidades de frutose, a partir de uma hidrólise (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro, 2007 e referências ali contidas):



Além da 1-SST e da 1-FFT, outras enzimas que atuam na biossíntese de outros tipos de frutanos, com formas estruturais diferentes da inulina já foram identificadas (Vijn & Smeekens, 1999), como a sacarose:frutano 6-frutosiltransferase (6-SFT, EC 2.4.1.10) e a frutano:frutano 6G-frutosiltransferase (6G-FFT, EC 2.4.1.243). A biossíntese dos diferentes tipos de frutanos pode ser resumida conforme o esquema apresentado a seguir (Figura 2):

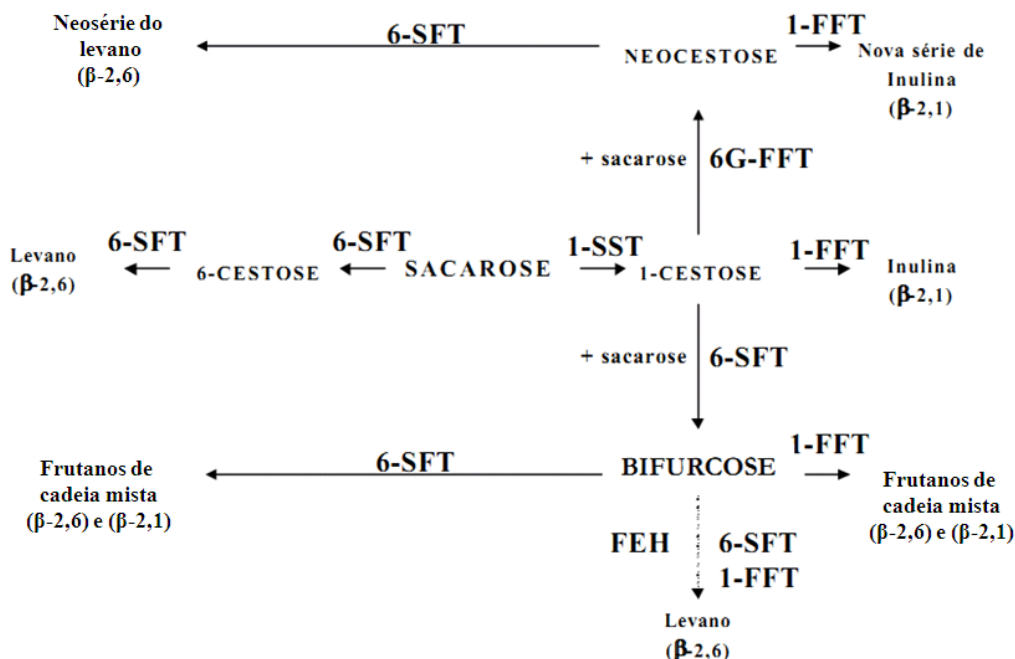


Figura 2. Modelo de biossíntese de frutanos. Adaptado de Vijn & Smeekens (1999).

Em geral, o grau de polimerização (GP) máximo das cadeias de frutanos varia de 30 a 50 unidades de frutose, mas, ocasionalmente, moléculas com GP até 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).

Frutanos são reconhecidos como compostos benéficos à saúde. São adicionados a vários alimentos como fibra dietética solúvel e substituinte de gorduras (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro, 2007 e referências ali contidas). Frutanos de cadeia curta, os fruto-oligosacarídeos (FOS), além de serem utilizados como adoçantes não calóricos, também são compostos bifidogênicos, cujos produtos de fermentação são efetivos na redução da pressão sanguínea, da glicemia e das taxas de triglicérides e colesterol (Yamasaki & Matsumoto, 1993; Roberfroid, 1993). Além disso, os FOS apresentam ação anti-tumoral (Taper *et al.*, 1999) e estimulam a absorção de cálcio, magnésio e ferro no intestino (Roberfroid, 2002). Atualmente, a inulina

disponível para utilização industrial é produzida na Europa, principalmente a partir de raízes tuberosas de *Cichorium intybus* (Asteraceae), tendo a sua produção industrial aumentado de 1000 para 100 000 toneladas anuais entre a década de 1990 e 2000 (Van den Ende *et al.*, 2002).

Plantas capazes de sintetizar frutanos estão presentes em muitas famílias não relacionadas filogeneticamente, sugerindo uma origem polifilética deste metabolismo. A diversidade da distribuição filogenética e geográfica, e a ocorrência destes compostos em famílias mais derivadas, indicam que os genes necessários ao metabolismo de frutanos podem ter surgido em resposta a uma ou várias pressões de seleção em um passado relativamente recente. A disponibilidade de água pode ter sido um desses fatores de seleção que direcionou a evolução do metabolismo de frutanos nas plantas, uma vez que o surgimento da flora produtora de frutanos, ocorrido entre 30 e 15 milhões de anos atrás, coincidiu com o aparecimento da seca estacional. A distribuição da flora atual que apresenta o metabolismo de frutanos corresponde a regiões onde ocorre seca estacional (Hendry & Wallace, 1993).

A correlação entre disponibilidade de água e a evolução do metabolismo de frutanos é reforçada pelo papel destes compostos na resistência das plantas à seca (Pilon-Smits *et al.*, 1995; 1999) e ao frio (Livingston & Henson, 1998; Kawakami *et al.*, 2008). Frutanos são compostos osmoticamente ativos, que favorecem a retenção de água nos tecidos, e também atuam na estabilização de membranas durante a dessecação (Hinch *et al.*, 2007). Entretanto, os mecanismos pelos quais os frutanos desempenham esses papéis ainda não foram completamente elucidados. Alterações na concentração e composição de frutanos e nas atividades das enzimas do seu metabolismo foram relacionadas a variações sazonais de temperatura, disponibilidade de água e outros fatores ambientais para várias espécies do cerrado (Carvalho & Dietrich, 1993; Isejima & Figueiredo-Ribeiro, 1993; Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1995; Portes *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2011).

Além do frio e da seca (Portes *et al.*, 2008; Asega *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2011; De Roover *et al.*, 1999), outros efetores exógenos e endógenos, como a concentração de açúcares (Pollock & Cairns, 1991; Asega & Carvalho, 2004; Maleux & Van den Ende, 2007), a desfolhação natural ou induzida (Asega & Carvalho, 2004; Portes & Carvalho, 2006; Asega *et al.*, 2011; Morvan *et al.*, 1997), a concentração de hormônios vegetais e outros tipos de estresses são capazes de regular o metabolismo de frutanos (Van den Ende *et al.*, 2002). Estes estresses, combinados ou individualmente, promovem alterações nas atividades das enzimas de síntese e degradação e assim modificam a concentração e a composição destes carboidratos. Com relação à regulação hormonal, são poucos os trabalhos que demonstram sua influência no acúmulo de frutanos e na regulação dos genes e enzimas envolvidos.

Michiels *et al.* (2004) estudaram a regulação das 1-FEHs em *C. intybus* e identificaram na região promotora do gene *1-FEH IIa* motivos associados à regulação por diversos reguladores hormonais como auxina, ácido abscísico (ABA), etileno, giberelinas (GA), ácido salicílico e por sacarose, mostrando que a regulação dos genes do metabolismo de frutanos é bastante complexa. Genes deste metabolismo (*1-FEH*, *1-FFT* e *1-SST*) já foram clonados de algumas espécies, sendo a maioria de monocotiledôneas da ordem Poales (*Lolium perenne*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Bromus pictus*, *Zea mays*, *Agropyrum cristatum*, *Festuca arundinacea* e *Oryza sativa*). Dentro da ordem Asterales, cujas espécies acumulam frutanos do tipo inulina, foram clonados genes de *Cichorium intybus*, *Helianthus tuberosus* e *Campanula rapunculoides*, além de *Vernonia herbacea* (Asega *et al.*, 2008) e *Viguiera discolor* (Van den Ende *et al.*, 2005) cujos genes de 1-FEH e 1-FFT, respectivamente, foram isolados, sequenciados e expressos em *Pichia pastoris*.

Em *Lolium perenne*, a indução da atividade da 1-FEH após a desfolhação foi reduzida por inibidores da biossíntese de giberelinas (Morvan *et al.*, 1997), entretanto nenhuma correlação

positiva entre os níveis de giberelina A_1 e a mobilização de frutanos foi encontrada (Morvan-Bertrand *et al.*, 2001).

Em *Allium cepa*, a diminuição do conteúdo de frutanos concomitante à diminuição dos níveis endógenos de ácido abscísico (ABA) foi observada em bulbos armazenados em condições de atmosfera controlada e baixa temperatura (Chope *et al.*, 2006). Foi verificado, ainda por estes autores, que o início da brotação dos bulbos ocorre em uma concentração endógena mínima crítica de ABA. Neste caso, se a concentração de ABA está associada ao controle da dormência em algumas espécies, este regulador estaria associado também ao metabolismo de carboidratos, uma vez que estes são mobilizados para prover energia para o crescimento dos ramos logo após a dormência.

O ABA é um hormônio vegetal presente em todas as plantas vasculares, sintetizado em praticamente todos os tecidos vivos, sendo que os precursores para sua síntese estão presentes nos plastos (cloroplastos, leucoplastos, proplastídeos, cromoplastos) e podem ser transportados via xilema e floema. Seu papel fisiológico envolve a sua participação na maturação de sementes e na inibição da germinação precoce, promovendo acúmulo de reservas e tolerância à dessecação. Em plantas adultas, o ABA, além de estar envolvido nos processos de senescência foliar, atua na regulação do fechamento estomático em resposta ao estresse hídrico, reduzindo a perda de água por transpiração e promove, em alguns casos, o crescimento de raízes e inibição do desenvolvimento da parte aérea (Lafitte *et al.*, 2007).

O ABA é reconhecido também como um importante sinalizador de respostas aos estresses abióticos, regulando, a partir de alterações em sua concentração, vias ABA-dependentes (Krasensky & Jonak, 2012). É o caso do metabolismo de açúcares, que apresenta alterações nos seus transcriptomas quando expostos ao ABA exógeno e diferentes estresses ambientais (Van den Ende & El-Esawe, 2014).

Em *H. vulgare*, a tolerância ao congelamento devido ao aumento de açúcares solúveis foi correlacionada com os níveis de ABA, que apresentou aumento dos seus níveis endógenos em respostas à baixa temperatura, o que foi necessário para a segunda fase de aclimação das plantas ao frio (Bravo *et al.*, 1998). O envolvimento deste regulador na aclimação ao frio também já foi discutido para *Acer saccharum* (Bertrand *et al.*, 1997) e *Solanum commersonii* (Chen *et al.*, 1983).

Além da associação dos níveis endógenos de ABA com o frio e com mudanças no metabolismo de frutanos em condições de déficit hídrico tal evento é igualmente relatado. Plantas de *Dactylis glomerata* e *L. perenne* apresentaram o aumento dos níveis de sacarose e de frutanos de alto peso molecular e redução do teor de monossacarídeos e frutanos de menor GP quando submetidas a 80 dias de seca. Os níveis de ABA em *D. glomerata* ao longo dos 80 dias aumentaram significativamente e reduziram após irrigação (Volaire *et al.*, 1998).

Van den Ende & El-Esawe (2014) relataram que as concentrações de ABA aumentaram significativamente em caules de trigo em condições de seca e foram correlacionadas com o aumento da atividade das enzimas de síntese da sacarose e 1-FEH e com a redução da 1-SST. Quando tratadas com um inibidor de síntese de ABA (fluridona) apresentaram uma redução da atividade das enzimas sacarose-fosfato sintase (EC 2.4.1.14), da 1-FEH e da invertase ácida (EC 3.2.1.26), promovendo a remobilização de carbono e aumentando o peso dos grãos. Quando tratadas com ABA exógeno, estas plantas apresentaram maior quantidade de transcritos da 1-FEH em relação ao controle.

As auxinas também são hormônios que desempenham papel importante na regulação do crescimento vegetal. São sintetizadas, em geral, em tecidos de rápida divisão celular, especialmente em meristemas apicais caulinares, folhas jovens, frutos em desenvolvimento e em sementes, embora também sejam produzidas em níveis inferiores, por exemplo em folhas

maduras e ápices radiculares. A auxina natural mais abundante é o ácido indol-3-acético (AIA), relacionada ao estímulo de divisão celular, alongamento e expansão das células, à diferenciação celular e à formação de primórdios foliares. No entanto, são escassos os estudos que associam o metabolismo de frutanos aos níveis endógenos de AIA, como o de Michiels *et al.* (2004) já mencionado e o de Barreto *et al.* (2010), no qual plantas de *Agave tequilana* tiveram o teor de frutanos aumentado na presença de ácido 1-naftalenoacético. Isto porque, dada a importância deste hormônio e dos carboidratos de reserva no desenvolvimento e crescimento vegetal, uma relação entre os níveis de AIA e a regulação metabolismo de frutanos, pode ser esperada.

Um bioma brasileiro que apresenta condições ambientais adversas como a seca e o frio, além da ocorrência de fogo e estresse nutricional característicos, é o Cerrado, caracterizado por duas estações bem definidas, inverno seco e verão chuvoso (Coutinho, 2002; Eiten, 1972). A vegetação apresenta crescimento sazonal e estratégias adaptativas para superar as condições ambientais adversas. Dentre estas estratégias, estão os órgãos subterrâneos espessados encontrados em um grande número de espécies herbáceas que atravessam períodos de acúmulo de fotoassimilados durante o seu desenvolvimento (Mantovani & Martins 1988).

A Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu, em São Paulo, é constituída, predominantemente, por áreas de cerrado. Nesta região, o clima é definido como úmido, mesotérmico e com grandes variações na disponibilidade hídrica, sendo a distribuição das chuvas ao longo do ano e não o total anual de precipitação, um dos fatores limitantes à vegetação. No período correspondente às estações, de outono e inverno (abril a agosto), há uma diminuição acentuada da disponibilidade de água, e no período de primavera e verão (setembro a março), aumento da disponibilidade de água (Figura 3) (Vuono *et al.*, 1986). Estudo realizado por Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro (1993) mostrou que cerca de 60% das Asteraceae desta Reserva

Biológica acumulam os fotoassimilados na forma de frutanos do tipo inulina em seus órgãos subterrâneos de reserva.

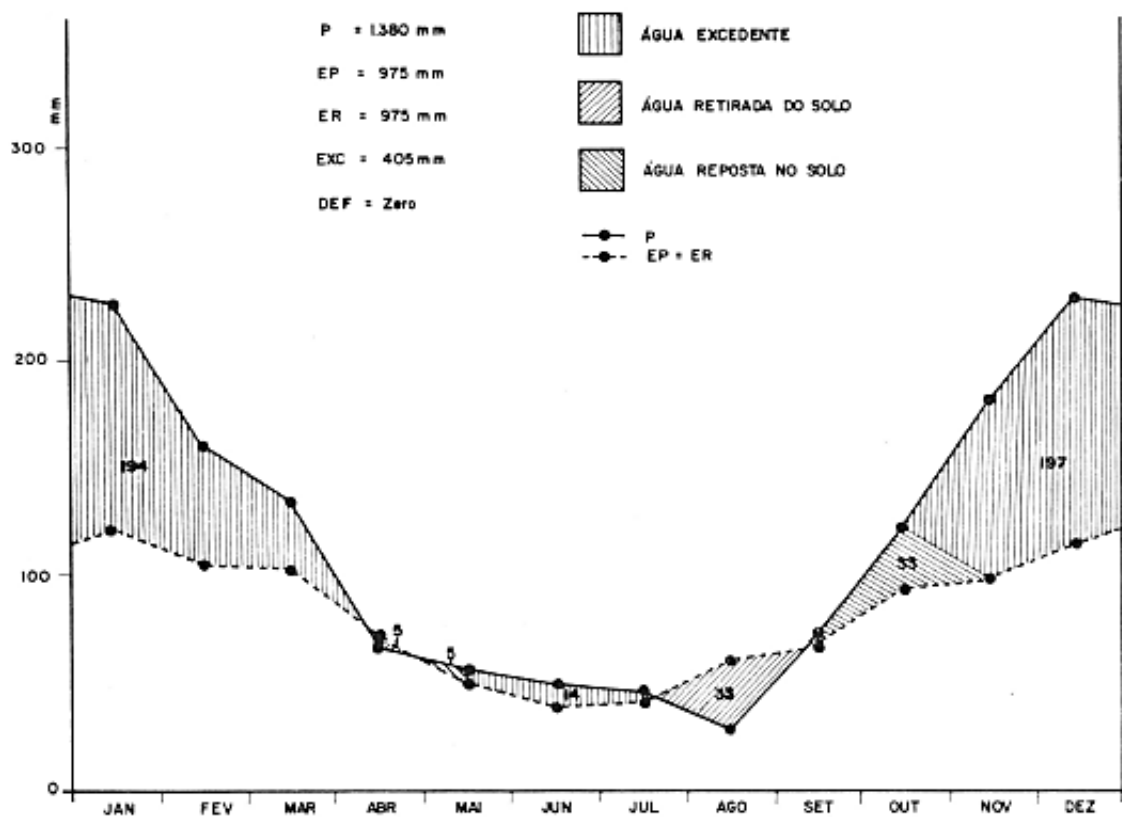


Figura 3. Balanço hídrico normal da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu no decênio de 1971-1980 (Vuono *et al.*, 1986)

A espécie *Vernonia herbacea*

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby é uma espécie perene do cerrado que apresenta crescimento sazonal. Seus órgãos subterrâneos, rizóforos, possibilitam a reprodução vegetativa da espécie por meio da brotação de gemas ali existentes, e atuam como órgãos de reserva para a planta, acumulando até 80% de sua massa seca em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich, 1993). Vários aspectos do metabolismo de frutanos em *V. herbacea* foram investigados desde os primeiros estudos na década de 1990, incluindo os efeitos do estresse hídrico (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004; Garcia *et al.* 2011) e do frio (Dias-Tagliacozzo *et al.* 1999; Portes *et al.* 2008), da desfolhação e rebrota (Asega & Carvalho 2004; Portes & Carvalho, 2006), bem como o efeito da adubação nitrogenada (Cuzzuol *et al.* 2008) e de elevadas concentrações de CO₂ atmosférico (Oliveira *et al.*, 2010).

O ciclo anual de desenvolvimento de espécies herbáceas do cerrado, incluindo *V. herbacea* é caracterizado por fases fenológicas bem definidas. O crescimento sazonal de *V. herbacea* já foi descrito por Carvalho & Dietrich (1993) e é marcado pela senescência e perda dos órgãos aéreos ao final do outono, iniciando um período de dormência (junho). Próximo ao final do inverno (agosto) tem início a mobilização dos carboidratos de reserva, detectada pela redução do conteúdo total de frutanos e o aumento de açúcares redutores, para a emissão de novos ramos aéreos, mancando a brotação que dará início a um novo período vegetativo no início da primavera (outubro). Por outro lado, o conteúdo mais elevado de frutanos durante o ciclo fenológico foi detectado ao final da estação de crescimento vegetativo, no verão, indicando ser este, um período de biossíntese deste carboidrato.

Mais tarde, Portes & Carvalho (2006) confirmaram que a variação na composição de frutanos observada ao longo do ciclo fenológico em rizóforos de *V. herbacea* ocorreu

concomitantemente às mudanças nas atividades das enzimas do metabolismo de frutanos. A atividade da 1-SST foi praticamente ausente nas fases de brotação e dormência, enquanto a da 1-FEH ocorreu principalmente durante a brotação. Por outro lado, a atividade da 1-FFT foi detectada em todas as fases fenológicas.

O aumento da atividade da 1-FEH foi verificado durante a mobilização de frutanos associada ao processo natural de brotação e crescimento e quando este processo foi induzido pela excisão dos ramos aéreos (Portes & Carvalho, 2006, Asega *et al.* 2011). Verificou-se ainda que este aumento da atividade durante o processo de brotação, natural ou induzido, ocorre especialmente, na região proximal do rizóforo (Asega *et al.* 2011), enquanto o aumento da atividade de biossíntese na fase de crescimento vegetativo, no verão, ocorre principalmente na sua região apical (Portes & Carvalho, 2006).

Quando submetidas ao déficit hídrico, plantas de *V. herbacea* apresentaram aumento na razão fruto-oligo:polissacarídeos e nas atividades de enzimas de biossíntese de frutanos (ação da 1-SST e da 1-FFT) no período inicial de suspensão de regas, e despolimerização (ação da 1-FEH) na fase avançada de déficit hídrico (Garcia *et al.* 2011). Outro fator abiótico analisado, a alta $[CO_2]_{atm}$ promoveu o aumento da taxa de fotossíntese e da eficiência do uso da água, do crescimento e da produção de frutanos, devido ao aumento significativo da biomassa de rizóforos (Oliveira *et al.*, 2010).

O estudo da atividade e expressão da 1-FEH em plantas induzidas à brotação demonstrou que o controle da sua atividade se dá em nível de transcrição e que tanto a atividade quanto a expressão, aumentadas durante a brotação, são intensificadas em plantas armazenadas a 5°C (Asega *et al.*, 2011). Nessas condições verificou-se também um aumento da razão fruto-oligo:polissacarídeos, sugerindo que os oligossacarídeos estão envolvidos não apenas na tolerância ao déficit hídrico (Garcia *et al.*, 2011), como também na tolerância das plantas ao frio.

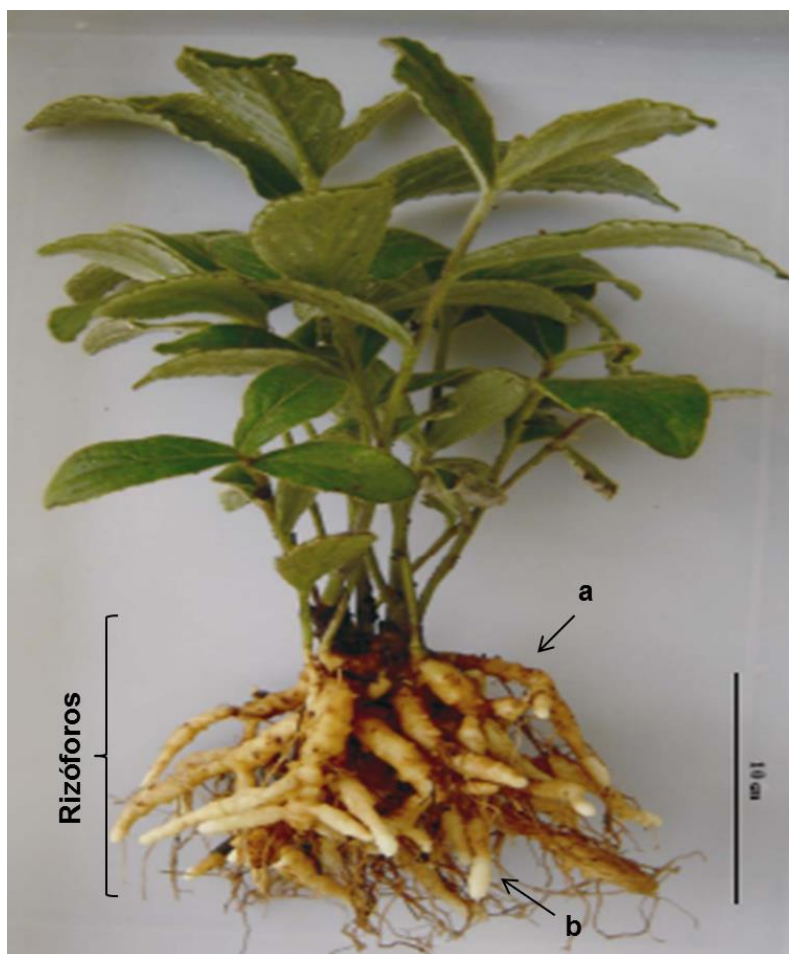


Figura 4. Aspecto geral de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, no qual, **a** indica o segmento proximal e **b** o segmento distal dos rizóforos.

Considerando que alguns estudos demonstraram uma correlação entre teores de ABA, conteúdo e composição de frutanos, dormência e a tolerância à seca e ao frio e que, pouco se sabe sobre os níveis endógenos de ABA e AIA durante o ciclo fenológico de *V. herbacea*, esta espécie se mostra um excelente modelo para o estudo da regulação do metabolismo de frutanos por fatores ambientais e endógenos. Desta forma, este projeto objetivou avaliar os níveis endógenos de ABA e AIA de plantas em campo e correlacioná-los com variações no teor e na composição

de frutanos, bem como na atividade e expressão das enzimas 1-SST, 1-FFT e 1-FEH e o papel na regulação do metabolismo de frutanos durante o ciclo fenológico de *V. herbacea*, com ênfase nos períodos de transição para a fase de dormência e baixa disponibilidade de água (ao final do outono) e de transição para a fase de brotação e aumento da disponibilidade hídrica (ao final do inverno).

2. OBJETIVOS

Analisar o metabolismo de frutanos frente às variações ambientais do cerrado e níveis de reguladores hormonais na transição para a fase de dormência e para a fase de brotação em plantas de *Vernonia herbacea* coletadas em campo, por meio de:

- Caracterização do status hídrico da planta e do solo;
- Análise do teor endógeno de ácido abscísico e ácido indol-3-acético nos rizóforos e na parte aérea;
- Caracterização do metabolismo de frutanos pela sua composição, atividade das enzimas e expressão dos genes de síntese e degradação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Plantas adultas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby foram coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP (22° 18'S, 47° 11'W) em diferentes épocas do ano e fases do ciclo fenológico que incluíram especificamente o período de transição para a dormência (disponibilidade hídrica baixa) e período de transição para brotação e crescimento vegetativo (elevada disponibilidade hídrica), num total de sete coletas (Tabela 1), todas realizadas próximas das 12h.

Tabela 1. Coletas de plantas de *Vernonia herbacea* em diferentes fases do ciclo fenológico na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP.

Coleta	Data de coleta	Fase fenológica	Sigla
1	26 de junho de 2012	Pré-dormência	PD1
2	14 de agosto de 2012	Brotação	B1
3	11 de setembro de 2012	Brotação	B2
4	05 de outubro de 2012	Brotação	B3
5	16 de janeiro de 2013	Vegetativo	V1
6	17 de abril de 2013	Vegetativo	V2
7	01 de julho de 2013	Dormência	D

Após a coleta em campo as plantas foram separadas em parte aérea (caules e folhas) e rizóforos proximais e distais e pesadas.

Amostras para análises bioquímicas e moleculares foram lavadas e congeladas em N₂ líquido, transportadas em gelo seco e armazenadas a -80°C para posterior análise.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E DO STATUS HÍDRICO DAS PLANTAS E DO SOLO

3.2.1. CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CLIMÁTICAS E DO AMBIENTE DE COLETA

Os dados climáticos foram fornecidos por duas empresas que possuem estações meteorológicas na região de coleta. Os dados de temperatura máxima e mínima foram obtidos da estação meteorológica da International Paper do Brasil Ltda e os dados de precipitação de duas estações da região (Posto termoéletico em Duas Pontes e em Sítio Maringoni) pertencentes à empresa AES Tietê S/A.

A partir desses dados foram calculadas a temperatura e a precipitação mensal dos pontos registrados diariamente e a precipitação acumulada, precipitação média e temperatura média dos sete dias que precederam os pontos de coleta. No caso da precipitação, calculou-se a média dos dados obtidos das duas estações. Todo o material de coleta foi obtido em pontos próximos à área de abrangência dos registros climáticos.

Amostras de solo foram coletadas com o auxílio de anéis volumétricos (100,08 cm³) em profundidades de 0-10, 20-30 e 40-50 cm para determinação de curvas de retenção de água do solo da área de coleta, seguindo protocolo de Cruz *et al.* (2005). As amostras de solo preservadas nos anéis, afim de não perder sua conformação original, foram enviadas ao Núcleo de Irrigação e Drenagem do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) para análise e confecção das curvas (Figura 5).

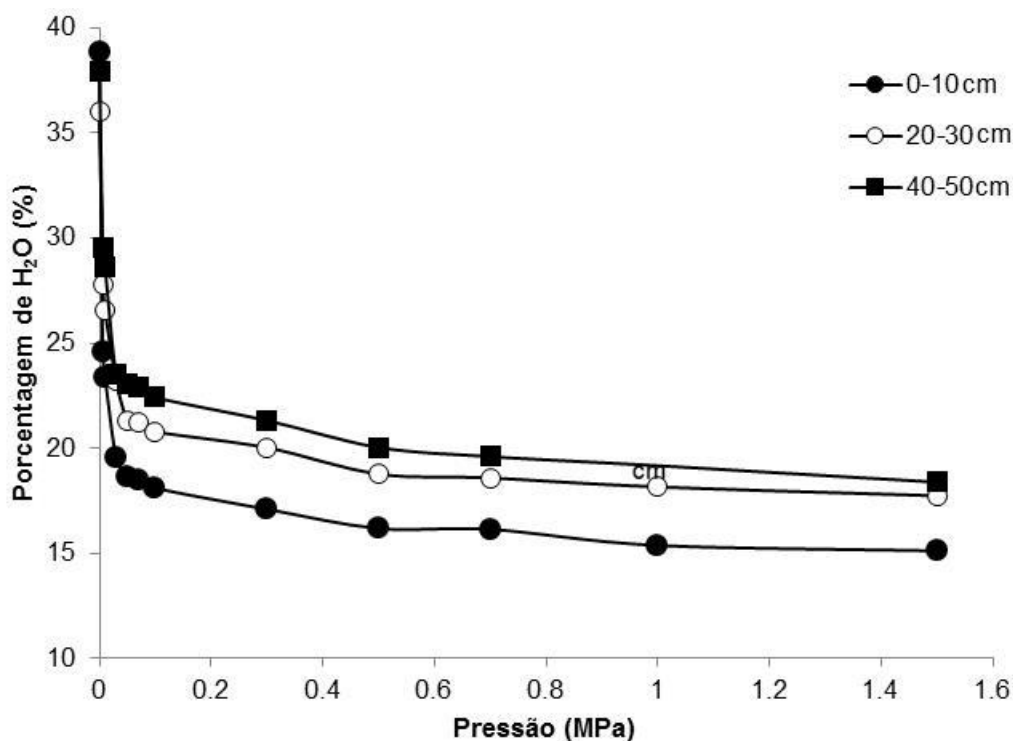


Figura 5. Curvas de retenção de água no solo de amostras coletadas em diferentes profundidades (0-10cm, 20-30cm e 40-50cm) em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (SP). (n=3).

3.2.2. TEOR DE UMIDADE DO SOLO

Para determinação do teor de água no solo ($U\%$), amostras de solo obtidas da rizosfera das plantas coletadas (20-40cm de profundidade) foram acondicionadas em latas de amostragem hermeticamente fechadas, imediatamente após a coleta. As amostras foram pesadas durante o processamento para determinação do peso fresco (PF). Em seguida, foram mantidas em estufa a 70°C por 72h, sendo novamente pesadas para determinação do peso seco (PS). O teor de água do solo ($U\%$) foi determinado pelo método gravimétrico através da seguinte equação: $U(\%) = (PF - PS / OS - Ta) \times 100$, em que Ta corresponde à tara das latas de amostragem.

3.2.3. TEOR DE ÁGUA DAS PLANTAS E POTENCIAL HÍDRICO DOS RIZÓFOROS

Assim como feito para o solo, o teor de água na parte aérea e rizóforos (segmentos proximal e distal) foi determinado pelo método gravimétrico. As amostras foram pesadas inicialmente para determinação do peso da massa fresca e, em seguida, a parte aérea foi seca em estufa a 70°C por 72h e os rizóforos congelados foram liofilizados. Após secagem e desidratação as amostras foram pesadas novamente para determinação do peso de massa seca.

Medidas do potencial da água dos rizóforos foram feitas a partir do suco celular extraído dos segmentos proximais e distais com auxílio de um espremedor manual, utilizando-se um osmômetro de pressão de vapor (modelo 5520 VAPRO, Wescor, Logan-UTAH). Foram selecionadas amostras preferencialmente nas mesmas profundidades de solo em que a umidade do solo foi determinada. As amostras foram acondicionadas em tubos de 2 mL hermeticamente fechados e levados para o laboratório para realização das medidas.

3.3. ANÁLISE DOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE ÁCIDO ABCSÍSCO E ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTOMETRIA DE MASSAS COM MONITORAMENTO SELETIVO DE ÍONS (CG-EM-MSI)

A extração de ácido abscísico e ácido indol-3-acético foi feita a partir de 100 mg de material fresco em solução de isopropanol:ácido acético (95:5) à qual foi adicionado 100 ng de padrão marcado de ABA ($[^2\text{H}_6]$ -ABA) e 250 ng de padrão marcado de AIA ($[^{13}\text{C}_6]$ -AIA). Após agitação a 4°C por 2 horas, o sobrenadante foi seco em fluxo de N_2 gasoso até cerca de 20-50 μL . Foi acrescentado 200 μL de H_2O deionizada e o pH foi ajustado entre 2,5 e 3,5 com HCl 2N, sendo em seguida adicionado 500 μL de acetato de etila, agitado por cerca de 1 min e o

sobrenadante recolhido. A extração com acetato de etila foi repetida por mais duas vezes e então o sobrenadante foi seco sob N₂ gasoso e ressuspendido em metanol.

Foi feita a metilação com 100 µL trimetil silil-diazometano durante 30 minutos e, em seguida, as amostras foram secas em fluxo de N₂ gasoso, e então solubilizadas com 30 µL de acetato de etila e analisadas em cromatógrafo a gás (CG) Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a um espectômetro de massa modelo 5973, com monitoramento seletivo de íons (CG-EM-MSI). A coluna utilizada para as separações foi a HP-1701 (30 m, D.I. 0,25 mm, 0,50 µm de espessura do filme interno) tendo hélio como gás carreador, com fluxo de 4 mL/min.. A coluna foi mantida a 150 °C por 3 minutos, seguida de rampa de temperatura de 5 °C/min até 210 °C e 15 °C/min até 260 °C. Foram monitorados os íons com relação massa/carga (m/z) em 130 e 189 (correspondentes ao AIA endógeno) e 136 e 195 (correspondentes ao [¹³C₆]-AIA) e também os íons com relação (m/z) 134, 162 e 190 (correspondentes ao ABA endógeno) e 138, 166 e 194 (correspondentes ao [²H₆]-ABA). As concentrações endógenas de AIA foram obtidas pela relação entre as áreas dos picos nos cromatogramas extraídos em m/z 130 e 136, aplicando os valores à equação: $Y = ((C_i/C_f) - 1) * X/R$, na qual, Y corresponde à quantidade de AIA no tecido, C_i à porcentagem inicial de m/z 136 relativa a m/z 130+136 (100%), C_f à porcentagem de m/z 136 relativa a m/z 130+136 encontrada no espectro, X à quantidade de AIA adicionado à amostra e R à taxa da fração de AIA endógeno que tem pico m/z 130 em relação à fração do padrão interno que é substituído e tem pico a m/z 136, determinado empiricamente como 1,13. A concentração endógena de ABA foi obtida pela comparação entre as áreas dos picos nos cromatogramas extraídos em m/z 190 e 194, conforme descrito em Ludwig-Muller *et al.* (2008).

3.4. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.4.1. EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

As extrações e a determinação das atividades das enzimas 1-SST, 1-FFT e 1-FEH foram realizadas com base na metodologia descrita por Asega & Carvalho (2004), mantidas em baixa temperatura durante todo o procedimento. Amostras de rizóforos previamente congeladas foram pulverizadas em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo, e homogeneizadas em tampão citrato-fosfato (Mc Ilvaine) 50 mM, pH 5,5, contendo 2 mM de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β -mercaptoetanol e 10% de polivinil polipirrolidona (PVPP), na proporção de 1:3 (p/v).

O homogeneizado foi mantido em repouso por 45 min e, em seguida, filtrado em tecido de náilon duplo, mantido em repouso em câmara fria por mais 1 hora e centrifugado por 20 min a 12.000 *g* a 5°C. O sobrenadante foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 20% de saturação e mantido em repouso e em câmara fria por 1 hora. Em seguida foi centrifugado por 20 min a 12.000 *g* a 5°C e o sobrenadante obtido foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação e mantido em repouso e em câmara fria por 1 hora.

Após centrifugação por 20 min a 17.000 *g* a 5°C, o precipitado, constituído principalmente de proteínas, foi ressuspendido em 1 mL tampão de extração e submetido à dessalinização em colunas de Bio Gel P-6 DG, equilibradas com o mesmo tampão.

O conteúdo de proteína dos extratos enzimáticos dessalinizados foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

3.4.2 ENSAIO ENZIMÁTICO

As misturas de incubação foram constituídas de extrato enzimático e substratos na proporção de 1:1 (v/v). Os substratos foram preparados em tampão Mc Ilvaine 50 mM, pH 4,5 para a enzima 1-FEH e pH 5,5 para a 1-SST e 1-FFT. Os extratos foram incubados a 30°C, utilizando-se substratos nas concentrações finais de 200 mM de sacarose para a atividade de 1-SST, 200 mM de 1-cestose para a atividade de 1-FFT e 5% de inulina de *Vernonia herbacea* para a atividade de 1-FEH. O tempo de incubação foi de 1 h para as atividades da 1-SST e da 1-FEH e 2 h para a atividade da 1-FFT. Para a determinação das atividades da 1-SST, 1-FFT e 1-FEH, as amostras das misturas de incubação foram diluídas em água deionizada e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução e detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema de cromatografia Dionex modelo ICS-3000, em coluna CarboPac PA-1 (2 x 250 mM). A eluição dos carboidratos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio) com a seguinte programação: 0 - 2 min, 15 mM; 2,1 - 17 min, 185 mM; 17,1 - 21 min, 500 mM; 21,1 - 30 min, 15 mM. Para a análise da atividade de 1-FEH, o gradiente utilizado foi: 0-2 min, 25 mM; 2,1-8 min, 50 mM; 8,1-8,5 min, 75 mM; 8,6-10 min, 100 mM; 10,1-28 min, 450 mM; 28,1-30, 500 mM; 30,1-40, 25mM. Os potenciais aplicados ao PAD para 0-0,4 s; 0,41-0,42 s; 0,43 s; 0,44-1 s foram 0,1; -2,0; 0,6; - 0,1, respectivamente e o fluxo aplicado foi de 0,25 mL min⁻¹ (Oliveira *et al.* 2013). A quantificação dos produtos formados foi feita utilizando-se padrões externos e comparando-os às áreas dos picos da 1-cestose, nistose e frutose, para atividades da 1-SST, 1-FFT e 1-FEH respectivamente.

3.5. ANÁLISE DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS

3.5.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS

Amostras congeladas dos segmentos proximais e distais de rizóforos foram liofilizadas e pesadas para a determinação da massa de matéria seca. Destas, 500 mg foram submetidas à extração de carboidratos conforme Carvalho *et al.* (1998), com modificações. As amostras foram pulverizadas em almofariz, colocadas em etanol 80% e mantidas em banho-maria a 80 °C por 15 min, sendo então centrifugadas a 700 *g* por 15 min. Os precipitados foram re-extraídos em etanol 80% por duas vezes. Os sobrenadantes etanólicos foram reunidos e reservados. Os resíduos finais foram extraídos duas vezes em água a 60 °C por 30 min e filtrados a vácuo. Os sobrenadantes etanólicos e os filtrados aquosos foram reunidos, filtrados em tecido de algodão e concentrados em evaporador rotatório, para retirada do etanol, constituindo o extrato bruto. Parte deste foi submetido à precipitação a frio com três volumes de etanol, para separação das frações de fruto-oligossacarídeos (sobrenadante) e fruto-polissacarídeos (precipitado) após centrifugação a 2900 *g* por 15 min a 5 °C. O sobrenadante, foi concentrado em evaporador rotatório, e o precipitado foi ressuspensionado e solubilizado em água. Os conteúdos de frutose livre e combinada foram determinados no extrato bruto e nas frações de fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos, separadamente, pelo método de antrona modificado para cetoses (Jermyn, 1956). Na fração de fruto-oligossacarídeos foi determinado também o conteúdo de açúcar redutor (Somogyi, 1945). Em ambas as análises colorimétricas utilizou-se frutose como padrão.

3.5.2. ANÁLISE QUALITATIVA DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS PRESENTES NOS EXTRATOS BRUTOS E NA FRAÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

Para a análise qualitativa, amostras provenientes de três replicatas dos extratos (fração bruta e de fruto-oligossacarídeos) de cada ponto amostral foram unidas e submetidas a deionização em colunas de troca iônica, contendo resinas nas formas catiônicas (Dowex 50 WX8 - 100) e aniônicas (Dowex 1 X 8 -100) (Carvalho & Dietrich, 1993). Posteriormente, as amostras neutralizadas foram analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em cromatógrafo Dionex modelo ICS-3000, em coluna CarboPac PA-1 (2 x 250 mM). A eluição dos carboidratos foi feita utilizando-se a mesma programação descrita para análises dos produtos de incubação da 1-FEH (item 3.4.2.).

3.6. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para a extração de RNA e análise da expressão dos genes do metabolismo de frutanos, foram selecionadas amostras da porção distal e proximal dos rizóforos de duas plantas de cada um dos 4 pontos de coleta escolhidos com base nos resultados das análises bioquímicas, B1, B3, V1 e D, utilizando V1 como ponto comparativo (expressão relativa).

O RNA total das regiões proximais e distais dos rizóforos, previamente congelados e pulverizados em N₂ líquido, foi extraído utilizando-se o kit *Rneasy Plant Mini* (Qiagen), com tampão RLT e seguindo protocolo do fabricante. Os RNAs extraídos foram quantificados em Nanofotômetro (Implen) e submetidos à análise de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X a 2,8 V/cm para verificar a integridade do RNA obtido. Apenas amostras de RNA total

íntegro e com valor da razão de absorbância $\lambda_{260/280}$ entre 1,8 e 2,0 foram selecionadas para utilização.

Posteriormente, 1 μ g de RNA total foi tratado com DNase I, RNase-free (Thermo Scientific), seguindo orientações do protocolo, visando eliminar a contaminação com DNA genômico. As amostras livres de DNA genômico, foram diretamente utilizadas para a síntese de cDNA com o kit RevertAid H Minus Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific), utilizando a opção de Random priming disponibilizada no kit e seguindo as orientações do protocolo.

Para a obtenção de *primers* específicos para análise da expressão do gene que codifica a enzima 1-FEH foi utilizada a sequência de cDNA de *V. herbacea* obtida por Asega *et al* (2008), disponível no NCBI (nº de acesso AM231149). Para o gene normalizador *18S* (18S RNA ribossomal) foram utilizados *primers* desenhados a partir de sequência de *C. intybus* (Maroufi *et al.* 2010) (nº de acesso U42501). Para o gene que codifica a enzima 1-SST e para o normalizador EF, foram utilizados *primers* específicos obtidos nas sequências parciais desses genes, isoladas de *V. herbacea* (Trevisan 2014). Os primers foram desenhados com o auxílio do programa Primer 3 Plus (www.bioinformatics.nl) e analisados quanto ao teor de CG (%), TM (°C), formação de grampos, homodímeros e heterodímeros, utilizando o programa Oligo Analyzer (www.idtdna.com). A especificidade dos primers selecionados (tabelas 1 e 2) foi verificada utilizando a ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Os *primers* selecionados estão representados na Tabela 2.

A análise da curva de desnaturação dos fragmentos que confirma a presença de um único *amplicon* utilizando estes pares de *primers* é apresentada no Anexo 2 (Figura 19).

Para teste da especificidade dos primers e qualidade do cDNA sintetizado, os diferentes cDNAs foram misturados em quantidades equimolares e utilizados como molde para uma reação de PCR, visando verificar a presença de uma única banda e o tamanho da mesma. A reação de

PCR foi realizada a partir de 0,5 μ L de cDNA, com o Gotaq® Flexi DNA Polymerase (Promega). As condições de ciclo foram: 2 min a 95°C; 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C; e extensão final por 2 min a 72°C. O resultado da amplificação foi analisado em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X a 2,8 V/cm, confirmando a presença de uma banda única para cada par de *primer*.

A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando-se o kit EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen) em um termociclador Mastercycler® ep *realplex* 2S (Eppendorf), de acordo com as instruções do fabricante. O programa utilizado foi: 2 min a 50°C, 2 min a 95°C, seguido de 40 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 (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) para os diferentes tecidos analisados (Tabela 2).

Para as análises foram selecionadas duas plantas, sendo os cDNAs de cada amostra biológica sintetizados em duplicata, constituindo 6 repetições para cada região dos rizóforos de cada uma das duas plantas selecionadas. As reações de qPCR foram realizadas com triplicatas técnicas. A diluição do cDNA selecionada para as reações de qRT-PCR foi a de 1/100 para os dois genes (*1-SST* e *1-FEH I*). As amostras da mesma região do rizóforo de todas as coletas foram processadas na mesma corrida, sendo amplificadas em paralelo com o gene de interesse e o gene normalizador.

Tabela 2. Sequências e eficiências dos *primers* desenhados para utilização em experimentos de qRT-PCR com *Vernonia herbacea* (Trevisan 2014).

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Fragmento (pb)	Temperatura de Melting (°C)	Eficiência (%)	R ²	Equação da reta	Origem da sequência
1-FEH	F 5'-GGCGGATGTTACAATCTCGT-3'	199	60	99,8	0.9991	$y = -3.326x + 28.732$	Asega <i>et al.</i> , 2008
	R 5'-GTTTTGGAACACCCGAAAGA-3'		60				
1-SST	F 5'-CATGCTCTACACTGGCAACG-3'	102	62	93,4	0.9987	$y = -3.4896x + 29.073$	Trevisan, 2014
	R 5'-TAGATGGGTCCCGAAAATCC-3'		59				
EF	F 5'-GCTCCTGGACATCGTGACTT-3'	163	61	85,4	0.9926	$y = -3.73x + 22.98$	Trevisan, 2014
	R 5'-GACCCCAAGAGTGAAAGCAA -3'		60				
18S RNA	F 5'-GGCGACGCATCATTCAAAT-3'	163	60	98,8	0.9988	$y = -3.35x + 10.115$	Maroufi <i>et al.</i> , 2010
	R 5'-TCCGGAATCGAACCCTAAT-3'		60				

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. 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).

3.7. ANÁLISE DOS DADOS

Para análise dos dados foram realizadas correlações entre as médias de temperatura máxima e mínima, precipitação média e acumulada durante os 7 dias anteriores às coletas, e os parâmetros fisiológicos e bioquímicos avaliados. Os valores foram calculados utilizando correlação simples de Pearson e foram selecionadas correlações com r a partir de 0,6. O teste de significância para as correlações foi o Teste "t" de Student em nível de 5% de probabilidade.

Foi também realizada uma análise multivariada e confeccionado um gráfico de PCA, utilizando o programa PC-ORD6, avaliando as variáveis climáticas, bioquímicas e fisiológicas em relação aos pontos de coleta. Para isto, os dados obtidos foram transformados em escala logarítmica.

Para comparação dos dados quantitativos de carboidratos solúveis, atividades enzimáticas, níveis de reguladores hormonais e teor de água nas plantas e no solo foi realizada uma análise de variância de um fator utilizando-se o programa SISVAR 4.2, e aplicando-se o teste de Tukey com 5% de significância, comparando-se ao longo do período amostral cada segmento dos rizóforos (proximal e distal), parte aérea e teor de água no solo. Dados de ambos os segmentos dos rizóforos também foram comparados entre si em cada ponto de coleta.

4. RESULTADOS

4.1. CONDIÇÕES CLIMÁTICAS NO PERÍODO

Durante o período de amostragem das plantas, os meses com maior índice de precipitação foram aqueles correspondentes ao verão, dezembro de 2012 e janeiro de 2013, com 16 e 6mm de precipitação média, respectivamente. Os meses de outono e inverno (junho, julho, agosto e setembro) foram os mais secos, especialmente em 2012, sendo a precipitação média mais elevada em junho, 2,3 mm, e a mais baixa, próxima de 0 mm, em agosto de 2012. A amplitude térmica não variou na representação média mensal, sendo os meses mais quentes os correspondentes ao período de primavera e verão (de outubro de 2012 a março de 2013), variando entre 23°C e 25°C, e os meses de outono e inverno os mais frios, com temperaturas médias entre 15°C e 21°C (Figura 6A).

Para avaliar as condições climáticas em períodos mais próximos às datas de coleta e assim, considerar alterações que possam ser associadas às respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas, foram analisados os dados climáticos dos 7 dias que antecederam cada coleta, incluindo a soma de toda a precipitação ocorrida no período (precipitação acumulada) (Figura

6B). As coletas realizadas na fase de brotação, correspondente ao final do inverno, foram precedidas de valores próximos a 0mm de precipitação e nas de outono, que sinalizam o período de pré-dormência das plantas de *V. herbacea*, houve pouca precipitação, atingindo um valor máximo de aproximadamente 19mm acumulados, especialmente se comparada à coleta de verão, em V1, no qual a precipitação acumulada atingiu 236 mm. No período de 7 dias que antecedeu as coletas, as amplitudes térmicas foram mais acentuadas, sendo que as coletas de brotação, apresentaram as maiores amplitudes, variando em até 2,5°C aproximadamente, entre a máxima e a mínima. Nos demais pontos a variação máxima foi de aproximadamente 1°C entre as médias mensais.

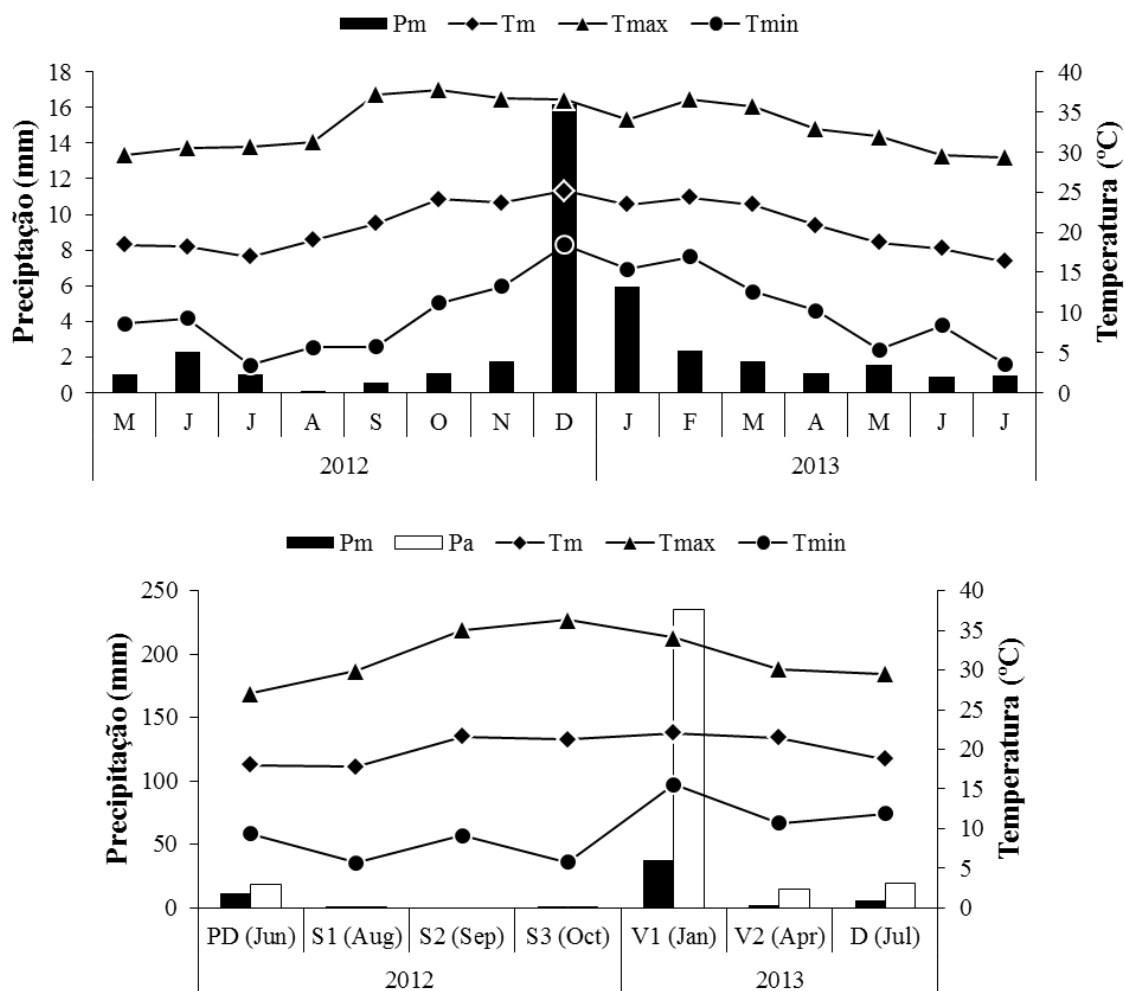


Figura 6. Precipitação média mensal (Pm) e temperatura média (Tm) máxima (Tmax) e mínima (Tmin) no período de análise, de maio de 2012 a julho de 2013 (A). Precipitação média (Pm) e acumulada (Pa) e temperatura média (Tm) máxima (Tmax) e mínima (Tmin) 7 dias antes da realização das coletas em campo de plantas adultas de *Vernonia herbacea* (B) na região próxima a Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP.

4.2. STATUS HÍDRICO DO SOLO E DAS PLANTAS NAS DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO

A figura 7 mostra as variações no teor de umidade do solo e status hídrico das plantas nas diferentes fases da planta. Dentre as coletas realizadas, o menor percentual de água no solo foi verificado na brotação, em B2, com 8,3%, e o maior em V1, com 18,5%. Nos demais pontos de amostragem os valores foram intermediários e variaram entre 12,3 e 14,3% (Figura 7A).

A parte aérea das plantas, não apresentou variações significativas no teor de água, permanecendo entre 85 e 88%, exceto as plantas de PD1, que apresentaram 53%. Em B1, as plantas em início de brotação apresentavam apenas pequenos brotos, impossibilitando sua coleta e em D, não foram encontradas plantas com ramos aéreos (Figura 7B). Nos rizóforos, o teor de água, em geral, variou de 77 a 86%, permanecendo mais elevado na região proximal na maior parte dos pontos amostrados, especialmente em PD1, B1 e D, com diferenças significativas entre os segmentos proximal e distal. Em B3, os rizóforos distais apresentaram teor de água significativamente mais alto em relação às demais coletas e também em relação aos rizóforos proximais do mesmo ponto amostral (Figura 7D). Quanto ao potencial hídrico dos rizóforos, os valores mais elevados, próximos de -0,6 MPa, foram identificados em PD1 e os mais baixos, próximos de -1 MPa, em B1, B3 e V2, não havendo diferenças significativas entre as regiões proximais e distais, exceto em B3.

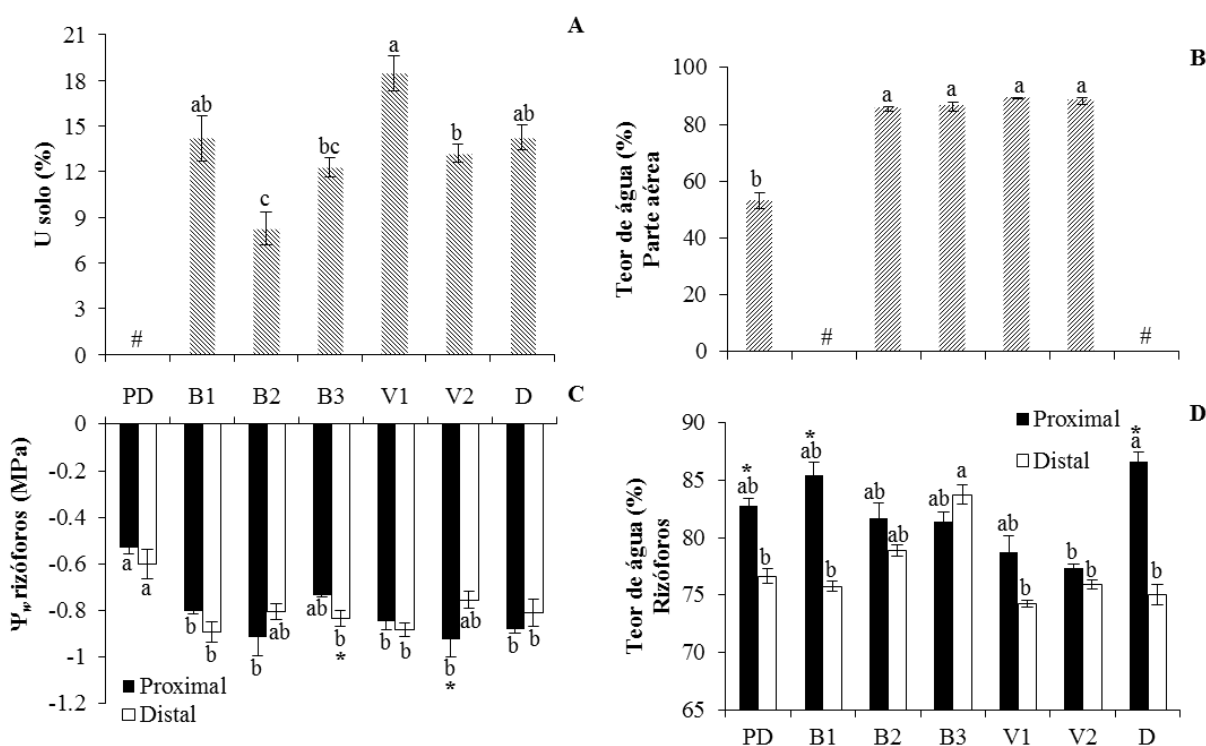


Figura 7. Teor de umidade do solo (A), teor de água da parte aérea (B), potencial hídrico (C) e teor de água (D) dos segmentos proximais e distais de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento. As barras representam o erro padrão (n=4). Letras minúsculas comparam cada segmento ao longo do tempo e * compara os segmentos (proximais e distais) dentro de cada ponto de coleta ($p < 0,05$). (# dados não amostrados).

4.3. NÍVEIS ENDÓGENOS DE ÁCIDO ABCÍSSICO E ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO EM PLANTAS DE *VERNONIA HERBACEA* EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO

O conteúdo de ABA na parte aérea das plantas apresentou um aumento gradual a partir de B2, até V2, atingindo 141 ng gMF^{-1} . B1 e D foram períodos não amostrados devido à ausência de parte aérea. A fase PD1, que precede a entrada em dormência, apresentou os menores teores de ABA endógeno (Figura 8A). O teor de AIA livre na parte aérea foi mais elevado no segundo

ponto de brotação (B2) com 28 ng gMF^{-1} e em seguida apresentou uma tendência à diminuição até a fase vegetativa (V2) (Figura 8B).

Nos rizóforos, não houve variação no teor de ABA entre os segmentos proximais e distais, exceto em D em que o segmento distal apresentou teor mais elevado do que o proximal. Os níveis mais altos foram observados em V2, atingindo cerca de 600 ng gMF^{-1} na porção proximal. Por outro lado, nos períodos de brotação B1 e B2, os níveis foram próximos de zero em ambos os segmentos (Figura 8C).

Quanto ao teor endógeno de AIA nos rizóforos, assim como o teor de ABA, apresentou pouca variação entre os segmentos, exceto em B3, com o teor médio mais elevado, cerca de 26 ng gMF^{-1} na região proximal e 20 ng gMF^{-1} na região distal. Diferentemente do observado para a parte aérea das plantas que apresentou o teor de AIA mais elevado, em B2, nos rizóforos, foi identificado o nível mínimo de AIA, $4,6 \text{ ng gMF}^{-1}$ na região distal (Figura 8D).

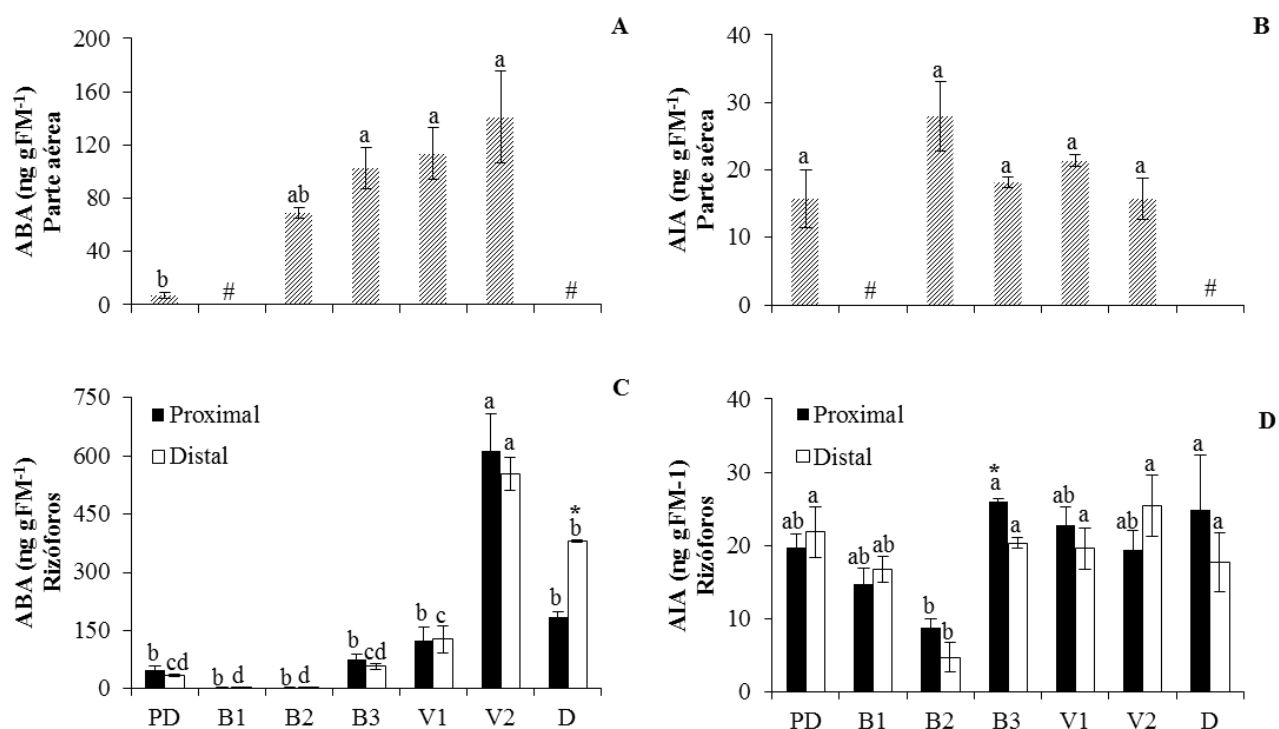


Figura 8. Teor de ABA (A) e de AIA (B) na parte aérea e teor de ABA (C) e de AIA (D) em segmentos proximais e distais de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento. As barras representam o erro padrão (n=3). Letras minúsculas comparam cada segmento ao longo do tempo e * compara os segmentos (proximais e distais) dentro de cada ponto de coleta (p<0,05). (# dados não amostrados).

4.4. ANÁLISES DO TEOR DE FRUTANOS EM RIZÓFOROS DE *VERNONIA HERBACEA* EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO

Nos extratos brutos, os conteúdos de frutose total nos segmentos proximais dos rizóforos não apresentaram variações significativas entre as diferentes fases, enquanto nos segmentos distais, os conteúdos foram inferiores dos demais apenas em B3 e D. A comparação entre os dois segmentos em cada fase analisada mostrou diferença significativa apenas em V1 e D, sendo mais elevado o teor no distal em V1 e no proximal em D (Figura 9A). O conteúdo de fruto-

polissacarídeos, não variou significativamente nos segmentos proximais nas diferentes fases. Entre os distais foi observada diferença significativa apenas entre a fase de brotação B3 e D. Nesta última fase, a região distal apresentou teor significativamente mais elevado em relação à proximal, mas nas demais fases, não foram encontradas diferenças entre as duas regiões do rizóforo (Figura 9B).

O teor de fruto-oligossacarídeos não apresentou diferenças significativas entre as regiões em nenhuma das fases, mas sim entre as fases analisadas. Destas, os 3 pontos de coleta na fase de brotação apresentaram os valores mais baixos em relação às demais fases (Figura 9D). Com relação aos açúcares redutores, verificou-se uma tendência de diminuição desde a pré-dormência (PD1) até o segundo ponto de brotação (B2), embora sem haver diferença significativa. Em B3, os valores mais elevados de todo o período foram detectados em ambas as regiões dos rizóforos, valores que diminuíram a partir desta até a fase de dormência (D), sem haver, no entanto, diferenças significativas entre os rizóforos proximais (Figura 9C).

Os perfis cromatográficos dos fruto-oligossacarídeos, da sacarose e das hexoses glucose e frutose obtidos por HPAEC/PAD mostram que durante a brotação é notável o aumento da proporção das hexoses e sacarose em relação aos fruto-oligossacarídeos de inulina e consistente com a diminuição do GP das cadeias de frutanos, especialmente na fase mais avançada da brotação (B3) (Figura 11). Na região distal dos rizóforos esse perfil foi detectado mais claramente apenas na fase final de brotação (B3), embora a diminuição do GP tenha sido detectada nas 3 fases da brotação analisadas (Figura 13).

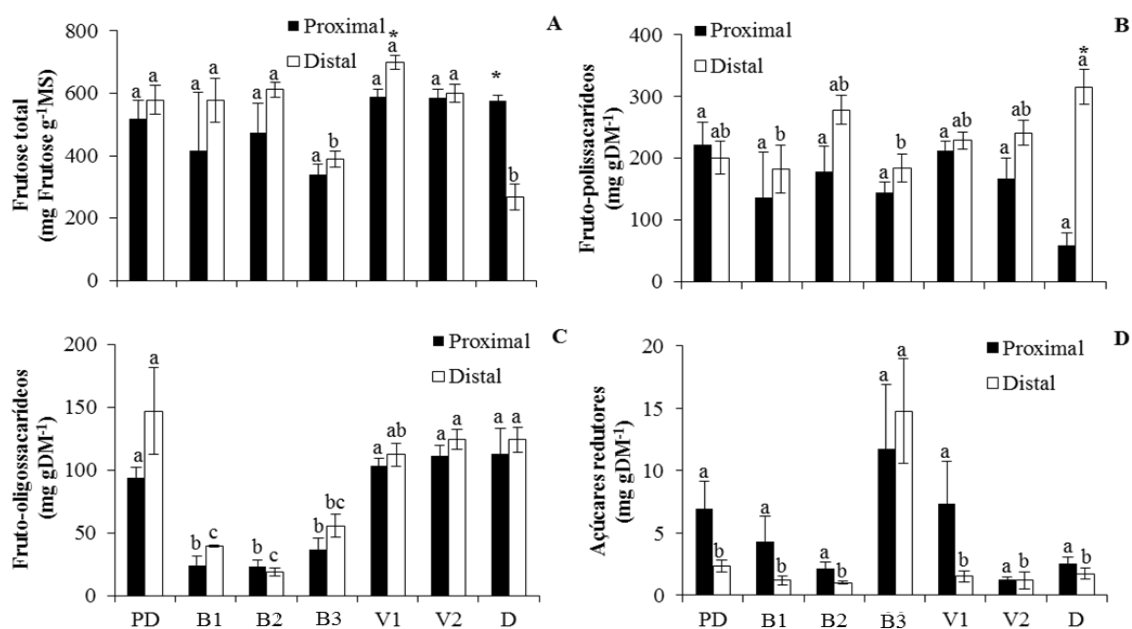


Figura 9. Teor de frutose total nos extratos brutos (A), na fração de fruto-polissacarídeos (B), e de fruto-oligosacarídeos (C) e teor de açúcares redutores (D) nos segmentos proximais e distais dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento. As barras representam o erro padrão (n=4). Letras minúsculas comparam cada segmento ao longo do tempo e * compara os segmentos (proximais e distais) dentro de cada ponto de coleta ($p < 0,05$).

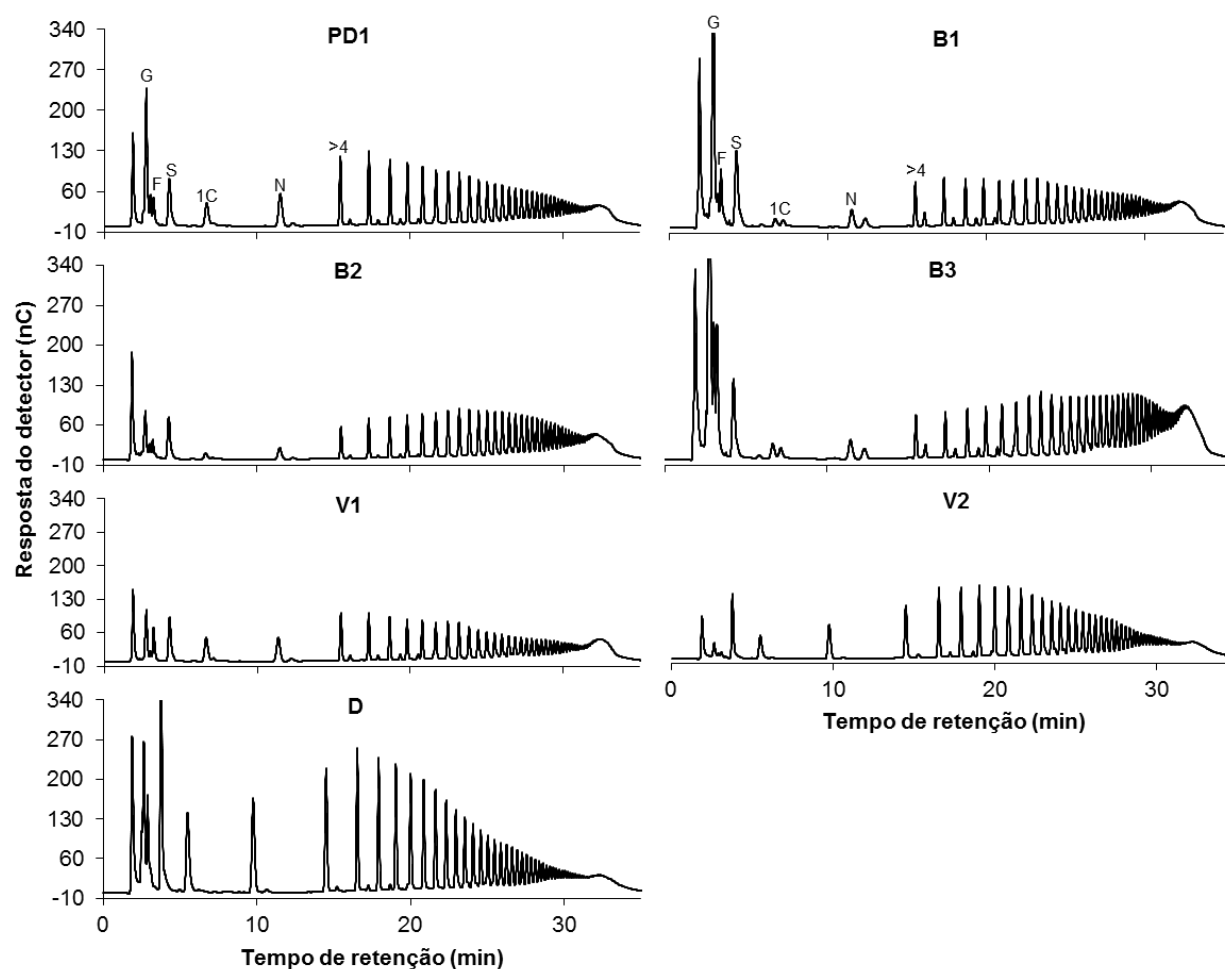


Figura 10. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD de carboidratos solúveis do extrato bruto dos segmentos proximais de rizóforos de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento. (n=3). G – glicose, F - frutose, S - sacarose, 1C - 1-cestose, N - nistose e >4 - sequência de frutanos com grau de polimerização maior que 4). Legendas das fases de desenvolvimento conforme Tabela 01.

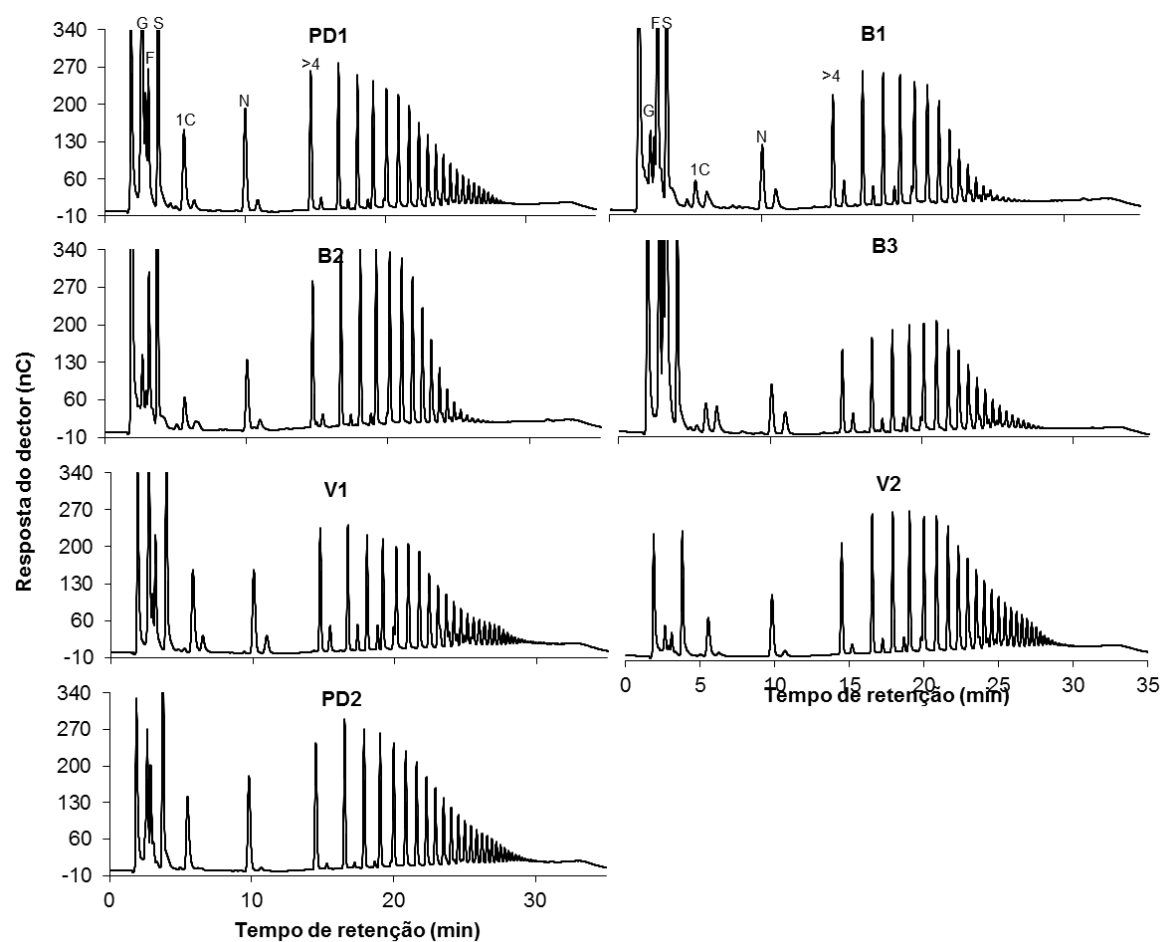


Figura 11. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD de carboidratos solúveis da fração de fruto-oligossacarídeos dos segmentos proximais de rizóforos de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento. (n=3). G – glicose, F - frutose, S - sacarose, 1C - 1-kestose, N - nistose e >4 - sequência de frutanos com grau de polimerização maior que 4). Legendas das fases de desenvolvimento conforme Tabela 01.

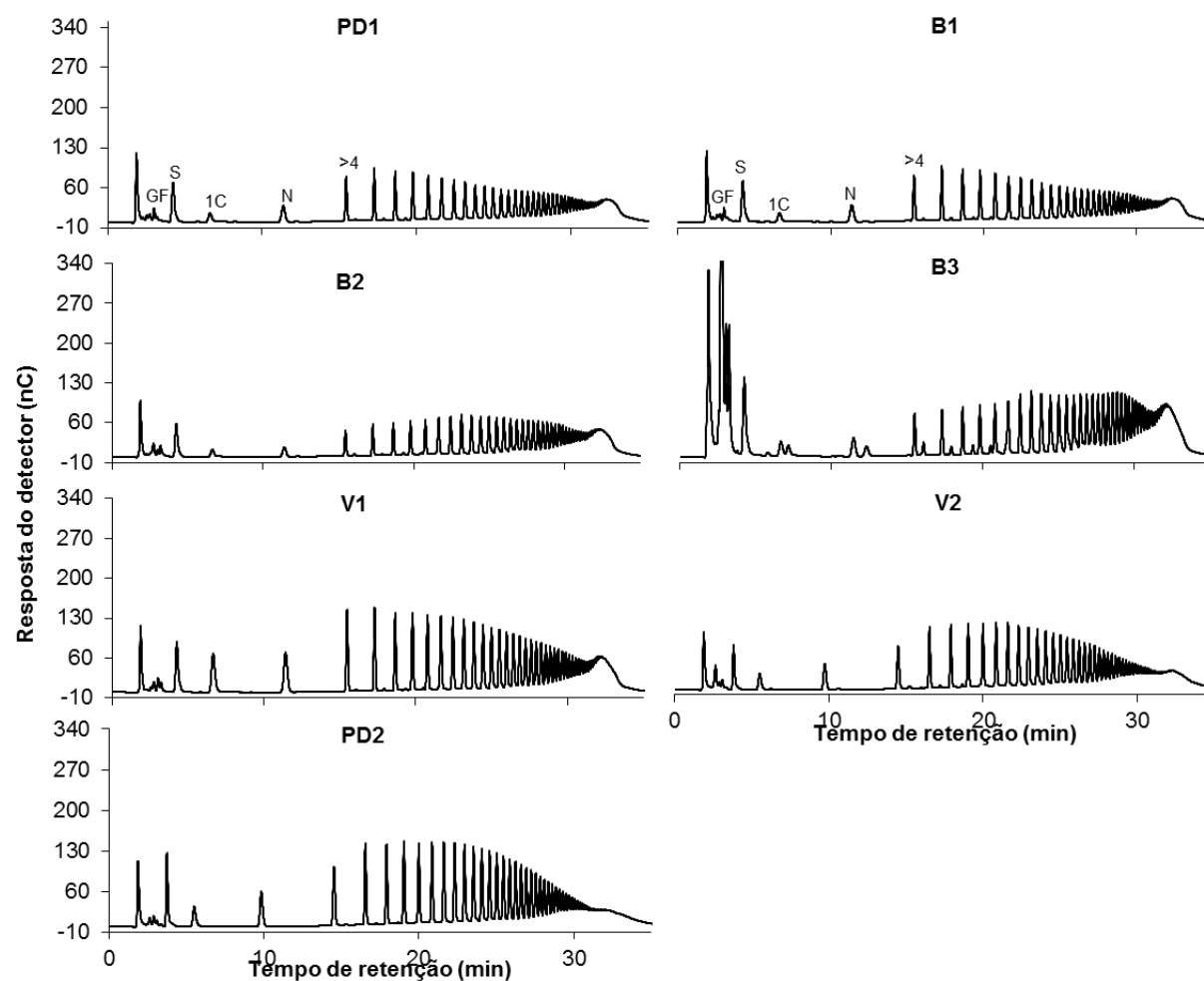


Figura 12. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD de carboidratos solúveis do extrato bruto dos segmentos distais de rizóforos de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento. (n=3). G – glicose, F - frutose, S - sacarose, 1C - 1-cestose, N - nistose e >4 - sequência de frutanos com grau de polimerização maior que 4). Legendas das fases de desenvolvimento conforme Tabela 01.

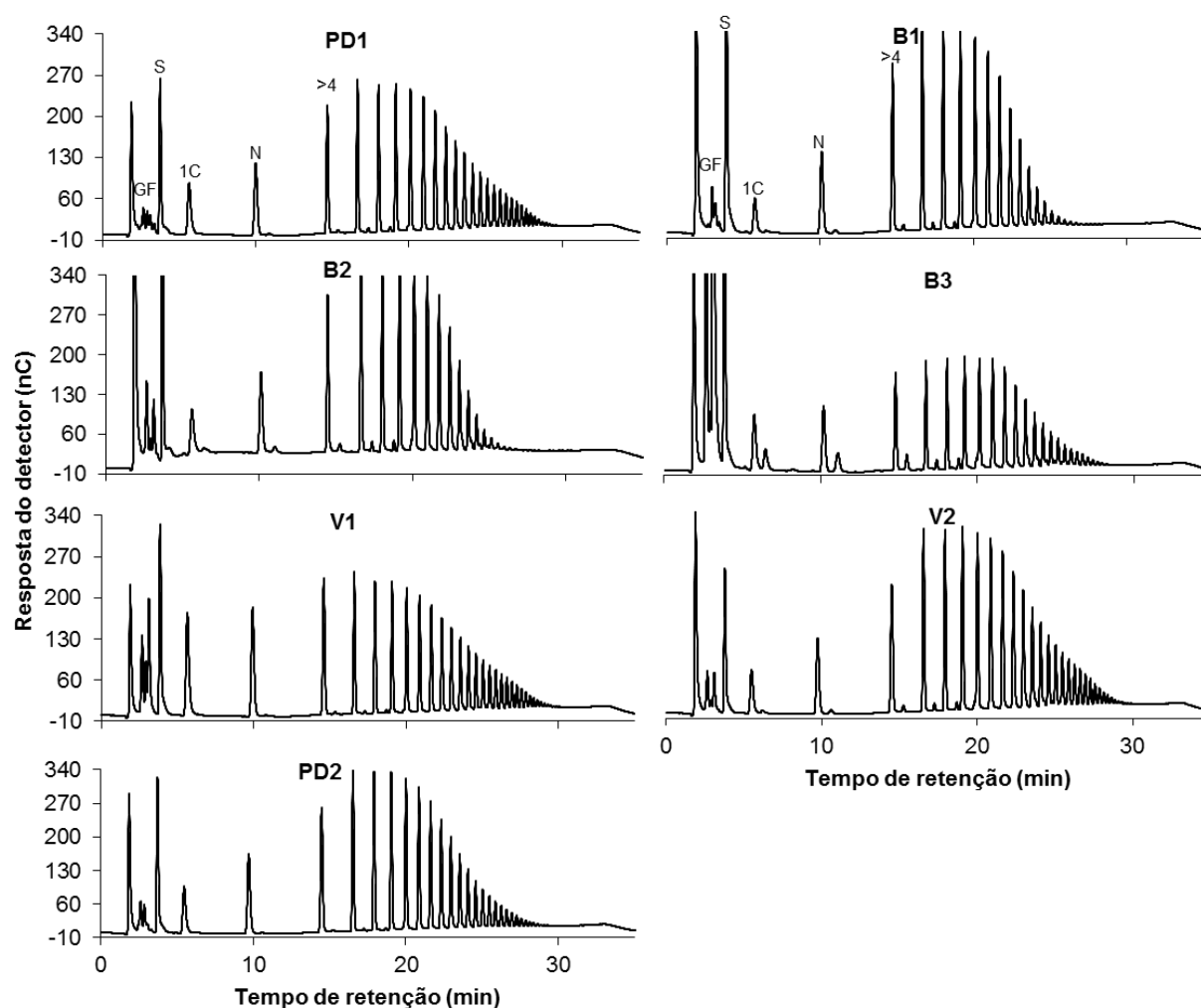


Figura 13. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD de carboidratos solúveis da fração de fruto-oligossacarídeos dos segmentos distais de rizóforos de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento. (n=3). G – glicose, F - frutose, S - sacarose, 1C - 1-cestose, N - nistose e >4 - sequência de frutanos com grau de polimerização maior que 4). Legendas das fases de desenvolvimento conforme Tabela 01.

A razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos apresentada na figura 14, mostra a redução na proporção de fruto-oligossacarídeos nos 3 períodos de brotação em relação aos fruto-polissacarídeos e um aumento acentuado dos carboidratos de menor grau de polimerização na região proximal em D devido a diminuição dos fruto-polissacarídeos neste ponto. No período B2, a proporção de fruto-polissacarídeos foi consideravelmente maior nos rizóforos, especialmente na região distal.

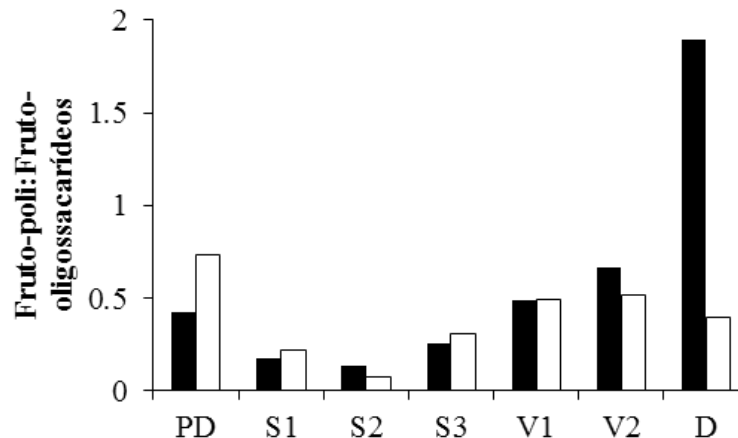


Figura 14. Razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos dos segmentos proximais e distais de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento.

4.5. ANÁLISE DAS ATIVIDADES DAS ENZIMAS 1-SST, 1-FFT E 1-FEH NAS DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS DE *VERNONIA HERBACEA*

A atividade da 1-FEH foi mais elevada nas porções proximais dos rizóforos em praticamente todos os pontos de coleta, havendo diferenças significativas nos pontos B1, V1 e V2. Foi observado também, um aumento significativo da atividade desta enzima durante a brotação (Figura 15A). Com perfil contrário à 1-FEH, a enzima 1-SST apresentou sua menor atividade durante a brotação, sendo nas porções distais dos períodos PD1 e, significativamente, em V1 a sua maior taxa de atividade (Figura 15B).

A 1-FFT permaneceu ativa durante todas as fases fenológicas, sendo sua atividade mais representativa entre as fases PD1 e B2. Em B1, a enzima apresentou atividade significativamente mais alta na porção distal, sendo este o único em que a atividade diferiu significativamente entre os dois segmentos dos rizóforos (Figura 15C).

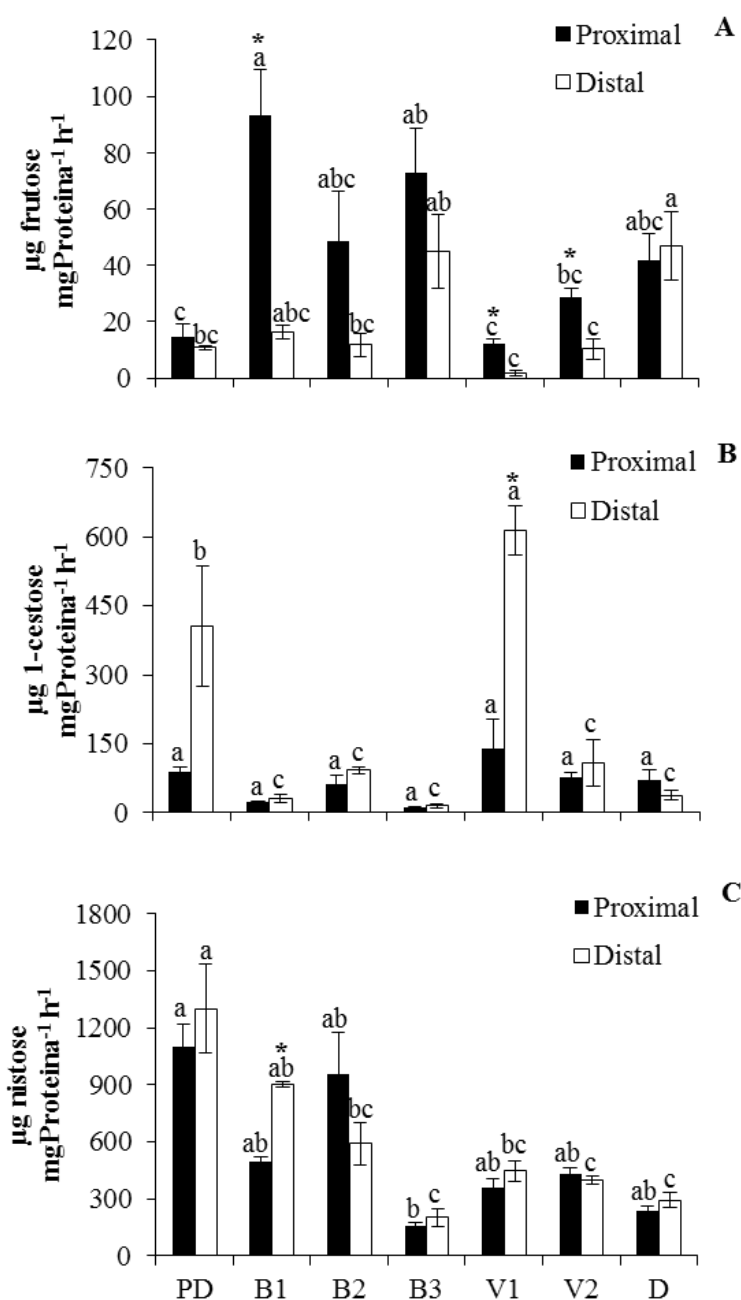


Figura 15. Atividade enzimática da 1-frutano-exohidrolase (1-FEH) (**A**), atividade enzimática da 1-sacarose:sacarose frutossiltransferase (1-SST) (**B**) e atividade enzimática da 1-frutano:frutano frutossiltransferase (1-FFT) (**C**) em rizóforos dos segmentos proximais e distais de plantas de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento. As barras representam o erro padrão (n=3). Letras minúsculas comparam cada segmento ao longo do tempo e * compara os segmentos (proximais e distais) dentro de cada ponto de coleta ($p < 0,05$).

4.6. EXPRESSÃO GÊNICA DO METABOLISMO DE FRUTANOS EM DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *VERNONIA HERBACEA*

O perfil de expressão do gene *1-FEH I* foi semelhante quando normalizado com os dois genes constitutivos. A expressão mais elevada foi observada na brotação, especialmente em B3, quando comparada com a expressão no período vegetativo (V1) nos segmentos proximais (Figuras 16A e 16B) e distais dos rizóforos (Figura 16C e 16D). No período B1, foi observada uma inibição nos segmentos distais da expressão do gene *1-FEH I* em relação ao período V1 (Figura 16C e D).

Quanto à expressão do gene *1-SST*, os pontos, B1, B3 e D, apresentaram inibição da expressão em relação ao período vegetativo. Os perfis de expressão relativa foram bastante similares quando normalizados com os genes *18S* e *EF* (Figura 17).

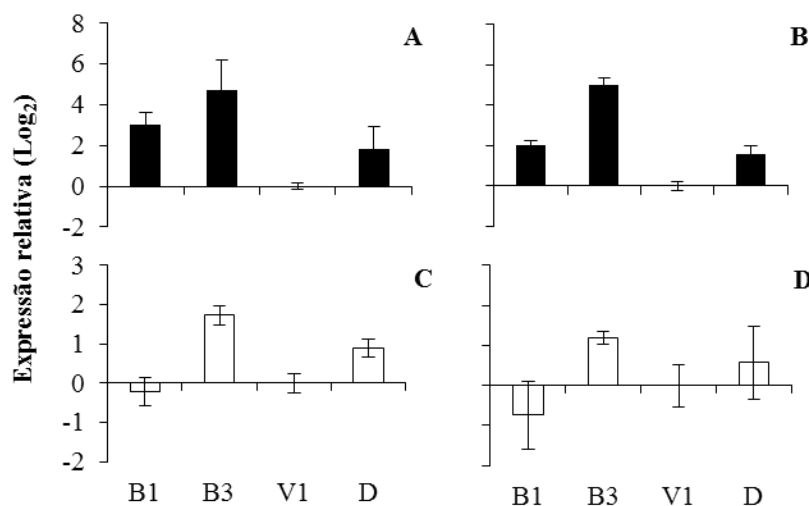


Figura 16. Expressão relativa do gene *1-FEH I* nos segmentos proximais (A e B) e distais (C e D) dos rizóforos utilizando os genes *18S* (A e C) e *EF* (B e D) e o estágio V1 como referência em plantas de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento. As barras representam o erro padrão (n=4).

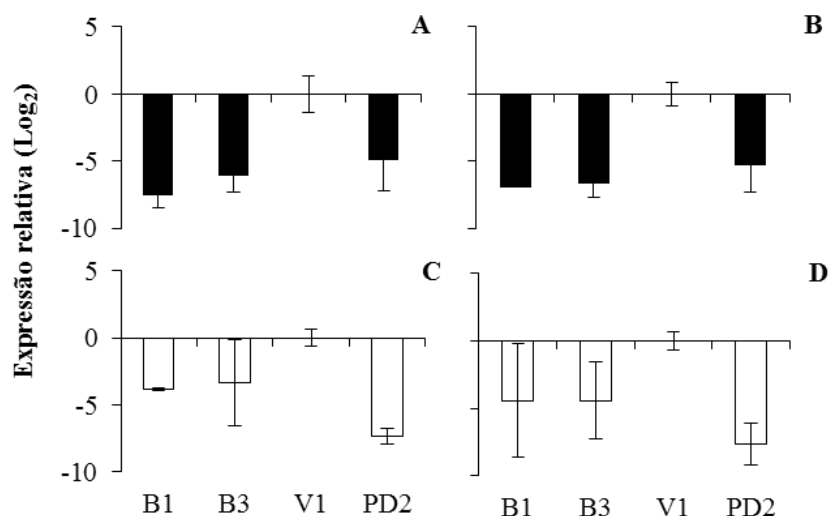


Figura 17. Expressão relativa do gene 1-SST nos segmentos proximais (A e B) e distais (C e D) dos rizóforos utilizando os genes 18S (A e C) e EF (B e D) e o estágio V1 referência em plantas de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento. As barras representam o erro padrão (n=4).

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de correlação obtidas encontram-se nas tabelas do Anexo 1 (Tabelas 3 e 4) e estarão apresentadas a seguir, na Discussão.

A análise multivariada em PCA apresentada na Figura 18, abrange cerca de 81% dos dados obtidos neste trabalho, sendo 51,4% englobados no eixo 1 e 29,5% no eixo 2. Na análise, é notável a pouca diferença entre os segmentos dos rizóforos, já que os scores mantiveram se próximos entre os dois segmentos. As variáveis teor de ABA, teor de AIA e teor de água na parte aérea foram as mais representativas nos pontos vegetativos de análise (V1 e V2) e também no último ponto da brotação analisado (B3), bem como a temperatura máxima e o teor de açúcares

redutores, sendo estes ainda mais próximos de B3. A atividade da enzima 1-SST também foi representativa nestes pontos de coleta, envolvendo também o ponto PD1.

Já a atividade das enzimas 1-FEH e 1-FFT e teor de água nos rizóforos tiveram maior representatividade em B1 e D, com uma discreta associação também para B2.

Os vetores de maior representatividade no eixo 2 foram o teor de fruto-oligossacarídeos, teor de ABA e de AIA nos rizóforos e a precipitação acumulada, associando-se principalmente ao ponto de D e aos períodos vegetativos, com discreta relação com PD1.

A variável potencial hídrico dos rizóforos foi pouco representativa nesta análise.

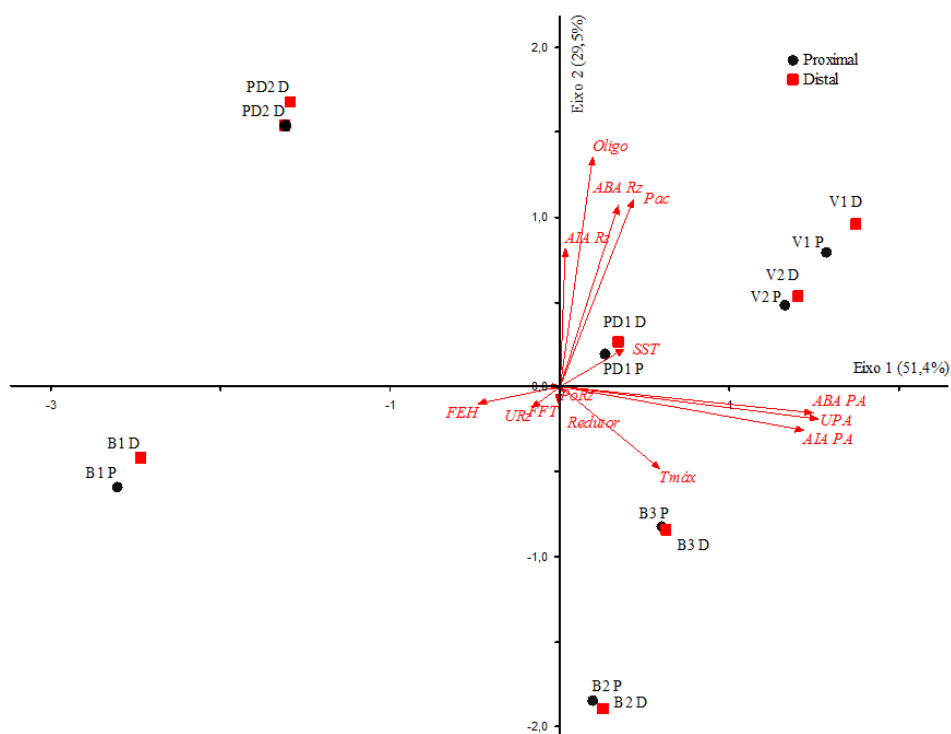


Figura 18. Análise multivariada em PCA das variáveis temperatura máxima ($T_{máx}$) e precipitação acumulada (Pac), potencial hídrico (PoRz) dos rizóforos, teor de água na parte aérea (UPA) e nos rizóforos (URz), teor de ABA e de AIA nos rizóforos (ABA Rz e AIA Rz, respectivamente) e na parte aérea (ABA PA e AIA PA), teor de fruto-oligossacarídeos (Oligo), açúcares redutores (Redutor) e atividade das enzimas FFT, SST e FEH em plantas de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP em diferentes fases de desenvolvimento. ($p < 0,001$ para ambos os eixos)

5. DISCUSSÃO

Conforme discutido por Vuono *et al.* (1986) a distribuição das chuvas ao longo do ano é um dos fatores limitantes ao desenvolvimento da vegetação do Cerrado. Os resultados apresentados na Figura 6A, mostram que, conforme característica sazonal do bioma (Coutinho, 2002), as estações de outono e inverno nas quais foram realizadas coletas para o presente trabalho (maio a setembro/2012 e abril a julho/2013) apresentaram baixa precipitação e temperaturas médias entre 15 e 21°C, enquanto na primavera e verão (outubro/2012 a março/2013) houve alta pluviosidade e temperaturas médias mais elevadas, entre 23 e 25°C.

A Figura 6B, que apresenta as variações climáticas nos sete dias que precederam os pontos amostrais, mostra a ausência de chuvas durante os períodos de brotação, que certamente são responsáveis pelos menores teores de umidade do solo entre B2 e B3 (Figura 7A). Resultado contrário é observado em V1, que foi precedido por alta pluviosidade (em dezembro/2012) e aumento da temperatura e por isso, apresentou o maior teor de umidade no solo. Em V2, a diminuição na precipitação e a diminuição da temperatura, que indicam a entrada do outono, propiciaram uma redução do teor de água no solo.

As variações no teor de água da parte aérea (Figura 7B) e dos rizóforos (Figura 7D) e do potencial hídrico dos rizóforos (Figura 7C), não parecem estar associadas diretamente às variações de precipitação, já que não foram observadas diferenças significativas, em nenhum destes parâmetros, entre V1 e D, nos quais houve maior pluviosidade sete dias antes das coletas, e entre B1 e B2, quando não houve incidência de chuva.

Os percentuais de água da parte aérea e dos rizóforos em plantas de *V. herbacea* submetidas à suspensão de rega, em trabalho de Garcia *et al* (2011), foram consideravelmente mais baixos, sendo os teores de água da parte aérea e dos rizóforos das plantas controle semelhantes aos obtidos no presente trabalho. Isso se explica pelo fato das plantas avaliadas por

Garcia *et al.* (2011) terem sido cultivadas em vaso, em casa de vegetação. Desta forma, um período relativamente curto sem fornecimento de água (25 dias), gera uma imposição de déficit bastante clara (potencial hídrico do solo em torno de -5 MPa), o que não foi observado em condições de campo, mesmo em períodos com baixa precipitação.

Ainda em plantas de *V. herbacea* submetidas à suspensão de rega em condições de casa de vegetação, os valores de potencial hídrico dos rizóforos foram inferiores aos observados em plantas de campo, atingindo valores de -2 a -6 MPa entre 10 e 25 dias de suspensão e sendo que as plantas controle apresentaram potenciais próximos de -1 MPa (Garcia, 2009). Em outro trabalho que avalia o efeito associado da suspensão de rega à elevação da concentração de CO₂ atmosférico, realizado por Oliveira (2012), as plantas controle apresentaram valores de potencial hídrico dos rizóforos inferiores a -1 MPa. Plantas de *Dactylis glomerata* e de *Lolium perenne*, também acumuladoras de frutanos, apresentaram potenciais osmóticos abaixo de -2 MPa após 20 dias sem rega e valores próximos de -1 MPa quando regadas (Volaire *et al.*, 1998).

O potencial hídrico dos rizóforos de plantas de campo, com valores próximos de -1 MPa, reforçam, portanto, a hipótese de que as plantas de *V. herbacea* não enfrentaram situações de déficit hídrico em campo ao longo de seu ciclo fenológico no período analisado, e que outros fatores ambientais podem ser os responsáveis pela regulação dos períodos de dormência e brotação.

Em trabalho realizado com plantas de *Gomphrena marginata*, que também acumulam frutanos, Silva *et al.* (2013) monitoraram as variações mensais nas condições climáticas e no status hídrico do solo e alterações no potencial hídrico e teor de água nos órgãos subterrâneos ao longo de um ano. Poucas variações no status hídrico das plantas de *G. marginata* foram identificadas, mesmo em períodos de baixa precipitação e baixo teor de umidade no solo, sugerindo que esta planta possui estratégias, para manter sua integridade mesmo na estação seca,

como por exemplo, a mobilização dos frutanos de menor GP acumulados observada nos órgãos subterrâneos.

De modo geral, ao analisar os dados da Figura 7, nota-se que apesar da variação da distribuição das chuvas entre as estações, há poucas variações significativas no teor da umidade do solo e no status hídrico das plantas. Considerando a curva de retenção da água no solo (Figura 5), que mostra que as maiores profundidades do solo retém cerca de 20% de água, é possível sugerir que um conteúdo basal de água, associado às características fisiológicas da espécie, impedem que as plantas de *V. herbacea* sejam submetidas à uma situação de déficit hídrico em campo.

Garcia *et al.* (2011) verificaram a mobilização de fruto-polissacarídeos e aumento de frutanos de menor peso molecular em *V. herbacea* para manutenção do equilíbrio osmótico em plantas submetidas à suspensão de rega. Conforme verificado no presente trabalho, apesar dos teores de açúcares redutores (Figura 9C) correlacionarem-se positivamente com o potencial hídrico dos rizóforos ($r=0,6$, $p<0,05$), as plantas de *V. herbacea* não enfrentaram uma condição de déficit hídrico em campo, sendo o papel da mobilização dos frutanos mais relevante para a produção de energia, emissão de novos ramos aéreos e, finalmente, início de um novo período de crescimento vegetativo.

As variações de temperatura ao longo do ano (Figura 6A) estão associadas aos níveis endógenos de ABA na parte aérea (Figura 8A), havendo uma correlação positiva entre estes dois parâmetros ($r=0,76$, $p<0,05$). Neste caso, por regular o fechamento estomático, o aumento da concentração de ABA na parte aérea pode ter ocorrido a fim de diminuir a perda de água por transpiração, mantendo assim a integridade do status hídrico das plantas, hipótese fortalecida pela correlação positiva entre temperatura e teor de água na parte aérea ($r=0,78$, $p<0,05$).

Por outro lado, Bravo *et al.* (1998) relataram o aumento dos níveis endógenos de ABA em três variedades de cevada submetidas a baixas temperaturas e Dierking & Kallenbach (2012) observaram que plantas de *Lolium arundinaceum* também submetidas à baixas temperaturas apresentaram aumento consistente dos teores endógenos de ABA associado a um aumento do teor de sacarose e frutanos na parte aérea.

Em *V. herbacea*, embora o teor de frutanos tenha sido similar nos diferentes estágios analisados, o estágio V2 foi o que apresentou o teor mais elevado de ABA tanto nos rizóforos como na parte aérea. Contudo, nos perfis cromatográficos dos extratos brutos dos segmentos proximais dos rizóforos (Figura 10) observou-se um aumento dos níveis de sacarose iniciado em V2 e que continuou até D, acompanhado da diminuição da temperatura do ambiente em relação ao mês anterior a este estágio (Figura 6A), e também uma correlação positiva entre os níveis de ABA nos rizóforos e de fruto-oligossacarídeos na porção proximal dos rizóforos ($r=0,62$).

Suárez-González *et al.* (2014) observaram que plantas *in vitro* de *Agave tequilana* e *Agave inaequidens* apresentaram maiores teores de fruto-oligossacarídeos quando tratadas com diferentes concentrações de ABA no meio (10 e 50 μ M) em relação às plantas controle. Considerando que em V2 os níveis endógenos de ABA nos rizóforos e parte aérea foram significativamente mais elevados (Figura 8C), pode-se sugerir que este aumento de ABA neste estágio do desenvolvimento, possivelmente desencadeado pela diminuição de temperatura, tenha proporcionado o aumento do teor de fruto-oligossacarídeos identificados em D.

Gusta *et al.* (2005), sugeriram uma relação entre as vias de sinalização endógenas reguladas por açúcares e por ABA. Segundo eles, alterações nos níveis endógenos de ABA podem mediar aspectos da sinalização de carboidratos. Os autores ressaltam a relação entre o aumento de ABA e a regulação dos teores de açúcares que atuam como crioprotetores e

mencionam trabalhos nos quais altas concentrações de glicose e/ou sacarose são associadas a altas concentrações de ABA, assim como observado no presente trabalho.

Durante o período de brotação, os níveis de ABA mantiveram-se próximos de zero nos rizóforos (Figura 8C). Considerando que este é um hormônio associado à dormência nas plantas, seu baixo teor neste estágio era esperado, permitindo assim a quebra de dormência das gemas e a consequente brotação de ramos aéreos e atividade de mobilização de reservas pela enzima 1-FEH (Figura 15A). Resultados similares foram observados na brotação de plantas de *Allium cepa* submetidas a diferentes condições de armazenamento (Chope *et al.*, 2006).

Foi no período de brotação, quando os tecidos de parte aérea iniciam seu desenvolvimento para um novo estágio vegetativo, que o teor endógeno de AIA livre na parte aérea (Figura 8B) foi mais elevado, especialmente em B2, resultado consistente com a fase de crescimento e alongamento celular dos ramos aéreos jovens. O teor de AIA livre na parte aérea correlacionou-se positivamente com o teor de fruto-polissacarídeos nas regiões distais dos rizóforos ($r=0,7$, $p<0,05$), provavelmente associado ao aumento de síntese de frutanos após o estabelecimento da parte aérea no período de brotação, em V1 (Figura 9B). Essa relação das auxinas na regulação do metabolismo de frutanos também foi identificada em calos de *Viguera discolor*, nos quais os ácidos 1-naftalenoacético e 2,4 diclorofenoxiacético promoveram a síntese de frutanos (Itaya *et al.* 2005) e em plantas de *A. tequilana* que apresentaram aumento do teor de frutanos quando tratadas com ácido 1-naftalenoacético *in vitro* (Barreto *et al.* 2010).

Em duas variedades de arroz, uma resistente ao estresse salino e outra não, o tratamento com AIA exógeno promoveu considerável aumento no teor de carboidratos solúveis totais (sacarose, glicose e frutose) além de contribuir para o aumento da massa dos grãos (Javid *et al.*, 2001). Juntamente com o aumento do teor endógeno de AIA livre nos rizóforos, no período final

da brotação, em B3, foi observado aumento do teor de fruto-oligossacarídeos, havendo uma correlação positiva com o teor de AIA nos segmentos distais dos rizóforos ($r=0,73$, $p<0,05$).

A diminuição no teor de fruto-oligossacarídeos (Figura 9D) nos rizóforos no período de brotação, evidencia a mobilização destes para a produção de energia e emissão de novos ramos aéreos, conforme já mencionado. Neste caso, o baixo teor de açúcares redutores em B1 e B2 sugere que estes açúcares são metabolizados rapidamente nesta fase, diferentemente do observado no final da brotação, a partir de B3, quando a parte aérea já estava bem estabelecida e o teor de açúcares redutores em ambos os segmentos dos rizóforos foi mais elevado.

Portes & Carvalho (2006) e Asega *et al.* (2011), trabalhando com *V. herbacea*, relataram que a enzima de hidrólise de frutanos (1-FEH) possui maior afinidade por cadeias mais curtas. Sendo assim, a maior atividade desta enzima (Figura 15A) nos períodos de brotação explica a diminuição de fruto-oligossacarídeos (Figura 9D) e as poucas modificações nos teores de fruto-polissacarídeos nestes períodos (Figura 9B), o que pode ser observado também na razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos (Figura 14). Além disso, durante a brotação, a atividade da 1-FEH é mais elevada do que a da enzima de síntese (1-SST) e predominante nos segmentos proximais dos rizóforos, em relação aos segmentos distais, que por sua vez, são os que apresentam maior atividade da 1-SST, predominantemente nas fases de crescimento vegetativo intenso, após a brotação (Figura 15B). Estes dados corroboram os obtidos por Portes *et al.* (2008) com plantas de *V. herbacea* cultivadas em vaso e cuja brotação foi induzida por excisão da parte aérea.

A atividade das enzimas do metabolismo de frutanos é influenciada por níveis endógenos de carboidratos (Farrar, 1996). Altas concentrações de sacarose promovem a biossíntese, aumentando a capacidade do órgão dreno de atrair e acumular fotoassimilados (Pollock & Cairns, 1991). Já a mobilização dos frutanos ocorre quando há um aumento da demanda por compostos de carbono para o crescimento da planta ou para permitir ajustes metabólicos em situações de

estresses. Assim, no presente trabalho, o aumento da atividade e da expressão do gene *Vh1-FEH I* foi observado durante a brotação de órgãos aéreos no ciclo anual de desenvolvimento, confirmando resultados anteriores de Portes & Carvalho (2006) ou ainda, durante a rebrota de plantas desfolhadas, conforme relatado em Asega & Carvalho (2004) e Portes *et al.* (2008). Verificou-se ainda, que o aumento da atividade da 1-FEH foi acompanhado do aumento da expressão do gene. Baixas temperaturas também podem induzir a atividade da enzima e expressão do gene 1-FEH I (Van den Ende & Van Laere 1996; Portes *et al.*, 2008; Asega *et al.* 2011) visando à diminuição do tamanho médio das cadeias de frutanos, e desta forma, o ajuste osmótico nas células, promovendo a tolerância das plantas ao frio. A diminuição da temperatura durante a dormência nos meses de junho e julho de 2012 (Figura 6A), pode ter sido um fator indutor da expressão e atividade da 1-FEH, detectada no início da brotação (Figura 15A).

Asega & Carvalho (2004) relataram que após a desfolhação, o aumento da atividade da 1-FEH e consequente mobilização das reservas de carbono nos rizóforos para a emissão de novos ramos em *V. herbacea* ocorreu devido à instalação de um déficit energético. Portes & Carvalho (2006) apresentaram dados semelhantes em estudo realizado com a mesma espécie ao longo do ciclo fenológico. As autoras mostraram que a atividade da 1-FEH foi mais elevada durante a rebrota das plantas, o que foi observado também no presente trabalho, adicionalmente à maior expressão do gene (Figura 16) em relação ao período seguinte, de crescimento vegetativo (V1).

Duas isoformas de 1-FEH foram identificadas por Asega (2007) durante a mobilização de frutanos em *V. herbacea*, sendo denominadas 1-FEH I e 1-FEH II. O cDNA *Vh1-FEH I* foi isolado de plantas em fase de brotação induzida e a análise de expressão heteróloga em leveduras confirmou se tratar de um gene funcional capaz de hidrolisar frutanos do tipo inulina. A expressão deste gene foi induzida em rizóforos de plantas submetidas a baixas temperaturas (Asega *et al.*, 2008). Quanto ao cDNA *Vh1-FEHIII*, sua sequência completa ainda não foi isolada,

mas análises de comparação de sequência mostram uma alta identidade deste gene com o gene FEHIIa de *Cichorium intybus*. Van den Ende *et al.* (2001) observou um forte sinal de hibridização dos genes homólogos aos de *V. herbacea* que codificam as duas isoformas em plantas de *C. intybus* desfoliadas (controle) e desfoliadas e mantidas sob baixas temperaturas (tratado). Os autores concluíram que os dois genes são regulados diferencialmente, sendo *CiFEH IIa* expresso preferencialmente em condições de aumento da demanda energética das plantas. O presente trabalho, avaliou apenas a expressão do gene *Vh1-FEH I*, que apresentou pico de expressão no estágio B3, posterior ao pico de atividade da enzima 1-FEH, que esteve mais ativa nos segmentos proximais dos rizóforos no estágio B1. Este resultado pode indicar que durante o período B1, de maior demanda energética, o gene *Vh1-FEH II* poderia estar mais expresso e sendo que em B3, o gene *Vh1-FEH I* teria sua maior expressão. A presença de isoformas de FEH foi reportada para diferentes espécies além de *V. herbacea*, como *Helianthus tuberosus* (Edelman & Jefford, 1964), *C. intybus* (Claessens *et al.*, 1990, Van den Ende *et al.* 2002), *Lolium rigidum* Gaud (Bonnett & Simpson, 1993) e, *Triticum aestivum* (Van den Ende *et al.* 2003, Van den Ende *et al.* 2005, Van Riet *et al.*, 2006).

A redução da expressão relativa do gene *Vh1-FEH I* após o estágio B3 foi acompanhada pela redução da atividade enzimática, indicando a existência de um mecanismo de regulação transcricional para este gene, influenciado direta ou indiretamente pelos teores endógenos de açúcares, como o aumento do teor de sacarose e/ou outros fatores ambientais. Os resultados das análises de atividade e expressão do gene *Vh1-FEH I* observados nesse experimento estão de acordo com os observados previamente para o gene em *V. herbacea* (Asega *et al.* 2008; Trevisan, 2014) e são consistentes com o papel da 1-FEH na mobilização das reservas de frutanos.

Asega *et al.* (2011) observaram aumento gradual da atividade da enzima e da expressão do gene *Vh1-FEH I* em plantas de *V. herbacea* induzidas à brotação por desfoliação, com pico de

acúmulo de transcritos 20 dias após a desfoliação. A indução da expressão do gene foi mais marcante em plantas submetidas à desfoliação e mantidas a 5°C, sendo que altos níveis de transcritos foram observados já com sete dias de brotação. Estes resultados reforçam que fatores ambientais, como o frio, podem intensificar a mobilização de frutanos característica do ciclo fenológico da planta e justificam atividade enzimática mais baixa nas plantas de campo utilizadas no presente trabalho.

Em raízes de *C. intybus* armazenadas em baixas temperaturas houve um aumento do número de transcritos do gene 1-FEH IIa. Foram identificados na região promotora deste gene motivos de resposta ao frio, além de motivos associados à regulação por hormônios (auxina, ácido abscísico, etileno, giberelina e ácido salicílico) e sacarose, sugerindo a complexidade da regulação dos genes do metabolismo de frutanos (Michiels *et al.*, 2004). No presente trabalho, a maior expressão do gene *Vh1-FEH I*, em B3, ocorreu quando o níveis de ABA nos rizóforos aumentaram em relação aos outros estágios de brotação, sugerindo uma possível regulação por ABA desse gene, assim como observado para o gene 1-FEHIIa de *C. intybus*.

A enzima 1-SST, apresentou baixa atividade durante o período em que 1-FEH esteve mais ativa. A atividade de 1-SST foi mais elevada em segmentos distais, em estágios vegetativos, especialmente em V1, e no primeiro período correspondente a pré-dormência (PD1) (Figura 15B). Nestas fases, os órgãos aéreos encontravam-se bem estabelecidos, podendo produzir fotoassimilados que são translocados e armazenados na forma de polímeros de frutose nos rizóforos por ação da 1-SST.

A atividade desta enzima é evidenciada quando observados o perfil cromatográfico dos açúcares de ambos os segmentos dos rizóforos (Figuras 10 e 12). Após o período de mobilização, marcado pelo descréscimo de 1-cestose, há um considerável aumento deste trissacarídeo precursor da série da inulina em V1, associado ao aumento da 1-SST e, posteriormente, em V2, é

observado um perfil de carboidratos semelhante ao observado em PD1 e D, indicando o re-estabelecimento das proporções de diferentes membros da série da inulina após a brotação. Resultados semelhantes foram apresentados por Nagaraj *et al.* (2004) com plantas de *Hordeum vulgare* (cevada), nas quais, ao longo do tempo de indução da enzima 1-SST, houve um aumento inicial de sacarose, seguido por aumento de 1-cestose e, posteriormente, de frutanos de maior peso molecular.

Desta forma, observou-se que a atividade da 1-SST acompanhou o perfil de expressão de seu gene de síntese, como visto por Trevisan (2014), sugerindo a existência de um mecanismo de regulação transcricional controlado, possivelmente, pela disponibilidade de sacarose, frutose e glucose em *V. herbacea*, carboidratos estes que atingiram níveis consideravelmente mais altos na fase B3, que antecede o aumento da 1-SST em V1.

Portes & Carvalho (2006) também detectaram maiores taxas de atividade desta enzima logo após a rebrota (induzida), em relação às plantas que permaneceram em estágio vegetativo, sugerindo que com o avanço do período vegetativo, a biossíntese de frutanos tende a diminuir progressivamente até a fase de dormência, o que é evidenciado em D, período no qual a parte aérea já estava senescida e a atividade da 1-SST foi consideravelmente baixa, igualando-se aos níveis verificados na brotação. De Roover *et al.* (1999) detectaram diminuição semelhante na atividade da 1-SST após rebrota de plantas desfoliadas de *Cichorium intybus*.

Níveis mais altos de expressão dos genes 1-SST e 1-FFT foram detectados em plantas *in vitro* de *A. inaequidens* tratadas com ABA exógeno. Este aumento de expressão coincidiu com o aumento de frutanos de maior GP (Suárez-González *et al.*, 2014). Assim como em *A. inaequidens*, o aumento de frutanos de maior GP foi verificado nos rizóforos de *V. herbacea* em D, após o considerável aumento de ABA em V2, contudo, em D não foi observado aumento da expressão de *Vh1-SST* em relação ao estágio V1.

As análises de correlação entre a precipitação média e a atividade da 1-SST também mostraram um índice positivo nos segmentos distais ($r=0,87$, $p<0,05$) e nos proximais ($r=0,85$, $p<0,05$) e uma correlação positiva entre a atividade desta enzima nas porções distais e a umidade do solo ($r=0,67$). Desta forma, o aumento da disponibilidade de água após o período seco de outono e inverno, pode promover atividades de síntese de frutanos, enquanto a menor disponibilidade, pode promover a degradação, como observado na correlação negativa entre a atividade da 1-FEH nas porções proximais e a precipitação média ($r=-0,65$).

Trevisan (2014) também discutiu a regulação das atividades de 1-SST e 1-FEH de *V. herbacea* cultivadas *in vitro*, na presença de glicose, frutose ou sacarose no meio de cultura. Independente da fonte de carbono, houve um aumento da atividade/expressão do gene *Vh1-SST* e diminuição do nível de transcritos para a síntese de 1-FEH. Estes resultados 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). De fato, há uma correlação negativa nas regiões proximais dos rizóforos entre a atividade das duas enzimas mencionadas ($r=-0,9$, $p<0,05$), reforçando esta hipótese.

Nossos resultados condizem com a literatura, uma vez que análises de expressão de genes envolvidos no metabolismo de frutanos revelaram que alterações nos níveis de transcritos são geralmente acompanhadas por alteração na atividade enzimática e no acúmulo de frutanos, sugerindo que a regulação desses genes se dá em nível transcricional, como observado em *V. herbacea* (Asega *et al.*, 2011), *H. vulgare* (Luscher *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2000), *C. intybus* (Van den Ende *et al.*, 2000) e *Lolium perene* (Chalmers *et al.*, 2003).

A atividade da 1-FFT (Figura 15C) entre os pontos B3 e V2, correspondente ao período entre o final da brotação e fase de crescimento vegetativo, parece estar relacionada à atividade de síntese, ou alongamento da cadeia de frutanos, pois a partir de B3, verificou-se a alta

concentração do trissacarídeo 1-cestose oriundo da atividade da enzima 1-SST, e substrato para a 1-FFT. A atividade da 1-FFT no sentido de síntese pode ser inferida pelo aumento dos picos do tetrassacarídeo nistose e de outros oligossacarídeos com GP mais elevados, detectado por HPAEC/PAD, principalmente entre os produtos das incubações mais prolongadas desta enzima, também a partir de B3. Atividade no sentido de alongamento da cadeia também foi verificado em V1 e V2 e em plantas de *V. herbacea* cultivadas *in vitro* (Trevisan, 2014). Além disso, o aumento de frutanos de maior grau de polimerização é representado em análise de correlação, na qual o teor de fruto-oligossacarídeos e a atividade da 1-FFT se relacionam positivamente nos segmentos proximais dos rizóforos ($r=0,6$).

O perfil da atividade desta enzima, como reportado anteriormente (Portes & Carvalho, 2006), é consistente com o fato da mesma atuar em diversas fases do metabolismo de frutanos, tanto no período da pré-dormência, em que há síntese de frutanos, como durante a mobilização destas reservas, quando a 1-FFT pode promover a diminuição do comprimento das cadeias, facilitando assim a atuação da 1-FEH nos períodos de agosto e setembro, durante a brotação. Esta atividade presente em períodos de síntese e de mobilização de frutanos pode dificultar a precisão de detecção da atividade enzimática.

Sendo assim, é provável que, durante a brotação, quando apresentou sua maior atividade entre os estágios PD1 e B2, a 1-FFT tenha atuado na mobilização de fruto-polissacarídeos, diminuindo o tamanho das cadeias e favorecendo a ação da 1-FEH, como apresentado por Asega & Carvalho (2004), em cujo trabalho, a 1-FFT apresentou picos de atividade juntamente com a 1-FEH, e em oposição ao perfil de atividade da 1-SST, durante a rebrota ocorrida após a excisão de órgãos aéreos.

Em diversos estudos realizados anteriormente com *V. herbacea*, a atividade da 1-FFT demonstrou poucas e pequenas variações tanto durante o ciclo fenológico (Portes & Carvalho,

2006) quanto 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). Van den Ende *et al.* (2000), analisando a dinâmica da sazonalidade no metabolismo de frutanos em *Taraxacum officinale*, verificaram que a atividade da 1-FFT permaneceu constante. Rutherford & Deacon (1974), verificaram que a atividade da 1-FFT, nas raízes de *T. officinale*, permaneceu mais elevada do que a da 1-SST, ao longo de todo ciclo fenológico. A atividade desta enzima, cujo perfil difere discretamente, no presente estudo, do encontrado em *T. officinale* e em outros estudos com *V. herbacea*, permaneceu sempre mais elevada em comparação a 1-SST e praticamente não variou significativamente entre os segmentos proximais e distais dos rizóforos.

Análises de correlação mostram que a atividade da 1-FFT nas porções distais dos rizóforos é negativamente correlacionada ($r=-0,63$) com a temperatura do ambiente, e nos segmentos proximais é também correlacionada negativamente ($r=-0,62$) com a umidade do solo. Assim, com a diminuição da temperatura ou da disponibilidade de água, esta enzima aumenta sua atividade em compatibilidade com a entrada no período de dormência, caracterizado justamente por tais condições ambientais.

Deve-se ressaltar que nenhum trabalho já realizado com *V. herbacea*, exceto o de Carvalho & Dietrich (1993) sobre as variações no teor e na composição de frutanos ao longo do período fenológico, utilizando plantas coletadas diretamente do campo, sendo que em todos os estudos prévios, as plantas coletadas em campo tiveram seus rizóforos fragmentados e plantados em vaso ou canteiro para realização dos experimentos. No caso específico de Trevisan (2014), as atividades enzimáticas foram determinadas em rizóforos de plantas cultivadas *in vitro*. Embora este trabalho demonstre o comportamento fisiológico e correlacione o perfil bioquímico e molecular do metabolismo de frutanos em plantas em situação natural em campo, fatores bióticos e abióticos podem interferir nos parâmetros analisados, tendo em vista que não é possível

controlar as condições ambientais, apenas monitorá-las. Dentre estes fatores podemos citar o sombreamento por espécies arbóreas ou herbáceas de maior porte, os solos oligotróficos em que estas plantas se desenvolvem e a possível competição provocada por espécies invasoras como *Urochloa* spp, *Megathyrsus maximus*, *Melinis minutiflora* e *Cenchrus purpureus*, gramíneas de ocorrência bastante comum em áreas de Cerrado e, particularmente, na área em que esse estudo foi realizado (Rodrigues, 2013).

Barbosa *et al.* (2008) discutiram o potencial invasor da espécie *Urochloa decubens* nos Cerrados e sua relação com o potencial alelopático da espécie. Extratos de raízes e folhas de *U. decubens*, inibiram a germinação de *Lactuca sativa* (Asteraceae) e *Phalaris canariensis* (Poaceae) e *Melinis minutiflora* (Poaceae), outra espécie invasora, além de afetar o desenvolvimento de suas raízes e parte aérea. Khalaj *et al.* (2013) ressaltam ainda diversos efeitos fisiológicos de compostos alelopáticos em plantas, como a redução do crescimento, alterando a divisão e diferenciação celular, o metabolismo de fitohormônios, as funções enzimáticas, a respiração e fotossíntese, alterando consequentemente a fixação de CO₂ e o metabolismo de carboidratos. A ocorrência de espécies com alto potencial alelopático no Cerrado de Mogi-Guaçu sugere que os compostos liberados no solo possam interferir no metabolismo de frutanos. No entanto, esta hipótese necessita futuras análises experimentais.

A análise multivariada dos dados obtidos em PCA mostra e reforça claramente pontos discutidos neste trabalho como, por exemplo, a maior importância das variáveis ABA, AIA e teor de água na parte aérea nos períodos vegetativos, bem como a atividade da enzima 1-SST, mais ativa nestes períodos. Já a atividade da 1-FEH é mais representativa especialmente no primeiro período de brotação, reforçando sua atividade na mobilização de reservas para o início de um novo período vegetativo.

As variáveis ABA nos rizóforos e precipitação acumulada são mais representativas nos períodos vegetativos e na dormência (D) devido ao fato destas fases ocorrerem justamente no período de maior pluviosidade no Cerrado e ao teor de ABA atingir valores próximos de zero durante a brotação.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro trabalho que contempla uma análise completa em diferentes fases de desenvolvimento de *V. herbacea* em campo, agregando análises de parâmetros ambientais à caracterização fisiológica, bioquímica e molecular do metabolismo de frutanos. Os resultados obtidos mostram que o metabolismo de frutanos na espécie é altamente regulado e capaz de tamponar variações ambientais marcantes, tendo em vista a similaridade das respostas observadas para as plantas cultivadas *in vitro*, em casa de vegetação ou em campo.

Durante o período de análise deste trabalho as plantas de *V. herbacea* não foram expostas ao déficit hídrico no campo, no entanto a transição para a dormência ou para a brotação foram marcadas por parâmetros fisiológicos já descritos na literatura, sugerindo que outros fatores ambientais ou endógenos podem ser os responsáveis por regular a sinalização nas fases de transição. Os resultados indicam que a temperatura pode atuar como sinalizadora na regulação da transição entre as diferentes fases, contudo, outros fatores como a radiação e a umidade relativa do ar devem ser considerados em trabalhos futuros.

As diferenças entre os segmentos proximais e distais dos rizóforos quanto à atividade das enzimas e expressão dos genes do metabolismo de frutanos apresentou o mesmo padrão anteriormente relatado na literatura, no entanto os demais fatores analisados como o status hídrico das plantas e os níveis endógenos dos reguladores de crescimento não foram diferentes entre os segmentos.

O início da brotação foi um período marcado por baixos níveis endógenos de ABA, atividade elevada de hidrólise dos frutanos pela 1-FEH e emissão de novos ramos aéreos. No decorrer da brotação, com ramos aéreos ainda jovens, os níveis de AIA nos rizóforos e parte aérea foram mais elevados, deixando clara a atuação deste regulador no estabelecimento e desenvolvimento da parte aérea. Ao final da brotação, com a parte aérea bem estabelecida e com

o aumento da concentração de açúcares redutores, a enzima de síntese (1-SST) passou a ser mais ativa, atingindo o pico de atividade no primeiro estágio vegetativo analisado (V1). Seguiu-se declínio da atividade de síntese de frutanos ao final do período vegetativo (V2), o que é compatível com o observado na literatura. A diminuição da atividade desta enzima acompanhou o aumento das concentrações de sacarose em V2 e o aumento dos níveis endógenos de ABA, sinalizando a proximidade da transição para um novo período de dormência. Com a diminuição dos níveis de ABA em D, a enzima 1-FEH foi ativada novamente, mas em níveis inferiores aos observados durante a brotação, possivelmente mobilizando frutanos durante a dormência para fornecimento de energia, crioproteção ou osmorregulação. Conforme esquematizado abaixo (Figura 19):

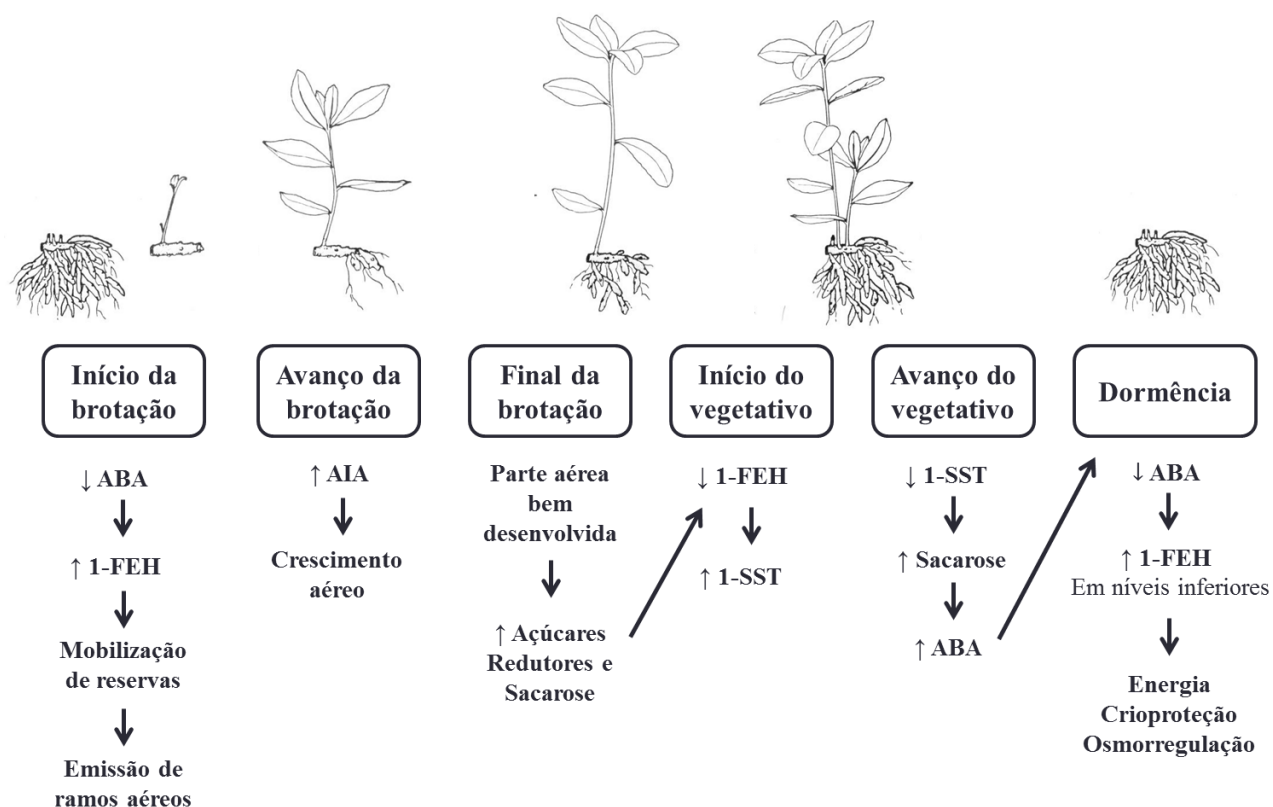


Figura 19. Diagrama das principais fases fenológicas de *Vernonia herbaceae* e alterações fisiológicas e bioquímicas analisadas.

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.** 2007. Mobilização de frutanos durante a brotação em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby: purificação e expressão gênica de frutano-exohidrolases. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- 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.
- Barbosa, E. G.; Pivello, V. R.; Meirelles, S. T.** 2008. Allelopathic evidence in *Brachiaria decubens* and its potential to invade the Brazilian Cerrados. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51, 4: 825-831.
- Barreto, R.; Nieto-Sotelo, J.; Cassab, G. I.** 2010. Influence of plant growth regulators and water stress on ramet induction, rosette engrossment, and fructan accumulation in *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103: 93-101.
- Bertrand, A., Robitaille, G., Castonguay, Y., Nadeau, P. & Boutin, R.** 1997. Changes in ABA and gene expression in cold-acclimated sugar maple. *Tree Physiology*, 17: 31-37.
- 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.

- Bravo, León A.; Zúñiga, Gustavo E.; Alberdi, Miren; Corcuera, Luis J.** 1998. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. *Physiologia Plantarum*, 103: 17-23.
- 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. & Ribeiro, R. C. L. F.** 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, Asega, F.A. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2007. Fructans in Asteraceae from Brazilian cerrado. *In* Recent advances in fructooligosaccharides research (S. Norio, B. Nouredine & O. Shuichi, eds.). Research Signpost, Kerala.
- 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.
- Chen, H.H., Li, P.L. & Brenner, M. L.** 1983. Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiology*, 71:362-365.
- Chope, G. A., Terry, L. A., & White, P. J.** 2006. Effect of controlled atmosphere storage on abscisic acid concentration and other biochemical attributes of onion bulbs. *Postharvest Biology and Technology*, 39: 233–242.
- 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.

- Cruz, A.C.R., Libardi, P. L., Carvalho, L. A., Rocha, G. C.** 2005. Balanço de água no volume de solo explorado pelo sistema radicular de uma planta de citrus. *Revista brasileira de ciência do solo*, 29:1-10.
- 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.
- Darbyshire, B. & Henry, R.J.** 1978. The distribution of fructan in onions. *New Phytologist*, 81: 29-34.
- 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.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.C.** 1999. Fructan variation in the rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, as influenced by temperature. *Revista Brasileira de Botânica*, 22: 267-273.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Itaya, N.M., Carvalho, M.A.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Dietrich, S.M.C.** 2004. Fructans and water suppression on intact and fragmented rhizophores of *Vernonia herbacea*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47: 363-373.
- Dierking, R. M. & Kallenbach, R. L.** 2012. Mediterranean and Continental Tall Fescue: II. Effects of cold, nonfreezing temperatures on leaf extension, proline, fructan and abscisic acid. *Crop Science Society of America*, 52: 460-469.
- Edelman, J. & Jefford, T.G.** 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist*, 67: 517-531.
- Eiten, G.** 1972. The cerrado vegetation of Brazil. *Botanical Review*, 38: 201-341.

- Farrar J. F.** 1996. Sinks – integral parts of a whole plant. *Journal of Experimental Botany*, 47: 1273–1279.
- Garcia, P.M.A.** 2009. Variações no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) em resposta ao déficit hídrico e sua relação com a tolerância à seca. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- 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.
- Gusta, L. V.; Thischuk, R.; Weiser, C. J.** 2005. Plant cold acclimation: The role of abscisic acid. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24: 308-318.
- Hendry, G.A.F. & Wallace, R.K.** 1993. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: Suzuki, M. & Chatterton J.N, (eds). *Science and Technology of Fructans*. CRC Press, Boca Raton, p. 119-139.
- Hincha, D.K., Livingston III, D.P., Premakumar, R., Zuther, E., Obel, N., Cacela, C. & Heyer, A.G.** 2007. Fructans from oat and rye: Composition and effects on membrane stability during drying. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768: 1611-1619.
- 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., Vaz, A.P.A., Kerbaudy, 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.

- Jermyn, M.A.** 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature*, 177: 38-39.
- 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.
- Khalaj, M. A.; Amiri, M.; Azimi, M. H.** 2013. Allelopathy: physiological and sustainable agriculture important aspects. *Agronomy and Plant Production*, 4, 5: 950-962.
- Krasensky, J. & Jonak, C.** 2012. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63, 4: 1593-1608.
- Laffite, H. R., Yongsheng, G., Yan, S., Li, Z-K.** 2007. Whole plant responses, key process, and adaptation to drought stress: the case of rice. *Journal of experimental botany* 58, 2: 169-175.
- 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.
- Ludwig-Müller, J., Schuller, A.** 2008. What can we learn from clubroots: alterations in host roots and hormone homeostasis caused by *Plasmodiophora brassicae*. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 291-302
- 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.

- 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.
- 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.
- Michiels, A., Van Laere, A., Van Den Ende, W. & Tucker, M.** (2004). Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. Journal of experimental Botany, 55, 401: 1325-1333.
- 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-Bertrand, A., Ernstsén, A., Lindgård, B., Koshioka, M., Le Saos, J., Boucaud, J., Prud'homme, M.P. & Junttila, O.** 2001. Endogenous gibberellins in *Lolium perenne* and influence of defoliation on their contents in elongating leaf bases and in leaf sheaths. Physiologia Plantarum, 111:225-231.
- Nagaraj, V. J.; Altenbach, D.; Galati, V.; Luscher, M.; Meyer, A. D.; Boller, T.; Wiemken, A.** 2004. Distinct regulation of sucrose: sucrose-1-fructosyltransferase (1-SST) and

sucrose:fructan-6-fructosyltransferase (6-SFT), the key enzymes of fructan synthesis in barley leaves: 1-SST as the pacemaker. *New Phytologist*, 161: 735-748.

Oliveira, V. F. 2012. Interação entre a atmosfera enriquecida em CO₂ e o déficit hídrico: efeitos no metabolismo de frutanos em duas espécies de Asteraceae do Cerrado. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

Oliveira, V. F.; Silva, E. A.; Zaidan, L. B. P.; Carvalho, M. A. M. 2013. Effects of elevated CO₂ concentration and water deficit on fructan metabolism in *Viguiera discolor* Baker. *Plant Biology*, 15: 471-482.

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.

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 Frustan-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.** 1996. 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, p. 97-113.
- 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.
- Ritsema, T. & Smeekens, S.C.M.** 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 223-230.
- Roberfroid, M.B.** 1993. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 33: 103-148.
- Roberfroid, M.B.** 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87: S139–S143.
- Rodrigues, R. S.** 2013. A tribo Paniceae s.l. (Poaceae: Panicoideae) na Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, SP, Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Rutherford, P.P. & Deacon, A.C.** 1974. Seasonal variation in dandelion roots of fructosan composition, metabolism and response to treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Annals of Botany*, 38: 251-260.
- Silva, F. G.; Cangussu, L. M. B.; Paula, S. L. A.; Melo, G. A.; Silva, E. A.** 2013. Seasonal changes in fructan accumulation in the underground organs of *Gomphrena marginata*

- Seub. (Amaranthaceae) under rock-field conditions. Theoretical and Experimental Plant Physiology, 25, 1: 46-55.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. Journal of Biological Chemistry, 160: 61-63.
- Taper, H. Lemort, C. & Roberfroid, M.B.** 1999. Inhibition of dietary inulin and oligofructose on the growth of transplantable mouse tumor. Anticancer Research, 18: 4123-4126.
- Tertuliano, M.F. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1993. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. New Phytologist, 123: 741-749.
- Trevisan, F.** 2014. Cultivo *in vitro* de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby e a atividade e expressão de enzimas do metabolismo de frutanos. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- 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. & El-ESawe, S. K.** 2014. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: a dual function in abiotic and biotic stress responses? Environmental and Experimental Botany. Published version: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.017>.
- 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. 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., 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.
- 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.
- Volaire, F.; Thomas, H.; Bertagne, N.; Burgeois, E.; Gautier, M. F.; Lelièvre, F.** 1998. Survival and recovery of perennial forage grasses under prolonged Mediterranean drought. II. Water status, solute accumulation, abscisic acid concentration and accumulation of dehydrin transcripts in bases of immature leaves. *New Phytologist Trust*, 140: 451-460.
- Vuono, Y. S.; Batista, E. A.; Funari, F. L.** 1986. Balanço hídrico na área da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, São Paulo – Brasil. *Hoehnea*, 13: 73-85.
- 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.
- Yamasaki, H. & Matsumoto, K.** 1993. Production of fructo-oligosaccharides-rich fructose syrup. *In: A. Fuchs (ed.). Inulin and Inulin-Containing Crops*, Elsevier, Amsterdam, pp. 355-357.
- Suárez-González, E. M.; López, M. G.; Délano-Frier, J. P.; Gómez-Leyva, J. F.** 2014. Expression of the 1-SST and 1-FFT genes and consequent fructan accumulation in *Agave*

tequilana and *A. inaequidens* is differentially induced by diverse (a)biotic-stress related elicitors. *Journal of Plant Physiology*, 171: 359-372.

- Van den Ende, W., Michiels, A., Van Wouterghem, D., Clerens, S., Roover, J. & Van Laere, A.** 2001. Defoliation induces 1-FEH II (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEH IIa e 1-FEH IIb). Mass fingerprint of the 1-FEH II enzymes. *Plant Physiology* 126: 1186-1195.
- Edelman, J. & Jefford, T. G.** 1964 The mechanism of fructose polymers in plants. 4. b-fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. *Biochemical Journal* 93: 148-161.
- Claessens, G., Van Laere, A. & De Proft, M.** 1990. Purification and properties of an inulase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology* 136: 35-39.
- Bonnett, G. D. & Simpson, R. J.** 1993. Fructan- hydrolizing activities from *Lolium ridigum* Gaudin. *New Phytologist* 123: 443-451.
- Van Riet, L., Nagaraj, V., Van den Ende, W., Clerens, S., Wiemken, A. & Van Laere, A.** 2006. Purification, cloning and functional characterization of an fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 57: 213-223.
- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Van Riet, L., Van Laere, A., Yoshida, M. & Kawakami, A.** 2003. Fructan 1-exohydrolases. b-(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiology* 131: 621-631.
- Javid, M. G.; Sorooshzadeh, A.; Sanavy, S. A. M. M.; Allahdadi, I.; Moradi, F.** 2011. Effects of the exogenous application of auxin and cytokinin on carbohydrate accumulation in grains of rice under salt stress. *Plant Growth Regulation*, 65: 305-313.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1

Tabela 3. Coeficiente de correlação entre temperatura máxima e mínima, precipitação média e acumulada, teor de umidade do solo, teor de água das plantas e pontencial hídrico dos rizóforos e parâmetros edafo-climáticos, fisiológicos e bioquímicos de plantas de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (SP), em diferentes fases de desenvolvimento. (* $p < 0,05$).

		T máx	T mín	P acumulada	P média	U% Solo	Teor de água			Potencial hídrico	
							PA	D	P	D	P
U% Solo				0.77	0.78						
Teor de água	PA	0.78*	0.83*							-0.93*	
	D	0.68									
	P		-0.65				-0.90*				
Potencial hídrico	D										
	P										
[ABA]	PA	0.76*	0.83*				0.87*				
	D										
	P										
[AIA]	PA	0.71*	0.74*				0.92*		-0.72*		
	D					0.62					
	P					0.60					
1-SST	D			0.76	0.87	0.67					
	P			0.79	0.85						
1-FFT	D	-0.63	-0.67								
	P					-0.62					
1-FEH	D										
	P				-0.65						
Fruto-oligossacarídeos	D					0.65*					
	P					0.60					
Fruto-polissacarídeos	D										
	P						0.65		-0.64		
Açúcar redutor	D							0.88*			
	P										0.60

Temperatura máxima (T máx) e mínima (T mín); Precipitação média (P média) e acumulada (P acumulada); Umidade do solo (U% solo); Concentração de ABA ([ABA]) e de AIA ([AIA]); Atividades das enzimas Sacarose: Sacarose 1-frutotransferase (1-SST), Frutano: Frutano 1-frutotransferase (1-FFT) e Frutano 1-exohidrolase (1-FEH); Parte aérea (PA); Seguimentos distais (D) e proximais (P) dos rizóforos.

Tabela 4. Coeficiente de correlação entre teor de ABA e AIA e atividades das enzimas 1-SST, 1-FFT e 1-FEH e parâmetros fisiológicos e bioquímicos de plantas de *Vernonia herbacea* coletadas em área de Cerrado, na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (SP), em diferentes fases de desenvolvimento. (*p<0,05).

		[ABA]			[AIA]			1-FFT		1-SST		1-FEH	
		PA	D	P	PA	D	P	D	P	D	P	D	P
[ABA]	PA												
	D												
	P												
[AIA]	PA	0.64											
	D												
	P												
1-SST	D									0.71*			
	P												
1-FFT	D												
	P						-0.68						
1-FEH	D									-0.65			
	P									-0.90*			
Fruto-oligossacarídeos	D				0.73*								
	P			0.62								-0.79*	
Fruto-polissacarídeos	D												
	P				0.70*				0.60				
Açúcar redutor	D											0.61	
	P												

Concentração de ABA ([ABA]) e de AIA ([AIA]); Atividades das enzimas Sacarose:Sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST), Frutano:Frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT) e Frutano 1-exohidrolase (1-FEH); Parte aérea (PA); Segueimentos distais (D) e proximais (P) dos rizóforos.

8.2. ANEXO 2

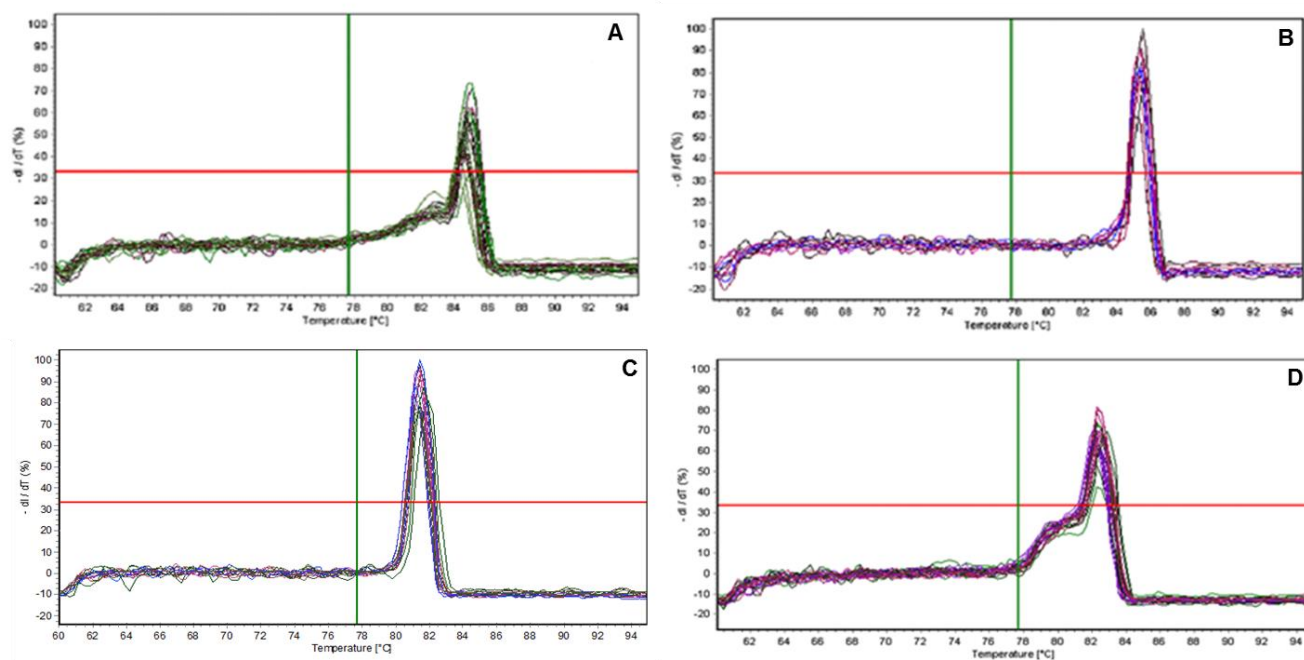


Figura 19. Curvas de desnaturação dos fragmentos amplificados, utilizando os pares de *primers* selecionados para os genes 1-FEH (A), 1-SST (B), 18S (C) e EF (D).