

EMANUELA DE OLIVEIRA JOAQUIM

**Metabolismo e localização de frutanos em
Gomphrena marginata Seub. (Amaranthaceae),
endêmica de Campos Rupestres**

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

SÃO PAULO

2018

EMANUELA DE OLIVEIRA JOAQUIM

**Metabolismo e localização de frutanos em
Gomphrena marginata Seub. (Amaranthaceae),
endêmica de Campos Rupestres**

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

ORIENTADORA: DRA. MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

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

Joaquim, Emanuela de Oliveira
J62m Metabolismo e localização de frutanos em *Gomphrena marginata* Seub.
(Amaranthaceae), endêmica de Campos Rupestres / Emanuela de Oliveira Joaquim --
São Paulo, 2018.
90p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2018.
Bibliografia.

1. Anatomia Kranz. 2. Levano. 3. Órgãos subterrâneos de reserva. I. Título.

CDU: 581.4

Aos meus pais Maria Graciete e Manuel

DEDICO

O fim duma viagem é apenas o começo doutra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na Primavera o que se vira no Verão, ver de dia o que se viu de noite, com sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava. É preciso voltar aos passos que foram dados, para os repetir, e para traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomeçar a viagem. Sempre.

José Saramago

Agradecimentos

Ao Instituto de Botânica e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento ao projeto (2016/04919-7).

Ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica pela infra-estrutura oferecida para realização deste trabalho.

À Dra. Maria Angela Machado de Carvalho, pela orientação, confiança e amizade. Por acreditar em mim e por sempre querer o meu melhor. Muito obrigada por todos esses bons anos de convivência, por todo apoio e incentivo.

À Dra. Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro, pela colaboração no trabalho, por todo seu entusiasmo pela ciência e por todo carinho.

À Dra. Adriana Hissae Hayashi, pela colaboração no estudo anatômico, pela disposição em me ensinar, por toda sua dedicação e pelos momentos de convivência.

À Dra Luce Maria Brandão, por toda ajuda na interpretação dos espectros de RMN e por todo carinho e animação, que fazia com que meus dias fossem mais leves e divertidos.

Ao Dr. João Henrique Ghilardi Lago (UFABC) e Dr. Norio Shiomi (Universidade Rakuno Gakuen, Japão), pela realização das análises de RMN e ajuda na interpretação dos espectros.

Ao Dr. Geraldo Aclécio Melo (UNIMONTES), pela disposição e gentileza em nos levar ao campo, ajudar nas coletas e por disponibilizar o laboratório para a preparação inicial do material vegetal. Agradeço também aos seus alunos Ana Flávia e Sandro, que ajudaram na última coleta realizada.

A todos os pesquisadores e aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, Ana Alice, Pedro, Mary e Amanda.

Ao Dr. Marcos S. Buckeridge (Instituto de Biociências-USP) por disponibilizar o uso do HPAEC-PAD enquanto o nosso equipamento estava em conserto, e pela ajuda da técnica Eglee nas análises.

À aluna de iniciação científica Karina Lima Delmondes, com quem eu aprendi a ensinar. Muito obrigada pela ajuda no laboratório, nas coletas e pela companhia nesses quase três anos durante o meu doutorado. Espero que tenha conseguido te inspirar para a ciência e desejo que tenha muito sucesso, seja qual for a área que escolher seguir.

Ao doutorando Ótávio Marques pela disposição em fotografar as folhas diafanizadas.

Ao amigo e irmão científico Athos Poli Rigui, pelos anos juntos na mesma bancada, na felicidade e na tristeza das análises que davam certo ou errado. Por ser meu braço direito nesses quatro anos de doutorado e pela amizade, que quero levar pra sempre na minha vida.

Aos colegas de laboratório, Alessandra Harumi, Cynthia Murakami, Juliane Galdino, Ingrid Cristina, Letícia Longuini, Lucas Cardinelli, Simone Franco, Michele Silva e Rodrigo Sanches. Obrigada pelos bons momentos de convívio.

Aos amigos científicos Daiane Mignoni, Kássia Fardin, Juliana Zerlin, Rodrigo Cabral e Vanessa Fuentes. Presentes que a pós-graduação me trouxe e permanecem na minha vida, mesmo seguindo caminhos diferentes.

À minha família por acompanhar minha jornada e acreditar em mim. Por torcer sempre pelo meu melhor e por me amar seja qual for a decisão ou rumo que irei seguir.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências Bibliográficas	8
CAPÍTULO I	13
Chemical structure and localization of levan-type fructan from underground system of <i>Gomphrena marginata</i> (Amaranthaceae), an uncommon case among eudicots	13
ABSTRACT	14
RESUMO	14
1. Introduction	15
2. Material and Methods.....	16
2.1. Plant material	16
2.2.Methods	16
3. Results	18
4. Discussion	23
5. References	26
CAPÍTULO II.....	32
<i>Gomphrena marginata</i> Seub.: uma Amaranthaceae C4, acumuladora de frutanos e endêmica de campos rupestres.....	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1. Introdução.....	35
2. Objetivos	40
3. Material e Métodos.....	42
3.1 Material vegetal	42
3.2 Condições climáticas nos dois ciclos fenológicos de coleta	43
3.3 Métodos	46
4. Resultados	51
4.1 Fenologia	51
4.2. Status hídrico das plantas e do solo Folhas.....	51
4.3. Folhas.....	54
4.4 Sistema subterrâneo	59
5. Discussão	68
6. Referências Bibliográficas	79
Considerações finais.....	89

RESUMO

Campos rupestres são ecossistemas de topo de montanha que apresentam afloramentos rochosos, solos ácidos e pobres em nutrientes e que estão frequentemente sujeitos a estresses ambientais. *Gomphrena marginata* (Amaranthaceae) é uma espécie endêmica dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço (MG) que se encontra presente na lista de espécies raras do Brasil. Muitas espécies do gênero *Gomphrena* possuem mecanismo fotossintético C4 com sistemas subterrâneos espessados que acumulam carboidratos, como por exemplo, os frutanos. Uma análise preliminar sugeriu a presença de frutano do tipo levano no sistema subterrâneo de *G. marginata*, ocorrência atípica em eudicotiledôneas, com apenas uma citação em *Gomphrena macrocephala*, espécie herbácea do Cerrado. Os objetivos do presente trabalho foram analisar em *G. marginata* o metabolismo de frutanos em diferentes fases fenológicas da planta, caracterizar sua estrutura química e sua localização nos tecidos, bem como caracterizar o seu metabolismo fotossintético. As plantas foram coletadas na Serra de Itacambira (MG) nas fases de dormência (seca), brotação (início das chuvas) e crescimento vegetativo (fim das chuvas), em dois ciclos fenológicos. A biossíntese e a degradação dos frutanos, o conteúdo dos carboidratos solúveis, o potencial osmótico e o teor de água foram analisados em diferentes segmentos (proximal, mediano e distal) do sistema subterrâneo. As quantificações de carboidratos foram realizadas por métodos colorimétricos e sua identificação por cromatografia (HPAEC/PAD) e ressonância magnética nuclear. Para a análise anatômica, amostras foram fixadas em FAA 70, incluídas em historesina e coradas com azul de toluidina. Para identificação dos cristais de frutanos, amostras dos sistemas subterrâneos foram seccionadas à mão livre e visualizadas sob luz polarizada. Foram realizados também testes histoquímicos e análise por microscopia eletrônica de varredura. No ciclo fenológico 1, houve poucas variações nos conteúdos de açúcares e nas atividades enzimáticas. A enzima 1-SST (sacarose:sacarose 1- frutossiltransferase), que inicia a síntese de frutanos, apresentou atividade somente na fase vegetativa. A 1-FFT (frutano:frutano 1- frutossiltransferase), enzima que promove tanto o alongamento como a diminuição das moléculas, apresentou maior atividade na fase de dormência no segmento proximal, e a enzima de hidrólise (FEH- frutano exohidrolase) apresentou maior atividade na fase de brotação, apesar de não apresentar diferença estatística significativa entre as fases. No ciclo 2, o conteúdo mais baixo de frutanos ocorreu na região proximal do sistema subterrâneo, na fase de brotação, que também apresentou maiores teores de açúcares redutores e potencial osmótico menos negativo. A FEH apresentou maior atividade no segmento proximal nas fases de brotação e de crescimento vegetativo. Os segmentos mediano e distal não apresentaram alterações expressivas no teor de frutose total e nas atividades enzimáticas entre as fases, indicando a preferência por mobilizar frutanos estocados nos segmentos mais próximos à parte aérea. Nas análises em HPAEC–PAD foram identificados glicose, frutose, sacarose, 1-cestose, 6-cestose, nistose e frutanos com grau de polimerização de até aproximadamente 50 unidades de frutose. Dados das análises bidimensionais de RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC e HMBC mostraram que o frutano predominante é o levano, uma molécula linear com ligações β - 2,6, baseada no trissacarídeo 6-cestose. Análises estruturais demonstraram que o sistema subterrâneo é composto majoritariamente de uma raiz tuberosa com potencial gemífero, no qual o cilindro vascular apresenta um crescimento secundário não usual. Cristais de frutanos foram visualizados principalmente no córtex, no cilindro vascular e no interior dos elementos de vaso. Folhas de *G. marginata* são anfiestomáticas, apresentam venações bem densas, tricomas tectores em ambas as faces e em grande abundância na base foliar. Apresentam anatomia Kranz que, juntamente com a razão isotópica de -14‰, confirma o metabolismo fotossintético C4 nesta espécie. A concentração elevada de frutanos e a presença do metabolismo fotossintético C4, evidenciam a adaptação desta espécie a ambientes sujeitos aos estresses ambientais e à sazonalidade climática ocorrentes nos campos rupestres.

Palavras-chave: Anatomia, anatomia Kranz, C4, levano, órgãos subterrâneos de reserva.

ABSTRACT

Campos rupestres are mountain top ecosystems with rock outcrops, acid and nutritionally poor soils and often subjected to abiotic stresses. *Gomphrena marginata* (Amaranthaceae) is endemic of *campos rupestres* of the Espinhaço Mountain Range (MG) and listed as a rare species in Brazil. Several species of the *Gomphrena* genus express the C4 photosynthetic pathway and present thickened underground systems that store considerable amounts of carbohydrates generally of the fructan type. A preliminary analysis suggested the presence of levan-type fructans in the underground systems of *G. marginata*, atypical in eudicotyledonous, with only one report for *Gomphrena macrocephala*, herbaceous species from Cerrado. The aim of this work was to analyze in plants of *G. marginata*, fructan metabolism in different phenological phases, characterize the fructan chemical structure and the localization in the tissues, and characterize the photosynthetic metabolism. Plants were collected in the field at Serra de Itacambira (MG) during the phenological phases of dormancy (dry season), sprouting (beginning of rain season) and vegetative growth (end of rain season) in two phenological cycles. The activities of fructan biosynthetic and hydrolytic enzymes, the soluble sugars, osmotic potential and the water content were analyzed in different segments (proximal, median and distal) of the underground system. Carbohydrates were quantified colorimetrically and identified by HPAEC/PAD and nuclear magnetic resonance. For anatomical analyses samples were fixed in FAA 70, included in historesin and stained in toluidine blue O. For identification of fructan crystals, samples were sectioned by freehand cross-sections, and visualized under polarized light. Histochemical analyses and scanning electron microscopy were also performed. The first phenological cycle presented few variations in sugar contents and enzymatic activities. 1-SST (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase), the fructosyltransferase which initiates fructan synthesis, presented activity only in the vegetative phase. 1-FFT (fructan:fructan 1-fructosyltransferase), responsible to promote the elongation and/or reduction of the chain length, showed the highest activity at dormancy in the proximal segment and the FEH (fructan exohydrolase), showed higher activity in the sprouting phase, although no significant differences were found in the activities between phenological phases. In the second cycle, the lowest content of fructans was detected in the proximal segment at sprouting, when the highest contents of reducing sugars and highest osmotic potential values were also observed. FEH presented higher activity in the proximal segment at sprouting and vegetative phases. The median and distal segments did not present significant differences in the contents of total fructose and in enzymatic activities between phenological phases, indicating the preference to mobilize fructans accumulated in the proximal segment, near the aerial parts of the plant. HPAEC–PAD analyses revealed the presence of glucose, fructose, sucrose, 1-kestose, 6-kestose, nystose and fructans with degree of polymerization up to approximately 50 fructose units. RMN of two-dimensional $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC and HMBC analyses showed the predominance of levan-type fructans, a linear molecule with β - 2,6 linkages, based on 6-kestose. Structural analyses of the underground organ revealed mainly a tuberous root, in which the vascular cylinder presents an unusual secondary growth pattern. Fructan crystals were visualized mostly in the cortex and vascular cylinder, and inside vessel elements. Leaves of *G. marginata* are amphistomatic, with high vein density, and with tector trichomes on both surfaces and in considerable amounts in the leaf bases. The leaves show Kranz anatomy, which together with the isotopic ratio of -14‰, confirm the C4 photosynthetic metabolism in this species. The high concentration of fructan along with C4 metabolism indicate that this species is well adapted to environments exposed to the abiotic stresses and climatic seasonality occurring in *campos rupestres*.

Key words: Anatomy, C4, Kranz anatomy, levan, storage underground organ.

INTRODUÇÃO GERAL

Campos rupestres são caracterizados como mosaicos de vegetação sobre afloramentos rochosos, ocorrentes em topo de montanha que se concentram principalmente na Cadeia do Espinhaço, nos estados de Minas Gerais e Bahia (Figura 1), mas que também ocorrem em áreas isoladas nos estados de Pernambuco, Goiás, Paraíba e Mato Grosso (Silveira et al., 2016). Essas formações montanhosas ocorrem em altitudes entre 900 e 2033 m e possuem clima bem definido, com invernos secos e verões chuvosos, com precipitação média de 1461 ± 308 mm por ano (Silveira et al., 2016). Nestas regiões os solos são ácidos, pobres em nutrientes e com baixa fertilidade. Apresentam baixos níveis de fósforo, potássio, cálcio e magnésio e níveis elevados de alumínio. A profundidade do solo é variável, podendo ser bem rasos em áreas íngremes e mais profundos em áreas mais estáveis, e os afloramentos rochosos ocorrem por toda parte (Schaefer et al., 2016).

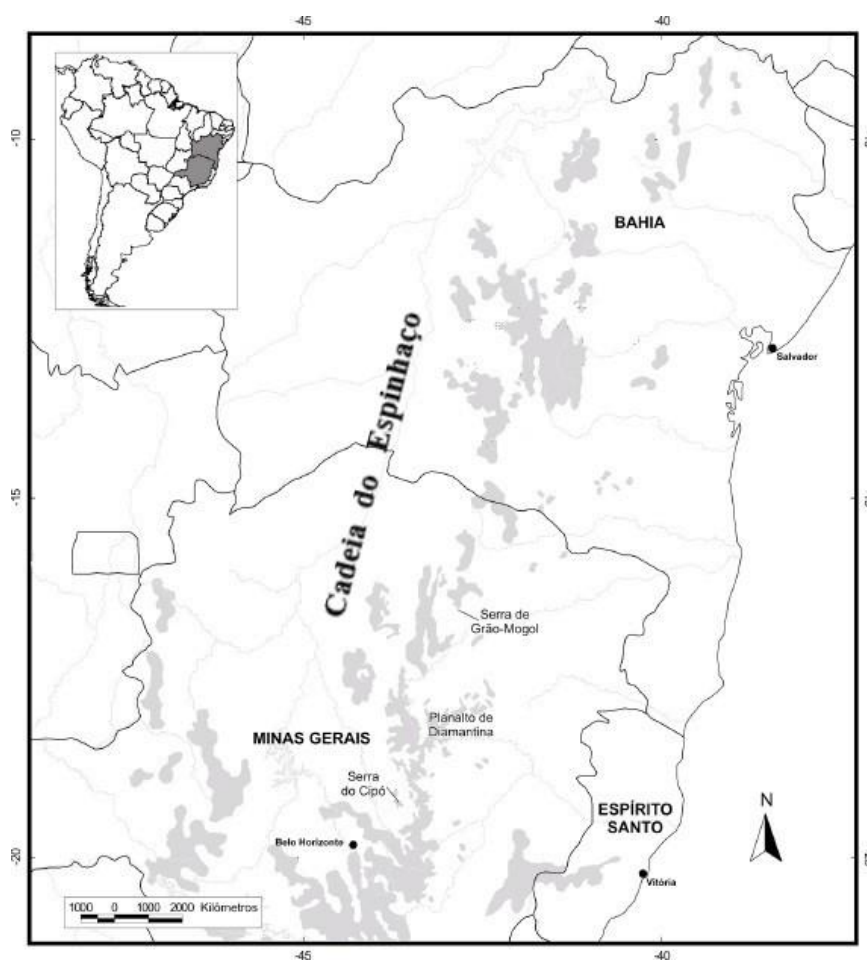


Figura 1. Mapa da Cadeia do Espinhaço, abrangendo os estados de Minas Gerais e Bahia. Adaptado de Azevedo & Van den Berg, 2007.

Como ecossistema, os campos rupestres não são exclusivos do Brasil. Habitats análogos, com um regime climático semelhante, solos pobres em nutrientes e padrões de distúrbio semelhantes também ocorrem em outros continentes do hemisfério sul,

particularmente na África do sul e na Austrália tropical (Mucina, 2018). Essas regiões são classificadas como OCBILs (do inglês old, climatically buffered, infertile landscapes), teoria que visa desenvolver uma série de hipóteses que explicam a evolução e a ecologia e as melhores estratégias para conservação dessas áreas (Hopper, 2009). Os campos rupestres ocorrem em somente 0,78% da superfície continental do Brasil e possuem 14,7% da diversidade da flora vascular brasileira. Em comparação com as áreas reconhecidas como OCBILs, Silveira et. al (2016) estimaram que os campos rupestres ocupam a terceira posição em termos de riqueza da flora, porém esta estimativa é subestimada pelo número crescente de novas espécies descritas nas áreas de campos rupestres. Veloso et al. (1991) já consideravam os campos rupestres como “refúgios vegetacionais” ou “vegetação relíquia” por se tratarem de vegetações isoladas em um contexto completamente distinto da flora dominante nas regiões onde estes campos se localizam. Atualmente, a porção sul da Cadeia do Espinhaço é reconhecida como Reserva da Biosfera pela UNESCO, pela singularidade em termos de biodiversidade e endemismo (Fernandes, 2016). O norte da cadeia do espinhaço, onde estão localizadas as regiões de Grão-Mogol e Diamantina, assim como outras regiões isoladas com vegetação rupestre, estão altamente em perigo, e podem, até o final do século, perder mais de 95% da sua área atual por intervenções antrópicas, como mineração, pecuária, turismo desenfreado e o avanço de espécies invasoras (Fernandes et al., 2014).

Para sobreviverem às condições dos campos rupestres, as espécies que habitam estes ambientes possuem diversas adaptações, principalmente para superar os períodos de seca e para recuperar a parte aérea após passagem do fogo, de ocorrência frequente nestas áreas (Figueira et al., 2016). Uma das adaptações é a presença de sistemas subterrâneos espessados que por apresentarem natureza complexa, uma análise morfológica apenas não é suficiente para classificá-los, sendo o estudo anatômico fundamental para avaliar a origem destes órgãos (Vilhalva & Appezzato-da-Glória, 2006). O sistema subterrâneo de *Pffafia jubata*, uma Amaranthaceae do Cerrado, por exemplo, apresenta uma região caulinar de tamanho variável e sua maior parte constituída de raiz, com predominância de tecido parenquimático (Menezes et al., 1969). Além de sua importância reprodutiva, pela presença de gemas, os sistemas subterrâneos têm um papel importante no acúmulo de reservas, principalmente de carboidratos que são armazenados em grandes quantidades nesses órgãos e fundamentais para a rebrota e o crescimento de ramos aéreos, bem como para a sobrevivência das plantas nestes ambientes (Joaquim et al., 2014).

Entre os carboidratos de reserva, encontram-se os frutanos, que são polímeros de frutose originados da sacarose, acumulados nos vacúolos e solúveis em água, ocorrentes em aproximadamente 15% das angiospermas (Hendry & Wallace, 1993), (Edelman & Jefford,

1968). Cinco tipos estruturais de frutanos podem ser distinguidos: 1) inulina, molécula linear com ligações do tipo β (2,1) entre as unidades de frutose e baseada no trissacarídeo 1-cestose (1-cestotriose); 2) levano ou fleano, molécula também linear, com ligações do tipo β (2,6) e baseada no trissacarídeo 6-cestose (6-cestotriose); 3) graminanos, moléculas ramificadas contendo ligações mistas β (2,6) e β (2,1); 4) frutanos baseados na neocestose (6-G-cestotriose) ou neosérie da inulina, com ligações β (2,1) entre as unidades de frutose; 5) frutanos baseados na neocestose (6-G-cestotriose) ou neosérie do levano, com ligações β (2,6) entre as unidades de frutose (Carvalho et al., 2007) (Figura 2).

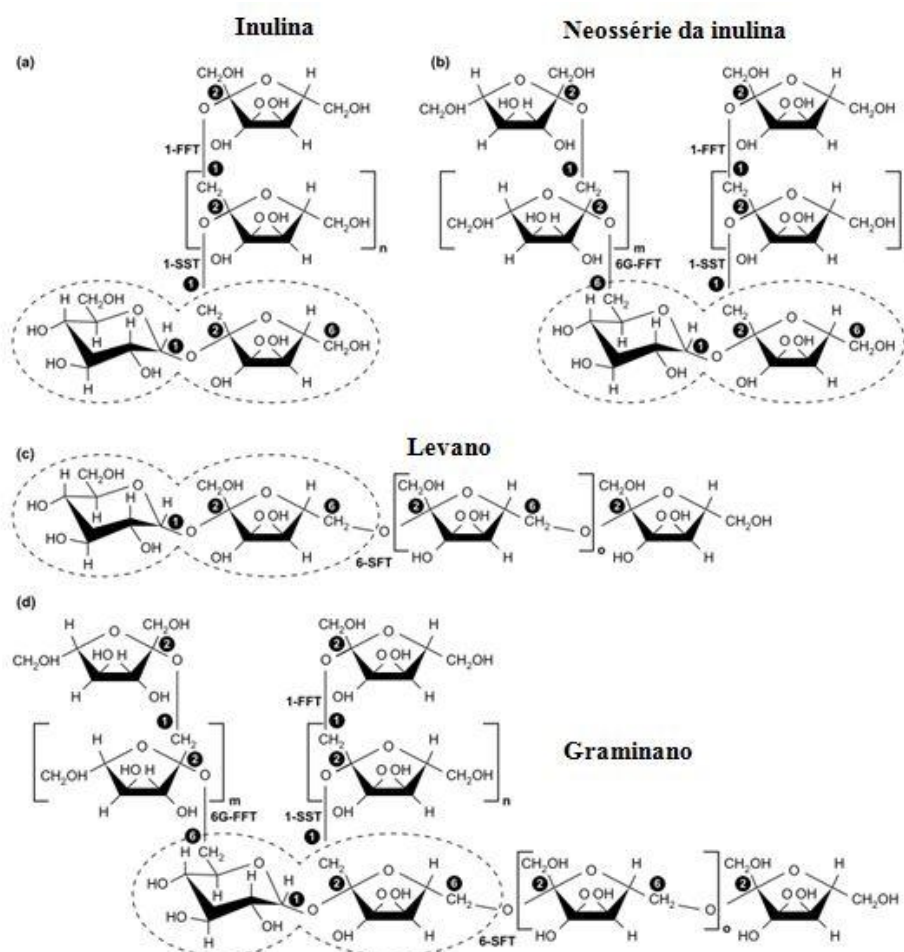


Figura 2. Exemplos de diferentes tipos de frutanos. **(a)** frutanos da série da inulina, com ligações β (2,1) **(b)** frutanos da neossérie da inulina, com glicose interna e ligações do tipo β (2,1) **(c)** frutanos do tipo levano, com ligações β (2,6) e **(d)** frutanos do tipo graminano, com ligações β (2,1) e β (2,6). Adaptado de Ritsema & Smeekens, 2003.

O modelo de biossíntese de frutanos foi descrito primeiramente por Edelman & Jefford (1968), para inulina de tubérculos de *Helianthus tuberosus* (Asteraceae). De acordo com este modelo, os frutanos são sintetizados por frutossiltransferases, iniciando-se pela ação irreversível da enzima sacarose:sacarose 1- frutossiltransferase (1-SST), que catalisa a síntese

do trissacarídeo 1-cestose, e alongando-se pela ação da frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT), que também pode catalisar a redução do comprimento da cadeia, pois é uma enzima de ação reversível (Edelman & Jefford, 1968). Para outros tipos de frutanos, com outras ligações glicosídicas, a síntese ocorre pela sacarose:frutano 6-frutossiltransferase (6-SFT) para formar 6-cestose ou bifurcose, e alongar as cadeias de ligações β 2,6 (Wei & Chatterton, 2001). Para a formação das neoséries, a enzima envolvida é a frutano:frutano 6G-frutossiltransferase (6G-FFT) (Henry & Darbyshire, 1980). A enzima de hidrólise, frutano 1-exohidrolase (1-FEH), quebra as ligações β (2,1), e a frutano 6-exohidrolase (6-FEH), as ligações β (2,6) (Edelman & Jefford, 1968; Yamamoto & Mino 1985). Além da função de reserva, muitos estudos demonstram o papel dos frutanos como osmorreguladores (Parvanova et al., 2004; Pilon-Smits et al., 1995; Garcia et al., 2011; Oliveira et al., 2016) e protetores de membrana (Vereyken et al., 2003).

Os frutanos também podem ser visualizados sob luz polarizada na forma de cristais birrefringentes após mantido em álcool 70% (Johansen, 1940). Nas raízes tuberosas de *Gomphrena macrocephala* (Amaranthaceae) foi observada a presença de cristais de frutanos, predominantemente nas células parenquimáticas do xilema secundário e sua ocorrência também no interior dos elementos de vaso foi relatada pela primeira vez na literatura, levando ao questionamento quanto à sua localização exclusiva nos vacúolos (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993). Estudos anatômicos dos órgãos subterrâneos de asteráceas mostram que os cristais de inulina concentram-se em tecidos parenquimáticos, incluindo o parênquima dos tecidos vasculares (Joaquim et al., 2014; Vilhalva et al., 2011; Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993). Em raízes de *Campuloclinium chlorolepis* (Asteraceae) os frutanos foram visualizados em microscopia eletrônica de varredura (MEV) como estruturas globulares, de tamanhos e em quantidades diferentes, dependendo da sua localização, sendo maiores e em maior concentração no cilindro central, nos tecidos parenquimáticos. A localização dos cristais de frutanos nos tecidos vasculares parece consistente com a rápida resposta destas plantas a fatores abióticos, e com o papel dos frutanos na tolerância aos estresses de temperatura e seca (Vilhalva et al., 2011).

Na indústria alimentícia e farmacêutica os frutanos são utilizados como substituinte de gorduras, além de serem utilizados como adoçantes não calóricos, devido ao seu sabor doce. A inulina é classificada como alimento funcional, pois tem a capacidade de melhorar a composição, a atividade e a funcionalidade da microbiota do cólon e da mucosa intestinal (Barclay et al., 2010). Estudos realizados com ratos submetidos a uma dieta alimentar de frutanos da série dos levanos mostraram que estes compostos são benéficos para a prevenção de aterosclerose e hipercolesterolemia, reduzindo fatores de risco de doença arterial

coronariana (Belghith et al., 2012). Alguns fungos que sintetizam levanos de cadeias curtas (FOS) com glicose terminal ou interna à cadeia, apresentaram maior atividade prebiótica quando comparado aos FOS da série da inulina (Fialho et al., 2013).

A família *Amaranthaceae* é composta por 2360 espécies, podendo ser ervas, lianas, arbustos e subarbustos (Fank-de-Carvalho et al., 2012). A grande maioria das espécies da família ocorre em áreas quentes, com baixa humidade e precipitação (Townsend, 1993). No Brasil são encontradas 146 espécies, sendo 73 endêmicas. Entre as espécies que ocorrem no Brasil, pelo menos 22 são utilizadas na medicina popular, entre elas *Pfaffia glomerata* e *Hebanthe eriantha*, ambas conhecidas como ginseng brasileiro (Fank-de-Carvalho et al., 2012). O gênero *Gomphrena* é encontrado nas Américas, Austrália e região indo-malásia, com aproximadamente 120 espécies. Na Austrália, espécies de *Gomphrena* ocorrem nas zonas dos trópicos, ao norte, e nas regiões áridas do oeste, centro e nordeste (Palmer, 1998). No Brasil, a grande maioria das espécies de *Gomphrena* é encontrada em regiões de cerrado, campos rupestres e caatinga (Siqueira, 1991).

Muitas espécies de *Amaranthaceae* apresentam metabolismo fotossintético C4, principalmente no gênero *Gomphrena* (Sage et al., 2007), além de possuírem sistemas subterrâneos espessados, que acumulam frutanos (Vieira & Figueiredo, 1993; Joaquim et al., 2017; Caleffi et al., 2015). *Gomphrena macrocephala* (*Amaranthaceae*) foi a primeira espécie da sub-classe Caryophyllidae em que a presença de frutanos foi registrada, constituindo cerca de 40% da matéria seca de suas raízes tuberosas (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993). *Gomphrena macrocephala* também foi a primeira espécie de eudicotiledônea em que foi constatada a presença de frutanos da série dos levanos, por ressonância magnética nuclear (RMN), (Shiomi et al., 1996) que, em geral, são encontrados em gramíneas de regiões temperadas, como *Poa ampla* (Chatterton & Harrison, 1997) e *Dactylis glomerata* (Chatterton et al., 1993). *Gomphrena marginata* também apresenta um sistema subterrâneo espessado, no qual os frutanos constituem o principal carboidrato de reserva (Joaquim et al., 2018). Análises cromatográficas dos carboidratos solúveis de *Gomphrena marginata* sugeriram, por meio de uma co-eluição com os carboidratos de *G. macrocephala* e de *Helianthus tuberosus*, que o frutano presente nesta espécie é também do tipo levano (Joaquim et al., 2018).

Gomphrena marginata foi escolhida como objeto deste estudo, pois além da provável presença da série dos levanos, incomum em eudicotiledôneas, acumula quantidades apreciáveis de frutanos no período mais seco do ano (Silva et al., 2013). Além disso, *G. marginata* está presente na lista de espécies raras do Brasil, estando classificada como “em perigo” e sujeita à cinco situações de ameaça, considerando seus locais de ocorrência. A região onde essas plantas ocorrem sofre com intensa atividade mineradora, ecoturismo,

aumento na frequência de incêndios de origem antrópica, agropecuária e invasão de espécies exóticas, fatores que contribuem para o desaparecimento de espécies raras (Martinelli et al., 2014).e medidas de contenção e monitoramento são necessárias para manter a viabilidade da espécie na natureza. Espécies de distribuição restrita são mais suscetíveis à extinção, sendo importantes objetos de estudo (Giulietti et al., 2009). No caso de *G. marginata*, bem como de outras espécies nativas pouco estudadas, quanto maior o conhecimento sobre sua fisiologia e seus mecanismos de reprodução e adaptação, maiores serão as possibilidades de se estabelecer estratégias para a sua conservação. Desse modo, este trabalho teve como objetivos:

- caracterizar anatomicamente o sistema subterrâneo de *Gomphrena marginata* e localizar os frutanos nos seus tecidos, bem como identificar o tipo de frutano acumulado;
- analisar o metabolismo de frutanos e suas variações em plantas no seu ambiente natural, nas épocas de seca e de chuvas
- caracterizar o mecanismo fotossintético.

Referências

- Aparecido, L.M.T., Teodoro, G.S., Mosquera, G., Brum, M., Barros, F.V., Pompeu, P.V., Rodas, M., Lazo, P., Müller, C.S, Mulligan, M., Asbjornsen, H., Moore¹, G.W. & Oliveira, R.S.** 2017. Ecohydrological drivers of Neotropical vegetation in montane ecosystems. *Ecohydrology* Doi:10.1002/eco.1932
- Azevedo, C. O. & Van Den Berg, C.** 2007. Análise comparativa de áreas de campo rupestre da Cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais, Brasil) baseada em espécies de Orchidaceae. *Sitientibus série Ciências Biológicas*, 7: 199-210.
- Barclay, T., Ginic-Markovic, M., Cooper, P. & Petrovsky, N.** 2010. Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal Excipients and Food Chemistry*, 1: 27-35.
- Belghith, K. S., Dahech, I., Hamden, K., Feki, A., Mejdoub, H. & Belghith, H.** 2012. Hypolipidemic effect of diet supplementation with bacterial levan in cholesterol-fed rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50: 1070-1074.
- Caleffi, E. R., Krausová, G., Hyrslová, I., Paredes, L. L. R., dos Santos, M. M., Sasaki, G. L., Gonçalves, R. A. C. & Oliveira, A. J. B.** 2015. Isolation and prebiotic activity of inulin-type fructan extrated from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80: 392-399.
- Carvalho, M. A. M., Asega, A. F., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 2007. Fructans in Asteraceae from Brazilian cerrado. In: Shiomi N., Benkeblia N., Shuichi O., (Eds.), *Recent advances in fructooligosaccharides research*. Trivandrum: Research Signpost, Kerala, India, 69–91 p.
- Chatterton, N. J., Harrison, P. A.** 1997. Fructan oligomers in *Poa ampla*. *New Phytologist*, 136: 3-10.
- Chatterton, N.J., Harrison, P.A., Thornley, W.R. & Bennett, J.H.** 1993. Structure of fructan oligomers in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Journal of Plant Physiology*, 142: 552-536.
- Edelman, J. & Jefford, T.G.** 1968. The mechanisim of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist*, 67: 517-531.

- Fank-de-Carvalho, S. M., Bão, S. N. & Marchioretto, M. S.** 2012. Amaranthaceae as a bioindicator of Neotropical Savannah diversity. In: Lameed, G.A (Ed), Biodiversity Enrichment in a Diverse World, 235-262p.
- Fernandes, G. W., Barbosa, N. P. U., Negreiros, D. & Paglia, A. P.** 2014. Challenges for the conservation of vanishing megadiverse rupestrian grasslands. *Brazilian Journal of Nature Conservation*, 12: 162–165.
- Fernandes, G. W.** 2016. The Megadiverse Rupestrian Grassland. In: Fernandes, G. W(Ed). *Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil*, 3-12 p.
- Fialho, M. B., Simões, K., Barros, C. A., Pessoni, R. A. B., Braga, M. R. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 2013. Production of 6-kestose by the filamentous fungus *Gliocladium virens* as affected by sucrose concentration. *Mycoscience*, 54: 198-205.
- Figueira, J. E. C., Ribeiro, K. T., Ribeiro, M. C., Jacobi, C. M., França, H., Neves, A. C. O., Conceição, A. A., Mourão, F. A., Souza, J.M. & Miranda, C. A. K.** 2016. Fire in Rupestrian Grasslands: Plant Response and Management. In: Fernandes, G.W (Ed). *Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil*, 415-443 p.
- 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: 664-70.
- Giulietti, A. M., Rapini, A., Andrade, M. J. G., Queiroz, L. P. & Silva, J. M. C.** 2009. *Plantas raras do Brasil, Conservação Internacional- Brasil/ Universidade Estadual de Feira de Santana*, 496 p.
- Hendry, G. A. F. & Wallace, R. K.** 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In: Suzuki, M., Chatterton, N.J. (Eds.). *Science and technology of fructans*. Boca Raton: CRC Press, 119–139 p.
- Henry, R.J. & Darbyshire, B.** 1980. Sucrose:sucrose fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase from *Allium cepa*. *Phytochemistry*, 19: 1017-1020.
- Hopper, S.D.** 2009. OCBIL theory: towards an integrated understanding of the evolution, ecology and conservation of biodiversity on old, climatically buffered, infertile landscapes. *Plant Soil*, 322, 49-86.
- Joaquim, E. O., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Hayashi, A. H. & Carvalho, M. A. M.** 2014. Inulin contents and tissue distribution in underground storage organs of Asteraceae species from the Brazilian rocky fields. *Botany*, 92: 827-836.

- Joaquim, E. O., Silva, T. M., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Moraes, M. G. & Carvalho, M. A. M.** 2018. Diversity of reserve carbohydrates in herbaceous species from Brazilian *campo rupestre* reveals similar functional traits to endure environmental stresses. *Flora*, 283, 201-209.
- Johansen, D.A.** 1940. Plant microtechnique. New York: Mc Graw–Hill,. 523 p.
- Martinelli, G., Messina, T. & Filho, L.S.** 2014. Livro vermelho da flora do Brasil, plantas raras do Cerrado. CNCFlora.
- Menezes, N. L., Handro, W. & Campos, J. F. B. M.** 1969. Estudos anatômicos em *Pfaffia jubata* Mart. Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Botânica, 195-237.
- Mucina, L.** 2018. Vegetation of Brazilian campos rupestres on siliceous substrates and their global analogues. *Flora*, 238, 11-23.
- Oliveira, V.F., Silva, E.A. & Carvalho, M.A.M.** 2016. Elevated CO₂ atmosphere minimizes the effect of drought on the cerrado species *Chrysolaena obovata*. *Frontiers in Plant Science*, 7 article 810.
- Palmer, J.** 1998. A taxonomic revision of *Gomphrena* (Amaranthaceae) in Australia. *Australian Systematic Botany*, 11: 73- 161.
- Parvanova, D., Ivanov, S., Konstantinova, T., Karanov, E., Atanasov, A., Tsvetkov, T., Alexieva, V. & Djilianov, D.** 2004. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 57-63.
- Pilon-Smits, E., 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.
- Ritsema, T. & Smeekens, S.** 2003. Fructans: beneficial for plants and human. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 223-230.
- Sage, R. F., Sage, T. L., Pearcy, R. W. & Borsch, T.** 2007. The Taxonomic distribution of photosynthesis in Amaranthaceae sensu stricto. *American Journal of Botany*, 94: 1992-2003.
- Schaefer, C. E., Cândido, H. G., Corrêa, G. R., Nunes, J. A. & Arruda, D. M.** 2016. Soils associated with Rupestrian Grasslands In: Fernandes, G.W (Ed). *Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil*, 55-68p.

- 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: 46-55.
- Silveira, F. A. O., Negreiros, D., Barbosa, N. P. U., Buisson, E., Carmo, F. F., Carstensen, D. W., Conceição, A. A., Cornelissen, T. G., Echternacht, L., Fernandes, G. W., Garcia, Q. S., Guerra, T. J., Jacobi, C. M., Lemos-Filho, J. P., Le Stradic, S., Morellato, L. P. C., Neves, F. S., Oliveira, R. S., Schaefer, C. E., Viana, P. L. & Lambers, H.** 2016. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. Plant Soil 403: 129-152.
- Siqueira, J.C.** 1991. O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) no Brasil. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Shiomi, N., Onodera, S., Vieira, C. C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 1996. Structure of fructan polymers from tuberous roots of *Gomphrena macrocephala* (Amaranthaceae) from the cerrado. New Phytologist, 133: 643-650.
- 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.
- Townsend, C.C.** 1993. Amaranthaceae. In: Kubitzki, K., Rohwer, J.G., Bittrich, V. (Eds), The families and genera of vascular plants, vol II Flowering plants - Dicotyledons. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH
- Veloso, H. P., Rangel Filho, A. L. R. & Lima, J. C. A.** 1991. Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 123 p.
- Vereyken, I. J, Kuik, J. A. V., Evers, T. H., Rijken, P. J. & Kruijff, B.** 2003. Structural requirements of the fructan-lipid interaction. Biophysical Journal, 84: 3147–3154.
- Vieira, C. C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 1993. Fructose-containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hill. (Amaranthaceae) at different phenological phases. Plant, Cell & Environment, 16: 919-928.
- Vilhalva, D. A. A. & Appezzato-da-Glória, B.** 2006. Morfo-anatomia do sistema subterrâneo de *Calea verticillata* (Klatt) Pruski e *Isostigma megapotamicum* (Spreng.) Sherff - Asteraceae. Revista Brasileira de Botânica, 29: 39-47.

- Vilhalva, D. A. A., Cortelazzo, A. L., Carvalho, M. A. M. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 2011. Histochemistry and ultrastructure of *Campuloclinium chlorolepis* (Asteraceae) tuberous roots accumulating fructan: evidences of functions other than reserve carbohydrate. Australian Journal of Botany, 59: 46-52.
- Wei, J. & Chatterton, J.** 2001. Fructan biosynthesis and fructosyltransferase evolution: Expression of the 6-SFT (sucrose: fructan 6-fructosyltransferase) gene in crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*). Journal of Plant Physiology, 158: 1203-1213.
- Yamamoto, S. & Mino, Y.** 1985 Partial purification and properties of phleinase induced in stem base of orchardgrass after defoliation. Plant Physiology, 78: 591-595.

CAPÍTULO I

Chemical structure and localization of levan-type fructan from underground system of *Gomphrena marginata* (Amaranthaceae), an uncommon case among eudicots

ABSTRACT

Gomphrena marginata Seub. (Amaranthaceae) is an endemic species from Brazilian campos rupestres. Previous studies suggested that the reserve carbohydrate present in the underground systems of this species are levan-type fructans, similar to that identified in *G. macrocephala*. High performance anion exchange chromatography (HPAEC–PAD) revealed the presence of the soluble carbohydrates glucose, fructose, sucrose, 1-kestose, 6-kestose, nystose and fructans with degree of polymerization up to approximately 50 fructose units. RMN of two-dimensional $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC and HMBC analyses showed the predominance of levan-type fructans, a linear molecule with β - 2,6 linkages, based on 6-kestose, corroborating with the results previously shown. Structural analyses of the underground system using light microscopy revealed mainly a gemmiferous tuberous root with the upper region formed by short stems, both presenting vascular cylinders with unusual growth patterns. Fructan spherocrystals were visualized under polarized light and SEM, mostly in the cortex and vascular cylinder. In addition to data reported in the literature concerning the Amaranthaceae, the results presented here suggest that fructans are a trait in this family while the levan-type fructan prevail in *Gomphrena* species.

Key words: Amaranthaceae, soluble carbohydrates, plant anatomy, *campos rupestres*, fructo-polysaccharides

RESUMO

Gomphrena marginata Seub. (Amaranthaceae) é uma espécie endêmica dos campos rupestres. Estudos anteriores sugeriram que o carboidrato de reserva presente nos sistemas subterrâneos desta espécie é frutano do tipo levano, semelhante ao identificado em *G. macrocephala*. A cromatografia aniônica de alta resolução (HPAEC–PAD) revelou a presença de dos carboidratos solúveis glicose, frutose, sacarose, 1-cestose, 6-cestose, nistose e frutanos com grau de polimerização de até aproximadamente 50 unidades de frutose. Dados das análises bidimensionais de RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC e HMBC mostraram que o frutano predominante é o levano, uma molécula linear com ligações β - 2,6, baseada no trissacarídeo 6-cestose, corroborando os resultados anteriores. Análises estruturais baseadas em microscopia de luz demonstraram que o sistema subterrâneo é composto majoritariamente de uma raiz tuberosa gemífera cuja porção superior consiste de caules curtos, ambos apresentando o cilindro vascular com crescimento secundário incomum. Esferocristais de frutanos foram visualizados sob luz polarizada e MEV principalmente no córtex e no cilindro vascular. Em complemento aos estudos descritos na literatura sobre Amaranthaceae, os resultados aqui obtidos indicam que o frutano é o carboidrato de reserva comumente encontrado nos sistemas subterrâneos em espécies dessa família e que o tipo levano predomina no gênero *Gomphrena*.

Palavras-chave: Amaranthaceae, açúcares solúveis, anatomia vegetal, campos rupestres, fruto-polissacarídeo.

1. Introduction

Gomphrena marginata Seub. (Amaranthaceae) is an endemic species from Brazilian *campos rupestres*, specifically found in Minas Gerais State (Flora do Brasil 2020) State, listed as a rare species in Brazil (Giulietti et al., 2009). *Campos rupestres* occur at high altitudes with rock outcrops, sandy and nutritionally poor soils (Benites et al., 2007), with well distinct dry winters and wet summers and constant fire (Silveira et al., 2016). Due to these particular characteristics, a number of species found in *campos rupestres* present adaptations, such as thickened underground organs, allowing survival under unfavourable environmental conditions. Some of these species store considerable amounts of carbohydrates, in some cases constituted of fructans (Moraes et al., 2016; Joaquim et al., 2018).

Fructans are linear or branched polymers of fructose derived from sucrose, containing one internal or terminal glucose (Hendry and Wallace, 1993). They are classified into five structurally different classes depending on the trisaccharide that originates them, the glycosidic linkages between the fructose units and the presence of branching. Inulin, a linear molecule with β 2,1 linkages and based on the trisaccharide 1-kestose, occurs mainly in eudicot species; phlean or levan, a linear molecule with β 2,6 linkages, based on 6-kestose; graminan, a branched molecule with β 2,6 and β 2,1 linkages; the neoseries of inulin with β 2,1 linkages, and the neoseries of levan with β 2,6 linkages, both based on neokestose, with an internal glucose (Carvalho et al., 2007). Fructans also differ from one another by their degree of polymerization (DP), the smallest being the trisaccharides (DP3) and the largest reaching DP 50 in Asteraceae and DP 300 in Poaceae (Yamamoto and Mino, 1985).

Levans are present in a wide variety of organisms: bacteria, fungi, algae and plants (Donot et al., 2012). In plants, levan is commonly found in grasses such as *Dactylis glomerata* and *Phleum pratense* (Carvalho et al., 2007). A recent study with high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD) suggested that the carbohydrates accumulated in underground systems of *Gomphrena marginata* are levan-type fructans (Joaquim et al., 2018). This compound is atypical in eudicotyledonous and reported, until now in *Gomphrena macrocephala* (Shiomi et al., 1996) and *Pachysandra terminalis* (Buxaceae), this last one accumulating graminan, besides levan-type fructan (Van den Ende et al., 2011). Among Amaranthaceae inulin-type fructan was reported in roots of *Pfaffia glomerata* (Caleffi et al., 2015) and in *Achyranthes bidentata* the fructan was chemically identified presenting both β 2,6 and β 2,1 linkages (Wanh et al., 2015).

Levans have a wide range of potential applications in medical, pharmaceutical, chemical and food industries (Srikanth et al., 2015). Studies have shown that the addition of levan to the diet prevents atherosclerosis in rats, by reducing oxidative stress (Belghith et al., 2012), obesity and hyperlipidemia (Kang et al., 2004). Levans also exhibit anti-inflammatory and anti-cancer activities (Sarilmiser and Oner, 2014) and are recognized for the bifidogenic effect, considered a prebiotic compound on human organism (Adamberg et al., 2015).

Numerous species of Amaranthaceae are used in folk medicine (Fank-de-Carvalho, 2012) and most of them present underground reserve systems with anomalous secondary growth (Metcalf and Chalk, 1950) responsible for the tickness of the organ. *Gomphrena* is one of the most widespread genus of Amaranthaceae, with 120 species, of which approximately 46 occur in the Brazilian cerrado and campos rupestres (Siqueira, 1992).

Considering the structural diversity of fructans found so far in Amaranthaceae species and the high fructan concentration in the underground system of *G. marginata* (Silva et al., 2013), endemic of *campos rupestres*, the aim of this study was to characterize the chemical structure and the tissue distribution of the fructan polymers in this species.

2. Material and Methods

2.1. Plant material

Six plants of *Gomphrena marginata* Seub. were collected at Serra de Itacambira in the Espinhaço Mountain Range (16°59'47''S, 43°20'01''W - Minas Gerais State, Brazil). Three specimens were used for anatomical studies and the remaining three, for carbohydrates analyses. Voucher herbarium specimen was deposited in the SP Herbarium (Instituto de Botânica, Brazil), under number SP 441822.

2.2. Methods

Extraction and High Performance Anion Exchange Chromatography (HPAEC–PAD) of Carbohydrates

For carbohydrates analyses the samples were immediately frozen in liquid N₂ and transported on dry ice. Approximately 20 g of the underground system were used for carbohydrate extraction. The samples were boiled in 80% aqueous ethanol for 3 min for enzyme denaturation and preservation of fructan structure. The tissues were ground and the homogenates were subsequently kept in a water bath at 80 °C for 15 min and centrifuged at 1000 *g* for 15 min. This procedure was repeated twice. The residues were subjected to water extraction twice at 60 °C for 30 min and filtered under vacuum (Carvalho et al., 1998).

Ethanol supernatants and water filtrates were pooled, concentrated and de-ionized through ion exchange columns (Carvalho et al., 1997). Identification of soluble carbohydrates was performed by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC–PAD) using a 4 mm×250 mm CarboPac PA-1 column on an ICS 3000 Dionex System (Asega et al. 2008). The gradient was established by mixing eluant A (150 mmol L⁻¹ NaOH) with eluant B (500 mmol L⁻¹ sodium acetate in 150 mmol L⁻¹ NaOH) as follows: 0–2 min, 25 mmol L⁻¹; 2.1–8.5 min, 50 mmol L⁻¹; 8.6–10 min, 75 mmol L⁻¹; 10.1–28 min, 100 mmol L⁻¹; 28.1–30 min, 500 mmol L⁻¹; and 30.1–40 min, 25 mmol L⁻¹, using a flow rate of 1 ml min⁻¹ through the column. The applied PAD potentials for E1 (0–0.4 s), E2 (0.41–0.42 s), E3 (0.43 s), and E4 (0.44–1.00 s) were 0.1, –2.0, 0.6, and –0.1, respectively.

Identification by Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

NMR spectrometry of Hydrogen (¹H), Carbon (¹³C), Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) and Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC, J coupling via two - ²J_{H/C} or three - ³J_{H/C} bonds), experiments were performed with the dried aqueous extract using D₂O as deuterated solvent, on spectrometers Varian INOVA, operating at 500 and 125 MHz to ¹H and ¹³C nucleus, respectively. Chemical shifts signals data were expressed in part per million (ppm) or δ and attributed using acetic acid and HOD as internal standard. HOD chemical shift in this experiment was δ4.6.

Anatomical Analyses

For light microscopy the underground systems of *G. marginata* were fixed in FAA 70 (formaldehyde, acetic acid, and 70% ethanol in a ratio of 1:1:18 by volume) (Johansen, 1940). For visualization of fructan crystals under polarized light (Johansen, 1940), samples were then, maintained in 70% ethanol before free-hand cross sectioning. Confirmation of the presence of fructan and not starch crystals was certified by a negative lugol reagent test (Berlyn and Miksche, 1976). For infiltration in hydroxy-ethyl-methacrylate resin (Leica Histoiresin), the samples were dehydrated in a graded ethylic series. Sections (7 mm thick) were cut on a rotary microtome and stained with 0.05% toluidine blue O (Sakai, 1973) in phosphate-citrate buffer at pH 4.5. Images were captured digitally with an Olympus BX53 microscope coupled with an Olympus Q-Color 5 camera, using the software Image-Pro Express 6.3 (Media Cybernetics).

For scanning electron microscopy (SEM), samples were fixed in Karnovsky solution (Karnovsky 1965) and dehydrated in a graded acetone series, dried in a CO₂ critical point

dryer, mounted on aluminum supports and coated with gold. Observations were performed using a Philips XL Series XL 20 microscope.

3. Results

Composition and structure of carbohydrates

HPAEC–PAD analysis of the carbohydrate extracted from the underground systems indicated the presence of glucose, fructose, sucrose, the trisaccharides 1-kestose and 6-kestose, the tetrasaccharide nystose and other fructans with degree of polymerization (DP) between 5 and approx.50 (Figure 1).

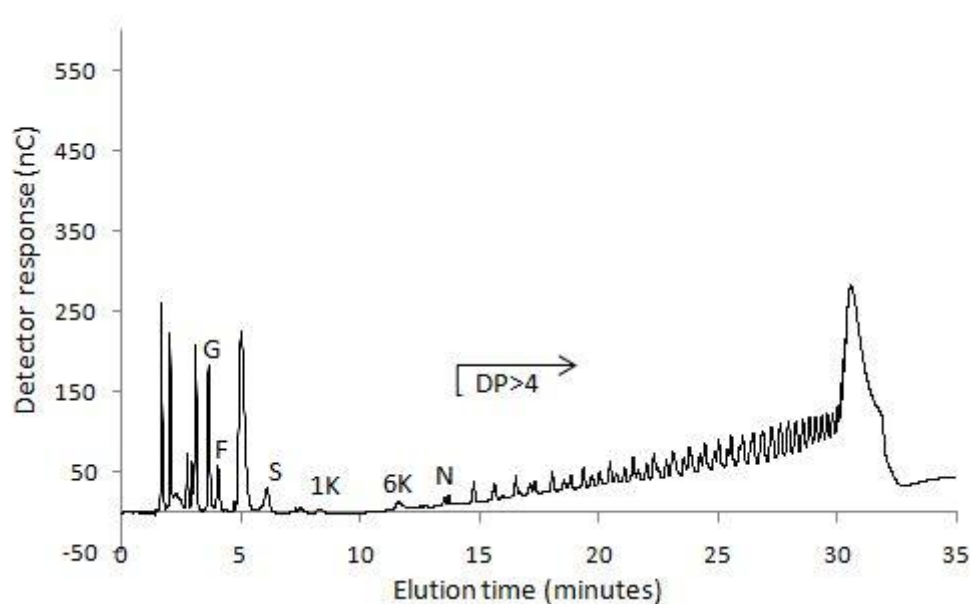
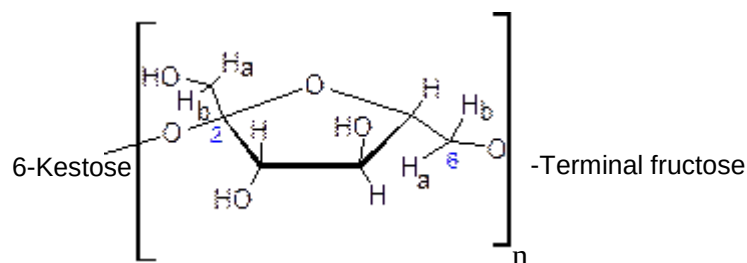


Figure 1. HPAEC-PAD profile of soluble carbohydrates from underground storage system of *Gomphrena marginata*. Glucose (G), fructose (F), sucrose (S), 1-kestose (1-K), 6-kestose (6-K), nystose (N), and fructans with degree of polymerization higher than 4 (DP > 4).

HSQC and HMBC spectra (Varian INOVA 500 MHz, D₂O) (Figs. 2 and 3) of *G. marginata* polymer, show the ¹³C NMR signals at δ 60.3, 104.6, 76.7, 75.7, 80.7 and 63.8, which were attributed to carbons of the fructosyl residue. Signal at δ 104.6 was attributed to anomeric carbon C-2 while those at δ 60.3 and 63.8 were assigned to methylene group (C1 and C6). Additional signals at δ 75.7, 76.7, and 80.7 correspond to oxymethinic groups of the fructosyl residue (Figure 2). The ¹H NMR spectrum shows seven signals ranging from δ 3.3 to 4.0 which were assigned to the fructosyl residue based on the analysis of two-dimensional HSQC spectrum, which shows that these hydrogen are directly linked to their respective carbons ($J_{H/C}$) (Figure 2 and Table 1). HMBC spectrum showed correlation structure via two

($^2J_{H/C}$) and three ($^3J_{H/C}$) bonds of the fructosyl residue (Fig 3 and Table 2). These NMR data when compared with literature indicate predominance of β - 2, 6 linkage, characteristic of the fructosyl residue of levan-type fructans (Husseiny et al., 2015).

A. Structure of the fructosyl residue



B. HSQC spectrum

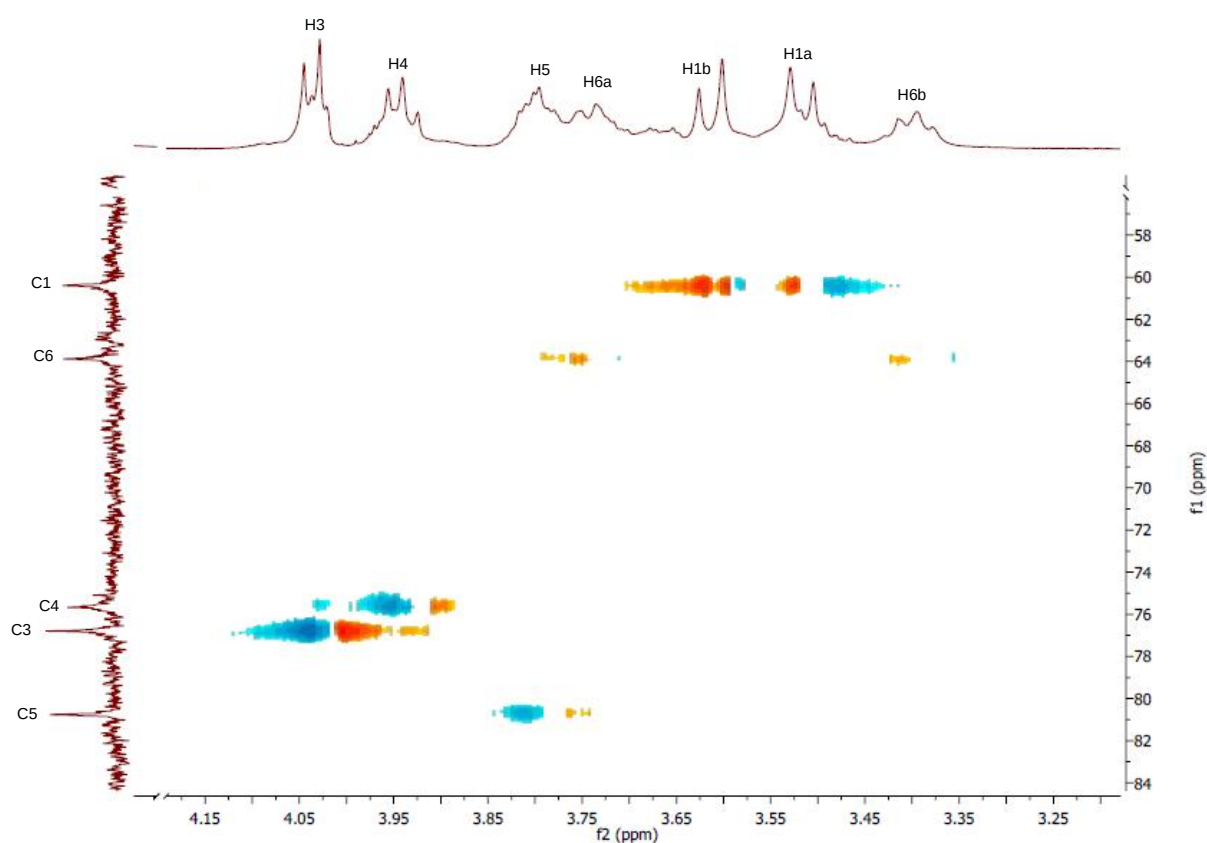


Figure 2. A. structure of the fructosyl residue and B. HSQC (500 MHz, D₂O) spectrum, showing the direct connectivity ($J_{H/C}$) bonds of the fructosyl residue of levan-type fructan polysaccharides from *Gomphrena marginata* underground storage system.

Table 1. HSQC (500 MHz, D₂O) spectrum showing the direct connectivity between the ¹³C and ¹H of the fructosyl residue of levan-type fructan polysaccharides from *Gomphrena marginata* underground storage system.

Chemical shifts J _{H/C}								
Atoms	H1a/C1	H1b/C1	C-2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6a/C6	H6b/C6
¹ H	3.5	3.6	-	4.0	3.9	3.8	3.7	3.3
¹³ C	60.3	60.3	104.6	76.7	75.7	80.7	63.8	63.8

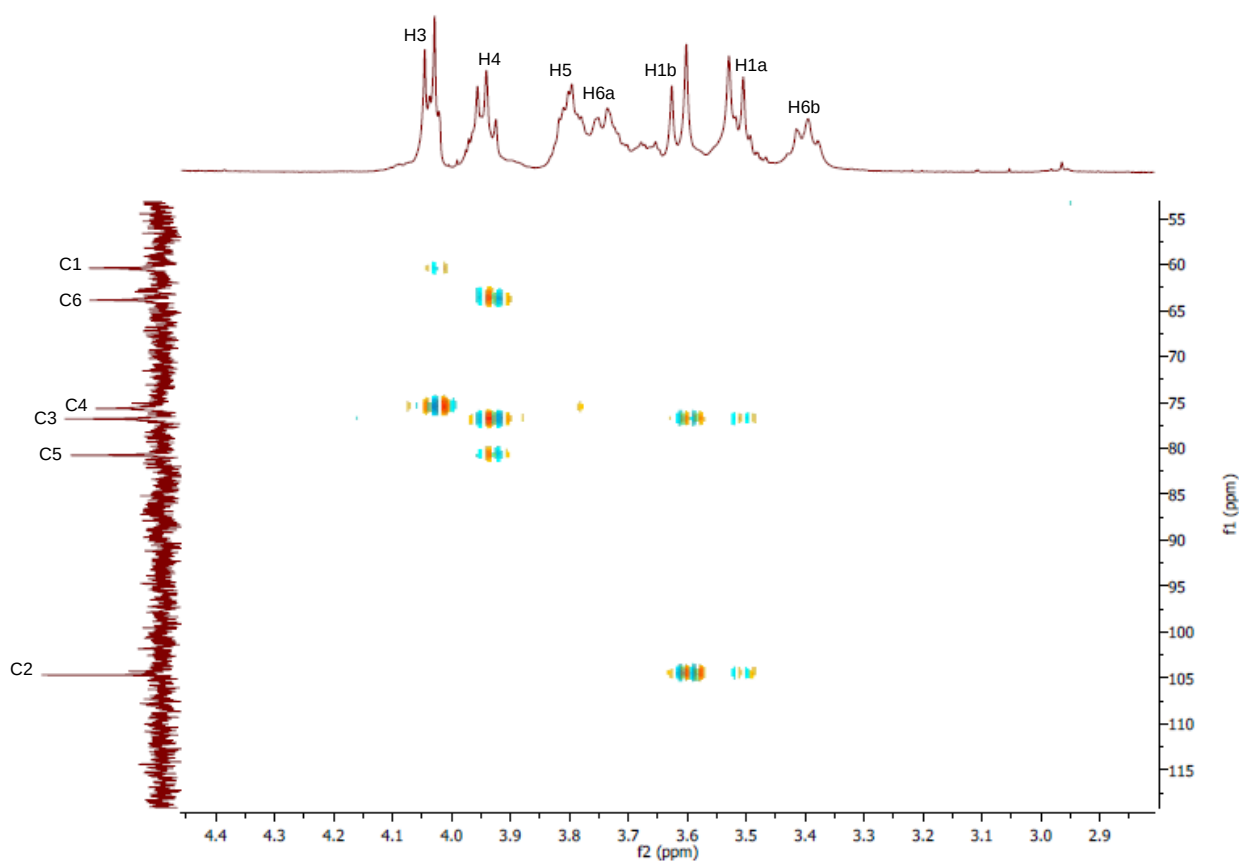


Figure 3. HMBC (500 MHz, D₂O) spectrum showing the correlations via two (²J_{H/C}) and three (³J_{H/C}) bonds, of the fructosyl residue of levan-type fructan polysaccharides from *Gomphrena marginata* underground storage system

Table 2. HMBC chemical shifts (δ or ppm), 500 MHz (^1H) and 125 MHz (^{13}C) in D_2O data of the fructosyl residue of levan-type fructan polysaccharides from *Gomphrena marginata* underground storage system.

Chemical shifts $^2\text{J}_{\text{H/C}}$ and $^3\text{J}_{\text{H/C}}$						
Atoms	C1	C2	C3	C4	C5	C6
H1a		104.6/3.5	76.7/3.5			
H1b		104.6/3.6	76.7/3.6			
H3	60.3/4.0			75.7/4.0		
H4			76.7/3.5		80.7/3.9	63.8/3.9
H5				75.7/3.8		

Anatomical analyses

The underground reserve system of *Gomphrena marginata* is predominantly a vertical fleshy tuberous root that grows downward into the soil (Figure 5A and 6A). However, the upper region of the underground system consists of branched short stems, with leaves appearing only above the soil surface (Figure 5). The stems and tuberous roots of the analysed specimens presented secondary structure (Figure 5B and Figure 6B). Periderm covers the entire underground system and the cortex presents few layers of parenchymatic cells (Figure 5B and 6B). The vascular cylinder shows an unusual pattern, with irregular supernumerary cambia, which produces a large proportion of reserve parenchyma cells (Figure 5B, C and 6B). Primary xylem exhibits centrifugal maturation and a medulla in its core, confirming the stem structure in the upper region of the organ (Figure 5C). In the stem, levan spherocrystals were visualized in the cortex, parenchymatic cells of secondary xylem and phloem, and medulla (Figure 5D and E). Mostly, the underground system presents radicular structure, confirmed by the presence of metaxylem in the centre (Figure 6C). In the tuberous root, buds were observed (Figure 6D) and levan spherocrystals were visualized in the cortex, parenchymatic cells of vascular cylinder (Figure 6F and 6G), forming at times clusters (Figure 6E). Spherocrystals were also visualized inside the vessel elements (Figure 6H). Lugol tests were negative for starch in both stem and root.

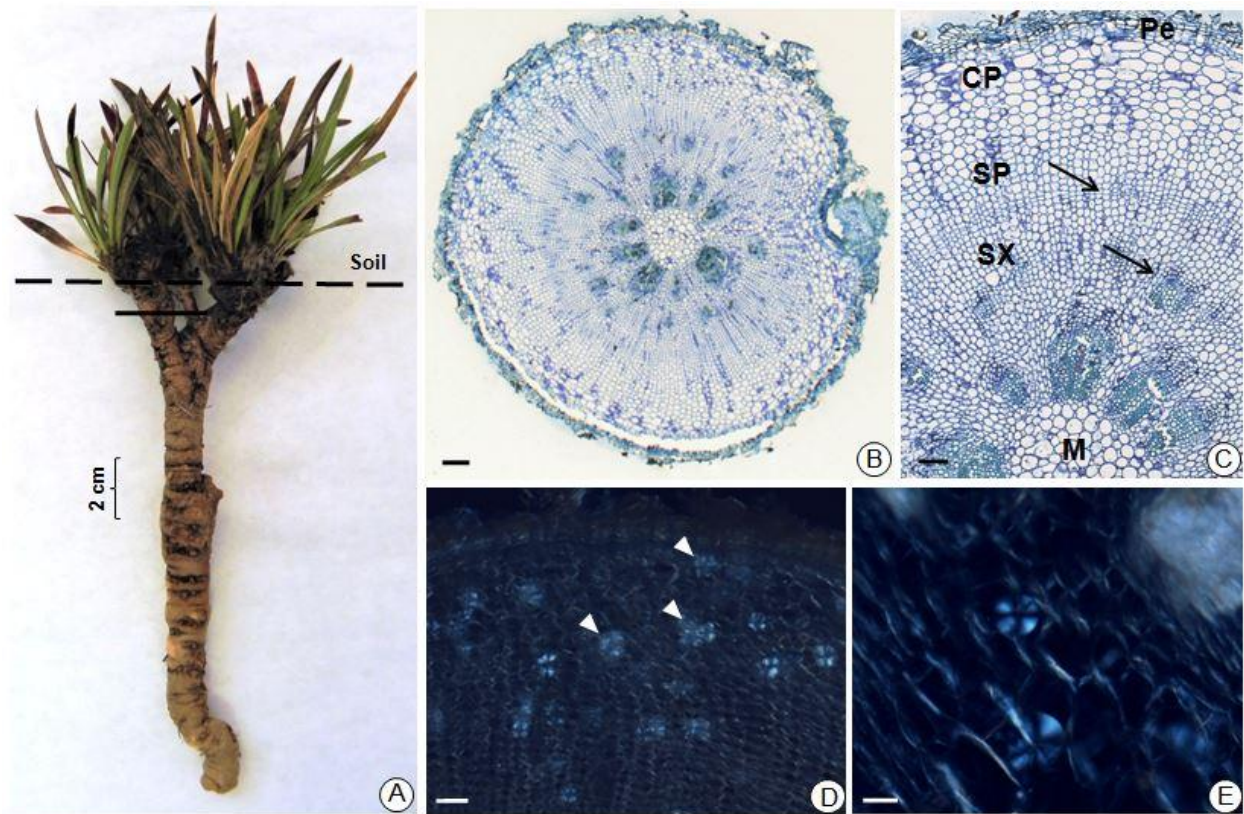


Figure 5. (A) General view of *Gomphrena marginata*; continuous line indicates the sectioned region. (B-E) Transverse sections of the stem. General (B) and detailed (C) view, showing periderm (Pe), cortical parenchyma (CP), secondary phloem (SP), secondary xylem (SX), cambium (arrows) and medulla (M). Levan spherocrystals (arrowheads) visualized under polarized light in the parenchyma cells of the cortex, in the secondary phloem and xylem (D) and medulla (E). Scale bars: 200 μm (B), 100 μm (C and D) and 50 μm (E).

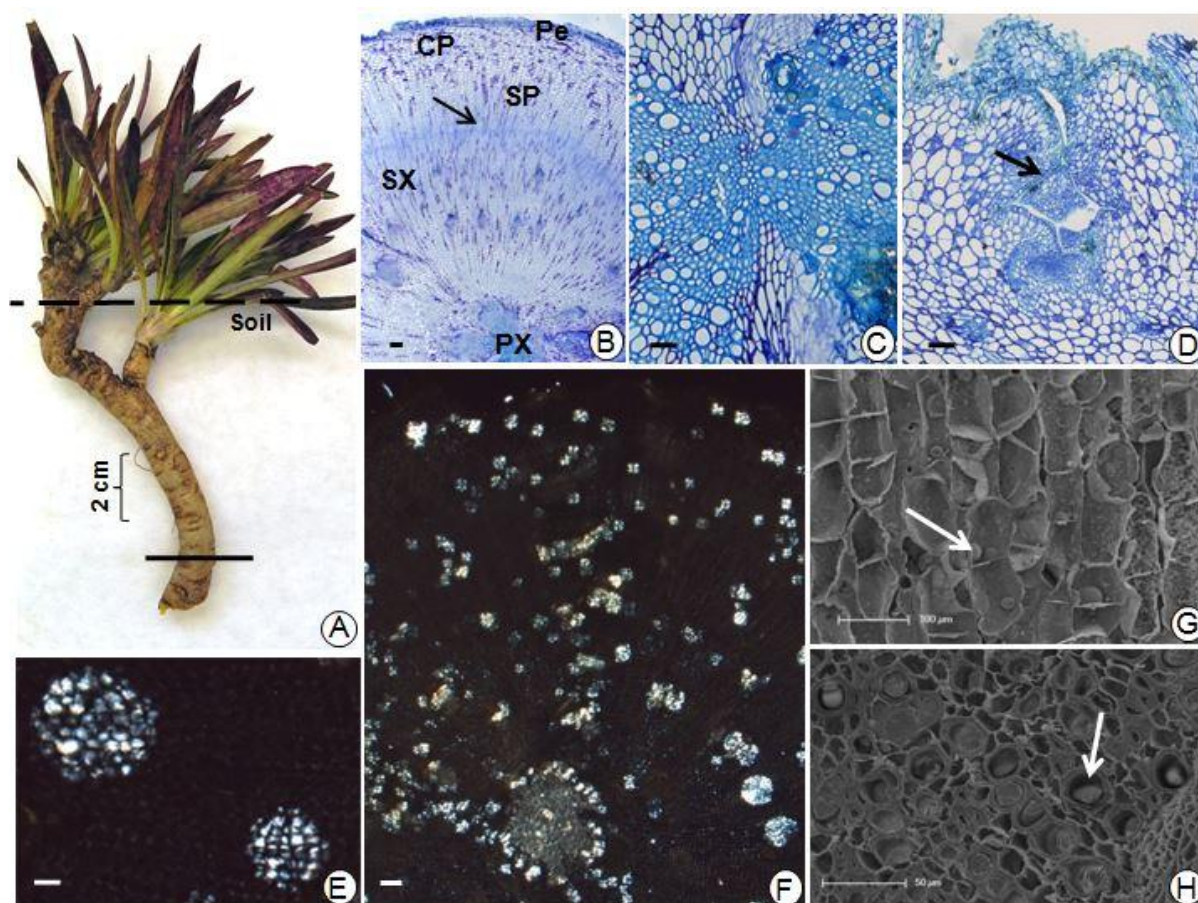


Figure 6. (A) General view of *Gomphrena marginata*; continuous line indicates the sectioned region. (B-H) Transverse sections of tuberous roots. (B) General view showing periderm (Pe), cortical parenchyma (CP), secondary phloem (SP), secondary xylem (SX), cambium (arrow) and primary xylem (PX). (C) Detail of the central region of the tuberous root. (D) Presence of bud (arrow). (E and F) Levam spherocrystals visualized under polarized light, forming at times clusters (E) in the parenchyma cells of the cortex, in the secondary phloem and xylem (F). (G and H) Scanning electron micrographs with levam spherocrystals (arrows) in the parenchymatic cortex (G) and inside the vessel elements (H). Scale bars: 200 μm (B and F), 100 μm (D and G) and 50 μm (C, E and H).

4. Discussion

Previous chromatographic studies with *Gomphrena marginata* suggested that levan-type fructans are the carbohydrates accumulated in the underground system of this Amaranthaceae (Joaquim et al., 2018). ^{13}C NMR analyses of the polysaccharide from reserve tissues of *G. marginata* showed similarity between the chemical shifts signals of fructosyl residue of levan-type fructan as reported for *Gomphrena macrocephala*, (Shiomi et al. 1996). However, although levans are well spread among plant species, no data of ^{13}C and ^1H HSQC and HMBC spectral analyses for levan-type fructans of other Angiosperm are reported; data in the literature refer only to levans from microorganism, such as *Pseudomonas fluorescens*

(Jathore et al., 2012), *Lactobacillus reuteri* (Sims et al., 2011) *Bacillus subtilis* (Shih et al., 2005) *Chromohalobacter salexigens* (Husseiny et al., 2015), and they are truly comparable to that of *G. marginata*.

In roots of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae), the unequivocal presence of inulin-type fructan was confirmed by NMR analyses (Caleffi et al., 2015). In *Achyranthes bidentata* and *Cyathula officinalis*, well known medicinal species of Amaranthaceae from China, the identified fructans present both β 2,6 and β 2,1 linkages (Ying-Hua et al, 2004; Wang et al., 2015). Furthermore, chromatographic analyses indicated the accumulation of levan-type fructans in underground systems of *Gomphrena agrestis* (Joaquim et al., 2018), *G. monquini*, *G. scapigera* and *G. decipiens* (unpublished). The information above, in addition to the unequivocal presence of levans in *G. macrocephala* (Shiomi et al., 1996) and *G. marginata*, suggests that fructan accumulation in Amaranthaceae could be a family trait, while the type of fructan stored may differ depending on the genera

Fructans have been extensively studied in monocotyledonous and among these, a structural diversity is found (Pollock and Cairns, 1991). In Poaceae, for example, graminan-type fructans occur in cereals such as *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare* (Bancal et al., 1992), while levan-type is found in *Dactylis glomerata* (Chatterton et al., 1993) and *Phleum pratense* (Tamura et al, 2009) and the neoseris in *Lolium perenne* (Pavis et al., 2001). Among the Liliaceae, *Allium cepa* accumulates the neoseris and among the Agavaceae, a complex mix of graminans and branched neo-fructans, named agavins (Mancilla-Margalli and López, 2006, Arrizon et al., 2010) are found. In eudicotyledonous, inulin is commonly found in the Asteraceae (Moraes et al., 2016 and refs therein, Joaquim et al., 2018); however the presence of other types of fructans in Amaranthaceae and Buxaceae (Van den Ende et al., 2011; Van den Ende et al., 2016), indicate that a variety of fructan structures occurs in eudicots as well. Van den Ende (2013) suggested that the capacity to synthesize fructans emerged at least 4 times in the evolutionary process: in Asterales, which store inulin-type fructans; in Poales, graminan, levan and the neoseris; Asparagales and Agavoideae, neoseris type; and in the basal eudicot *Pachysandra terminalis* (Buxaceae) which accumulates graminan and levan. Evolutionarily speaking, fructans in Amaranthaceae are still far from being widely investigated, however, the studies until now point to a diversity of fructan types within this family.

As for the identification and visualization of fructan spherocrystals, the method used in this study was described specifically for inulin (Johansen, 1940); however, in the levan accumulating tissues of *G. marginata*, sphaerocrystals were clearly visualized under polarized light, indicating that the method is not exclusive for inulin-type fructans. In fact, fructan

spherocrystals had been already visualized in root tissues of the levan accumulating species *G. macrocephala* (Vieira and Figueiredo-Ribeiro, 1993). In *G. marginata*, levan crystals were observed mainly in the vascular cylinder, and inside the vessel elements. Similar localization was reported in *G. macrocephala* (Vieira and Figueiredo-Ribeiro, 1993) and in different types of underground systems of Asteraceae species (Tertuliano and Figueiredo-Ribeiro, 1993; Oliveira et al., 2013; Joaquim et al., 2014).

The underground reserve system of *G. marginata* is mainly a tuberous root, capable of resprouting due to the presence of buds, also described in *Pfaffia gnaphalioides* (Grosso, 2007) and in tuberous roots of *Vernonia brevifolia* (currently *Lessingianthus brevifolius*) (Hayashi and Appezzato-da-Glória, 2007) and *V. oxylepis* (Vilhalva and Appezzato-da-Glória, 2006), both inulin accumulating Asteraceae species. The presence of buds in roots allows the regeneration of the aerial parts after drought, fire or any other environmental disturbance (Klimesová and Klimes, 2007), while the reserve compounds therein supplies energy and carbon to guarantee resprouting, growth, and ultimately, species survival.

The secondary structures of roots and stems observed in *G. marginata* show an unusual or anomalous thickening of the vascular cylinder, a common phenomenon in the Amaranthaceae (Metcalf and Chalk, 1950; Menezes et al., 1969; Grosso, 2007; El-Ghamery et al., 2015; Sá et al., 2016) and Chenopodiaceae (Metcalf and Chalk, 1950; Krubingel, 1998). In *Gomphrena ambiflora*, root secondary growth was considered atypical (Jáuregui et al., 2014) as the authors showed that the successive rings are formed from a lateral meristem producing parenchyma outward, cambium rings and parenchyma inward.

Due to a number of shared characteristics with respect to morphology, anatomy, phytochemistry and phylogeny, Amaranthaceae *sensu lato* included the Chenopodiaceae (Kadereit et al., 2003). Curiously, a fructan exohydrolase enzyme (6-FEH) was purified, cloned and characterized from the tuberous roots of the Chenopodiaceae sugar beet (*Beta vulgaris*), a sucrose storing plant (Van den Ende et al., 2003). This unexpected presence in a non fructan-storing plant, in addition to the above mentioned traits, could be an evidence of the evolutionary relationship between these two families.

Data concerning the variety of fructan structures occurring in the Amaranthaceae highlight the fact that eudicots, and not only monocots, present a diversity of fructan types. In this study, the presence of levan-type fructans in *G. marginata* underground system (stem and root) was confirmed, demonstrating not only that fructan metabolism is a characteristic of the Amaranthaceae, but also that a structural diversity of fructans occurs in members of this family. *Gomphrena marginata* shows an unusual secondary growth which produces abundant parenchymatic cells for the storage of fructo-oligo- and -polysaccharides that provide energy

and allows the regeneration of aerial parts, after drought or fire, abiotic stresses of frequent occurrence in *campos rupestres*.

5. References

- Adamberg, K., Tomson, K., Talve, T., Pudova, K., Puurand, M., Visnapuu, T., Alamäe, T. & Adamberg, S.** 2015. Levan enhances associated growth of *Bacteroides*, *Escherichia*, *Streptococcus* and *Faecalibacterium* in fecal microbiota. Plos One, 10, e0144042.
- Asega, A. F., Nascimento, J. R. O., Schroeven, L., Van den Ende, W. & Carvalho, M. A. M.** 2008. Cloning, characterization and functional analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. Plant Cell Physiology, 49: 1185–1195.
- Arrizeon, J., Morel, S., Gschaedler, A. & Monsan, P.** 2010. Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages. Food Chemistry. 122: 123-130.
- Bancal, P., Carpita, N. C. & Gaudillere, J. P.** 1992. Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis. New Phytologist. 120: 313-321.
- Belghith, K. S., Dahech, I., Hamden, K., Feki, A., Mejdoub, H. & Belghith, H.** 2012. Hypolipidemic effect of diet supplementation with bacterial levan in cholesterol-fed rats. International Journal of Biological Macromolecules, 50: 1070-1074.
- Benites, V. M., Schaefer, C. E. G. R., Simas, F. N. B. & Santos, H. G.** 2007. Soils associated with rock outcrops in the Brazilian mountain ranges Mantiqueira and Espinhaço. Revista Brasileira de Botânica, 30: 569–577.
- Berlyn, G. P. & Miksche, J. P.** 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames: Iowa State University Press.
- Caleffi, E. R., Krausová, G., Hyrslová, I., Paredes, L. L. R., dos Santos, M. M., Sasaki, G. L., Gonçalves, R.A.C. & Oliveira, A. J. B.** 2015. Isolation and prebiotic activity of inulin-type fructan extrated from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots. International Journal of Biological Macromolecules, 80: 392-399.

- Carvalho, M. A. M., Zaidan, L. B. P. & Dietrich, S. M. C.** 1997. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. *New Phytologist*, 136: 153-161.
- Carvalho, M. A. M., Pinto, M. M. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica*, 21: 281-285.
- Carvalho, M. A. M., Asega, A. F. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 2007. Fructans in Asteraceae from Brazilian cerrado. In: Shiomi N., Benkeblia N, Shuichi O., (Eds.), *Recent advances in fructooligosaccharides research*. Trivandrum: Research Signpost, Kerala, India, 69–91.
- Chatterton, N.J., Harrison, P.A., Thornley, W.R. & Bennett, H.** 1993. Structures of Fructan Oligomers in Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Journal of Plant Physiology*. 142: 552-556.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C. & Schorr-Galindo, S.** 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87: 951-962.
- El-Ghamery, A. A., Sadek, A. M. & Elbar, O. H. A.** 2015. Root anatomy of some species of *Amaranthus* (Amaranthaceae) and formation of successive cambia. *Annals of Agricultural Sciences*, 60: 53-60.
- Fank-de-Carvalho, S. M., Bão, S. N. & Marchioretto, M. S.** 2012. Amaranthaceae as a bioindicator of Neotropical Savannah diversity. In: G.A Lameed (Ed), *Biodiversity Enrichment in a Diverse World*, 235-262.
- Flora do Brasil.** 2020. *Amaranthaceae* in Flora do Brasil 2020 under construction. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB26342>>. Accessed on: 29 May 2018.
- Giulietti, A. M., Rapini, A., Andrade, M. J. G., Queiroz, L. P. & Silva, J. M. C.** 2009. *Plantas raras do Brasil*. Belo Horizonte: Conservação Internacional - Brasil/Universidade Estadual de Feira de Santana, 496 p.
- Grosso, M. A.** 2007. Crecimiento secundario inusual en raíz principal de *Pfaffia gnaphalioides* (L. Fil.) Mart. (Amaranthaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 21: 21-26.

- Hayashi, A.H. & Appezatto-da-Glória, B.** 2007. Anatomy of the underground system in *Vernonia grandifolia* Less. and *brevifolia* Less. (Asteraceae). Brazilian Archives of Biology and Technology. 50: 979-988.
- Hendry, G. A. F. & Wallace, R. K.** 1993. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: Suzuki M., Chatterton N. J. (Eds.), Science and technology of fructans. Boca Raton: CRC Press, 119-139.
- Husseiny, S. M, Sheref, F. A, Amer, H. & Elsakhawy, T. A.** 2015. Biosynthesis of applicable levan by a new levan producing moderately halophilic strain *Chromohalobacter salexigens* and its biological activities. Current Science International 4: 423-434.
- Jathore, N. R., Bule, M. V., Tilay, A. V. & Annapure, U. S.** 2012. Microbial Levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and medium optimization for enhanced production. Food Science and Biotechnology, 21: 1045–1053.
- Jáuregui, D., Lapp, M., Castro, M., Ruiz-Zapata, T. & Torrecilla, P.** 2014. Estructura anatómica de raíces y tallos de *Gomphrena albiflora* Moq. (Amaranthaceae). Pittieria, 38: 83-94.
- Joaquim, E. O., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Hayashi, A. H. & Carvalho, M. A. M.** 2014. Inulin contents and tissue distribution in underground storage organs of Asteraceae species from the Brazilian rocky fields. Botany, 92: 827-836.
- Joaquim, E. O., Silva, T. M., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Moraes, M. G. & Carvalho, M. A. M.** 2018. Diversity of reserve carbohydrates in herbaceous species from Brazilian *campo rupestre* reveals similar functional traits to endure environmental stresses. Flora, 283: 201-209.
- Johansen, D. A.** 1940. Plant microtechnique. New York: Mc Graw–Hill.
- Kadereit, G., Borsch, T., Weising, K. & Freita G. H.** 2003. Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the evolution of C4 photosynthesis. International Journal of Plant Sciences, 164: 959-986.
- Kang, S. A., Hong, K., Jang, K.-H., Kim, S., Lee, K. H., Chang, B.-II, Chu-Ho, K. & Choue, R.** 2004. Anti-obesity and hypolipidemic effects of dietary levan in high fat diet-induced obese rats. Journal of Microbiology and Biotechnology, 14: 796–804.
- Karnovsky, M. J.** 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cell Biology, 27: 137-138.

- Klimesova, J. & Klimes, L.** 2007. Bud banks and their role in vegetative regeneration – A literature review and proposal for simple classification and assessment. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 8: 115–129.
- Krumbiegel, A.** 1998. Morphology and anatomy in annual taxa of *Beta vulgaris* s. l. (Chenopodiaceae). *Nordic Journal of Botany*, 18: 159-167.
- Mancilla-Margalli, N.A. & López, M.G.** 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyllirion* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 7832-7839.
- Menezes, N. L., Handro, W. & Campos, J. F. B. M.** 1969. Estudos anatômicos em *Pfaffia jubata* Mart. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Botânica*, 195-237.
- Metcalfe, C. R. & Chalk, L.** 1950. *Anatomy of the dicotyledons*. (Volum II). Oxford: Claredon Press.
- Moraes, M. G., Carvalho, M. A. M., Franco, A. C., Pollock, C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 2016. Fire and drought: soluble carbohydrate storage and survival mechanisms in herbaceous plants from the Cerrado. *BioScience*, 66: 107-117.
- Oliveira, T., Bombo, A. B. & Appezzato-da-Glória, B.** 2013. Anatomy of vegetative organs with an emphasis on the secretory structures of two species of *Aldama* (Asteraceae- Heliantheae). *Botany*, 91: 335–342.
- Pavis, N., Boucaud, J. & Prud'homme, M.P.** 2001. Fructans and fructan-metabolizing enzymes in leaves of *Lolium perenne*. *New Phytologist*. 150: 97-109.
- Pollock, C.J. & Cairns, A. J.** 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42: 77-101.
- Sá, R. D., Asaph S. C. O., Santana, A. S. C. O., Silva F. C. L., Soares, L. A. L. & Randau, K. P.** 2015. Anatomical and histochemical analysis of *Dysphania ambrosioides* supported by light and electron microscopy. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26: 533-543.
- Sakai, W. S.** 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology*, 48: 247-249.
- Sarilmiser, H. K. & Oner, E. T.** 2014. Investigation of anti-cancer activity of linear and aldehyde-activated levan from *Halomonas smyrnensis* AAD6^T. *Biochemical Engineering Journal*, 92: 28-34.

- Shih, I.-L., Yu, Y.-T., Shieh, C.-J. & Hsieh, C.-Y.** 2005. Selective production and characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8211–8215.
- Shiomi, N., Onodera, S., Vieira, C. C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 1996. Structure of fructan polymers from tuberous roots of *Gomphrena macrocephala* (Amaranthaceae) from the cerrado. *New Phytologist*, 133: 643-650.
- 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 rocky-field conditions. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25: 46-55.
- Silveira, F. A. O., Negreiros, D., Barbosa, N. P. U., Buisson, E., Carmo, F. F., Carstensen, D. W., Conceição, A.A., Cornelissen, T. G., Echternatch, L., Fernandes, G.W., Garcia, Q.S., Gerra, T.J., Jacobi, C.M., Lemos-Filho, J.P., Stradic, S.L., Morellato, L. P. C., Neves, F. S., Oliveira, R.S., Schaefer, C.E., Viana, P. L. & Lambers, H.** 2016. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant Soil*, 403: 129–152.
- Sims, I. M., Frese, S. A., Walter, J., Loach, D., Wilson, M., Appleyard, K., Eason, J., Livingston, M., Baird, M., Cook, G. & Tannock, G.W.** 2011. Structure and functions of exopolysaccharide produced by gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23. *The ISME Journal*, 5: 1115–1124.
- Siqueira, J.C.** 1991. O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) no Brasil. Tese de doutorado, Campinas (SP), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Tamura, K., Kawakami, A., Sanada, Y., Tase, K., Komatsu, T. & Yoshida, M.** 2009. Cloning and functional analysis of a fructosyltransferase cDNA for synthesis of highly polymerized levans in timothy (*Phleum pratense* L.). *Journal of Experimental Botany*, 60: 893-905.
- 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.
- Srikanth, R., Reddy, C. H. S. S., Siddartha, G., Ramaiah, M. J. & Uppuluri, K. B.** 2015. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120: 102-104.
- Van den Ende, W., De Coninck, B., Clerens, S., Vergauwen, R. & Van Laere, A.** (2003). Unexpected presence of fructan 6 exohydrolases (6 FEHs) in non fructan plants:

characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel ‘cell wall invertase like’ specific 6 FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). The Plant Journal, 36: 697-710.

Van den Ende, W., Coopman, M., Clerens, S., Vergauwen, R., Le Roy, K., Lammens, W. & Van Laere, A. 2011. Unexpected Presence of Graminan- and Levan-Type Fructans in the Evergreen Frost-Hardy Eudicot *Pachysandra terminalis* (Buxaceae): Purification, Cloning, and Functional Analysis of a 6-SST/6-SFT Enzyme. Plant Physiology, 155: 603-614.

Van den Ende, W. 2013. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. Frontiers in Plant Science. 4, Article 247.

Van den Ende, W., Coopman, M., Vergauwen, R. & Van Laere, A. 2016. Presence of inulin-type fructo-oligosaccharides and shift from raffinose family oligosaccharide to fructan metabolism in leaves of boxtree (*Buxus sempervirens*). Frontiers in Plant Science, 7, article 209.

Vieira, C. C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. 1993. Fructose-containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hill. (Amaranthaceae) at different phenological phases. Plant, Cell & Environment, 16: 919–928.

Yamamoto, S. & Mino, Y. 1985. Partial purification and properties of pheinase induced in stem base of Orchardgrass after defoliation. Plant Physiology, 78: 591-595.

Vilhalva, D.A.A. & Appezzato-da-Glória, B. 2006. Morfoanatomia da raiz tuberosa de *Vernonia oxylepis* Sch. Bip. in Mart. ex Baker – Asteraceae. Acta Botanica Brasilica, 20: 591-598.

Wang, C., Hua, D. & Yan, C. 2015. Structural characterization and antioxidant activities of a novel fructan from *Achyranthes bidentata* Blume, a famous medicinal plant in China. Industrial Crops and Products, 70: 427-434.

Ying-Hua, L., Kai-Ze, H., Min, Y., Yi-Wen, M. & Qiang, P. 2004. Structure of a Bioactive Fructan from the Root of *Cyathula officinalis*. Acta Botanica Sinica, 46: 1128-1134.

CAPÍTULO II

***Gomphrena marginata* Seub.: uma Amaranthaceae C4, acumuladora de frutanos e endêmica de campos rupestres**

RESUMO

Campos rupestres são ecossistemas de topo de montanha que apresentam afloramentos rochosos, solos ácidos e pobres em nutrientes e que estão frequentemente sujeitos a estresses ambientais. *Gomphrena marginata* (Amaranthaceae) é uma espécie endêmica dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço (MG) que se encontra presente na lista de espécies raras do Brasil. Muitas espécies do gênero *Gomphrena* possuem mecanismo fotossintético C4 e sistemas subterrâneos espessados que acumulam frutanos, carboidratos solúveis de reserva. Os objetivos do presente trabalho foram analisar em *G. marginata* o metabolismo de frutanos em diferentes fases fenológicas da planta e caracterizar o seu metabolismo fotossintético. As plantas foram coletadas em campo, na região da Serra de Itacambira (MG) nas fases de dormência (seca), brotação (início das chuvas) e crescimento vegetativo (fim das chuvas), em dois ciclos fenológicos. As atividades enzimáticas de biossíntese e degradação dos frutanos e os carboidratos solúveis foram analisados nos sistemas subterrâneos separados em segmentos proximal e mediano, no ciclo fenológico 1, e proximal, mediano e distal, no ciclo 2. Foram determinados também os carboidratos solúveis das folhas, além do teor de água em cada segmento do sistema subterrâneo e das folhas. As quantificações dos carboidratos foram realizadas por métodos colorimétricos e sua identificação, por HPAEC/PAD. Para a análise anatômica, as folhas foram fixadas em FAA 70, incluídas em historesina e coradas com azul de toluidina. Foram realizados também testes histoquímicos, análise por microscopia eletrônica de varredura e diafanização, para análise do padrão da venação foliar. No ciclo fenológico 1, houve poucas variações nos conteúdos de açúcares e das atividades enzimáticas. A enzima 1-SST (sacarose:sacarose 1- frutossiltransferase), que inicia a síntese de frutanos, apresentou atividade somente no período vegetativo. A 1-FFT (frutano:frutano 1- frutossiltransferase), enzima que promove tanto o alongamento como a diminuição das moléculas, apresentou maior atividade na fase de dormência no segmento proximal, e a enzima de hidrólise (FEH- frutanoexohidrolase) apresentou maior atividade na fase de brotação, apesar de não apresentar diferença estatística significativa entre as fases. No ciclo 2, o conteúdo mais baixo de frutanos ocorreu na região proximal do sistema subterrâneo, na fase de brotação, que também apresentou maiores teores de açúcares redutores e maiores valores de potencial osmótico. Os segmentos mediano e distal não apresentaram alterações expressivas no teor de frutose total e nas atividades enzimáticas entre as fases, indicando a preferência por mobilizar frutanos estocados nos segmentos mais próximos à parte aérea, mantendo-se praticamente constante nas regiões das raízes tuberosas localizadas mais profundamente no solo. A FEH apresentou maior atividade no segmento proximal nas fases de brotação e de crescimento vegetativo. A porcentagem de água dos sistemas subterrâneos apresentou variações irrelevantes entre as fases nos dois ciclos fenológicos, evidenciando a capacidade dos sistemas subterrâneos de armazenar água e manterem a hidratação dos tecidos. Folhas de *G. marginata* são anfiestomáticas, com tricomastectores em ambas as faces e, em grande abundância, na base foliar. A venação primária é pinada e a secundária do tipo broquidódroma. Apresentam anatomia Kranz, que juntamente com a razão isotópica de -14‰, confirmam o metabolismo fotossintético C4 nesta espécie. A concentração elevada de frutanos e a presença do metabolismo fotossintético C4 evidenciam a adaptação desta espécie a ambientes sujeitos aos estresses ambientais e à sazonalidade climática ocorrentes nos campos rupestres.

Palavras- chave: Anatomia foliar, carboidratos de reserva, fenologia, órgão subterrâneo, polissacarídeos.

ABSTRACT

Campos rupestres are mountain top ecosystems with rock outcrops, acid and nutritionally poor soils and often subjected to abiotic stresses. *Gomphrena marginata* (Amaranthaceae) is endemic of *campos rupestres* of the Espinhaço Mountain Range (MG) and listed as a rare species in Brazil. Several species of the *Gomphrena* genus express the C4 photosynthetic pathway and present thickened underground systems that store considerable amounts of soluble carbohydrates, generally of the fructan type. The aim of this work was to analyze fructan metabolism in different phenological phases and characterize photosynthetic metabolism. Plants were collected in the field at Serra de Itacambira (MG) during the phases of dormancy (dry season), sprouting (beginning of rain season) and vegetative growth (end of rain season) in two phenological cycles. The activities of fructan biosynthetic and hydrolytic enzymes and the soluble sugars were analyzed in the proximal and median segments of the underground system in the first phenological cycle and in the proximal, median and distal segments in the second cycle. Soluble carbohydrates were also analyzed in leaves, in addition to measurements of the water content in each segment of the underground system, and in leaves. Carbohydrates were quantified colorimetrically and identified by HPAEC/PAD. For anatomical analyses leaves were fixed in FAA 70, included in historesin and stained in toluidine blue O. Histochemical analyses and scanning electron microscopy were performed and leaves were submitted to diaphanization to analyze the venation pattern. The first phenological cycle presented few variations in sugar contents and enzymatic activities. 1-SST (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase), the fructosyltransferase which initiates fructan synthesis, presented activity only in the vegetative phase. 1-FFT (fructan:fructan 1-fructosyltransferase), responsible to promote the elongation and/or reduction of the chain length, showed the highest activity at dormancy in the proximal segment and the FEH (fructan exohydrolase), showed higher activity in the sprouting phase, although no significant differences were found between phenological phases. In the second cycle, the lowest content of fructans was detected in the proximal segment at sprouting, when the highest contents of reducing sugars and highest osmotic potential values were also observed. The median and distal segments did not present significant differences in the contents of total fructose and in enzymatic activities between phenological phases, indicating the preference to mobilize fructans accumulated in the proximal segment, near the aerial part, remaining practically constant in the segments of the tuberous roots positioned deepest in the soil. FEH presented higher activity in the proximal segment at sprouting and vegetative phases. The water percentage in the underground system presented small variations between phenological phases in both cycles, highlighting the capacity of the underground system to store water and keep tissues hydrated. Leaves of *G. marginata* are amphistomatic, present tector trichomes on both surfaces with considerable amounts in the leaf bases. The primary venation is pinnate and the secondary, brochidodromous. The leaves present Kranz anatomy, which together with the isotopic ratio of -14‰, confirm the C4 photosynthetic metabolism in this species. The high concentration of fructan along with C4 metabolism indicate that this species is well adapted to environments exposed to the abiotic stresses and climatic seasonality occurring in *campos rupestres*.

Key words: Leaf anatomy, phenology, polysaccharides, reserve carbohydrates, underground organs.

1. Introdução

A Cadeia do Espinhaço estende-se desde as proximidades de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais, até o limite norte do estado da Bahia com o estado do Piauí e é nesta cadeia, sobretudo, que se encontram distribuídos os campos rupestres, designação que caracteriza um mosaico de vegetação sobre afloramentos rochosos, ocorrentes em topos de montanhas, com solos pobres em nutrientes, ácidos, com altos teores de alumínio e baixa capacidade de retenção de água (Benites et al., 2007; Schaefer et al., 2016). Essas formações montanhosas ocorrem em altitudes entre 900 e 2033 m e possuem clima bem marcado, com invernos secos e verões chuvosos (Silveira et al., 2016). A região de Grão-Mogol se localiza ao norte da Cadeia do Espinhaço, posição intermediária e disjunta entre as serras da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais e Bahia, já na porção meridional do domínio da caatinga. Apresenta um grande número de espécies endêmicas que é representado por populações de distribuição restrita (Pirani et al., 2003). O clima é tropical, com invernos amenos e verões longos, com cinco meses de estação seca, entre maio e setembro. Durante a estação chuvosa podem ocorrer “veranicos”, que são caracterizados por períodos de uma semana até 30 dias sem chuvas (Pirani et al., 2003).

Por possuírem características tão específicas, os campos rupestres abrigam espécies com adaptações que as permitem sobreviver em condições ambientais adversas, apresentam um alto grau de endemismo e a predominância de espécies herbáceas (Giulietti et al., 1987). Uma das adaptações mais comuns nas plantas destes ambientes é a presença de órgãos subterrâneos espessados que acumulam consideráveis quantidades de carboidratos (Joaquim et al., 2018).

O carboidrato de reserva mais abundante nas plantas vasculares é o amido, acumulado em grãos na forma insolúvel, no entanto, várias espécies também acumulam carboidratos solúveis como os frutanos, que são sintetizados e armazenados nos vacúolos, e que ocorrem em cerca de 15% das angiospermas pertencentes, em geral, às ordens mais derivadas (Hendry & Wallace, 1993). Frutanos são polímeros de frutose originados da sacarose que consistem de séries homólogas de oligo e polissacarídeos solúveis (Edelman & Jefford, 1968). A maioria das espécies que contém frutanos está distribuída em regiões semiáridas ou temperadas, onde ocorrem secas sazonais ou temperaturas baixas (Moraes et al., 2016) de algumas espécies das famílias Liliaceae, Hyacinthaceae e Amaryllidaceae, nas quais foram identificados nos sistemas subterrâneos espessados (Orthen, 2001; Orthen & Wehrmeyer, 2004; Ranwala & Miller, 2008).

Os frutanos são classificados em cinco tipos estruturais diferentes, dependendo do tipo de ligação entre as unidades de frutose (β 2,1 ou β 2,6), se a cadeia é linear ou ramificada e da posição da glicose na cadeia, interna ou na sua extremidade. A cadeia de frutano pode se originar do trissacarídeo 1-cestose (1-F-frutosilsacarose, 1-cestotriose) no qual uma unidade de frutose se liga à sacarose por uma ligação glicosídica β (2,1), originando a classe de frutano inulina, comum em plantas da família Asteraceae. Já o trissacarídeo 6-cestose (6-F-frutosilsacarose, 6-cestotriose) é formado por uma ligação glicosídica β (2,6) de uma unidade de frutose à sacarose, que dá origem aos levanos ou fleanos e ocorre em algumas gramíneas como *Dactylis glomerata* e *Phleum pratense*. Tanto a inulina quanto o levano são constituídos por cadeias lineares que possuem uma unidade terminal de glicose, proveniente da sacarose. O trissacarídeo neocestose (6-G-frutosilsacarose, 6-G-cestotriose) pode ter ligações β (2,1) ou β (2,6), mas a unidade de frutose se liga à glicose da molécula de sacarose ao invés de se ligar à frutose, tornando a unidade da glicose interna à molécula. Esse trissacarídeo dá origem às neoséries que podem apresentar ligações β (2,1), no caso da neosérie da inulina, ou ligações β (2,6), neosérie dos levanos que são encontradas, por exemplo, em *Avena sativum*, *Allium cepa* e *Asparagus officinalis*. O quinto tipo de frutano, os graminanos, consistem de moléculas ramificadas contendo ligações mistas β (2,6) e β (2,1) comuns em gramíneas como *Triticum aestivum* e *Hordeum vulgare* (Carvalho et al., 2007).

Os frutanos são sintetizados e armazenados no vacúolo por ação de duas frutossiltransferases (Figura 1) (Vijn & Smeekens, 1999). A primeira, sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST), que inicia a síntese de frutano, catalisa a transferência irreversível da unidade frutossil de uma molécula doadora de sacarose para outra molécula receptora, resultando na formação do trissacarídeo 1-cestose (1-F-frutosilsacarose) e na liberação de uma molécula de glicose. A segunda enzima, frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT), transfere reversivelmente a unidade frutossil de uma molécula de frutano, com um grau de polimerização maior ou igual a três para outra molécula de frutano ou de sacarose, podendo promover o alongamento ou a diminuição do comprimento da cadeia. A ação de ambas, 1-SST e 1-FFT, resulta na formação da mistura de moléculas de frutanos com diferentes comprimentos ou graus de polimerização (GP). A despolimerização da molécula de frutano é conhecida como um processo sequencial de remoção da frutose terminal por uma enzima específica, a frutano exohidrolase (1-FEH). Este modelo enzimático foi proposto por Edelman e Jefford (1968) para *Helianthus tuberosus* (Asteraceae), que apresenta frutanos do tipo inulina, o mais frequente nas eudicotiledôneas. Em gramíneas e outras monocotiledôneas, outros tipos de frutanos são encontrados, e a sua biossíntese é muito mais complexa (Cairns & Pollock, 1998). Em alguns cereais, como o trigo, a 1-SST e a 1-FFT, juntamente com a

sacarose:frutano 6-frutossiltransferase (6-SFT) determinam a sua biossíntese (Bancal et al., 1992). A 6-SFT transfere a unidade de frutose da molécula de sacarose, ou da molécula de frutano, para outra sacarose ou molécula de frutano, formando respectivamente 6-cestose (6-F-frutossacarose), bifurcose (1&6-cestotetraose) ou frutanos maiores com ligações β (2,6) (Wei & Chatterton, 2001). Henry e Darbyshire (1980) descreveram pela primeira vez a enzima frutano:frutano 6-glicose-frutossiltransferase (6G-FFT) em cebola. Esta enzima transfere a unidade frutossil de uma molécula de frutano para a unidade glicosil de outra molécula de sacarose ou de uma segunda molécula de frutano, formando neocestose, o primeiro trissacarídeo da neosérie da inulina (Gallagher et al., 2007) (Figura 1). Até o momento, a 1-SST foi identificada em todas as espécies que acumulam frutanos, pois é a responsável pela primeira etapa da síntese, a formação de 1-cestose (Ritsema et al., 2003). As frutano-exohidrolases são classificadas de acordo com o tipo de ligação que hidrolisam, a frutano 1-exo-hidrolase (1-FEH) quebra as ligações β (2,1) presentes na inulina e a frutano 6-exo-hidrolase (6-FEH), as ligações β (2,6) dos fleanos ou levanos.

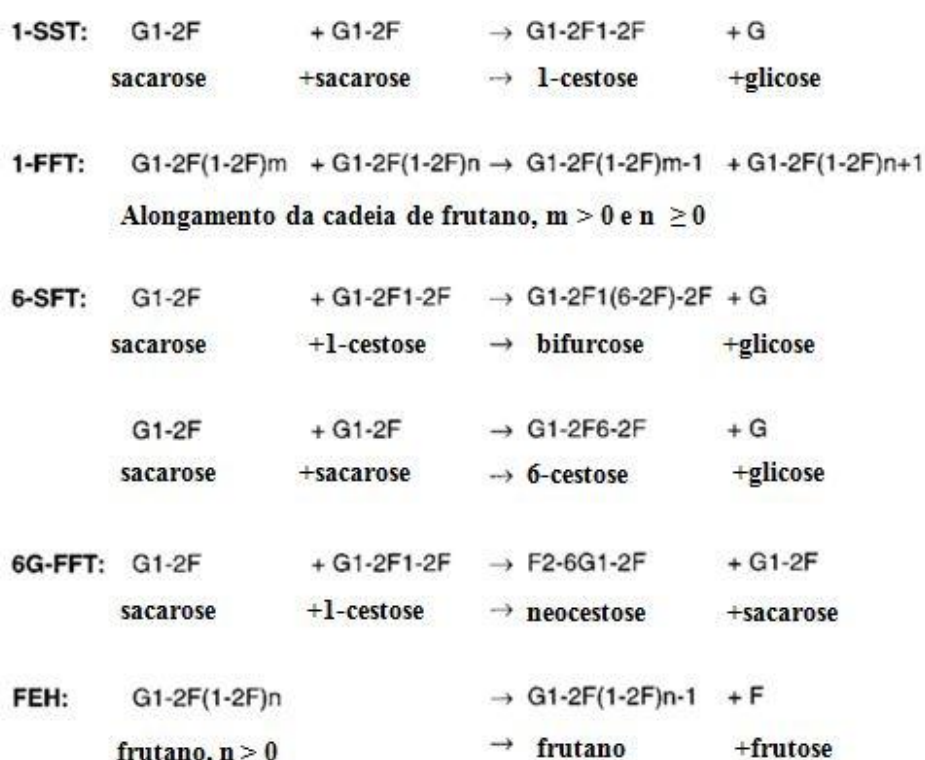


Figura 1. Enzimas envolvidas na síntese e degradação dos diferentes tipos de frutanos. Adaptado de Vijn & Smeekens, 1999.

Em plantas de trigo (*Triticum aestivum*) outros tipos de exohidrolases foram ainda identificados, como a 6,1 frutano exo-hidrolase (6&1-FEH), cuja função é degradar

preferencialmente frutanos do tipo graminano, como o tetrassacarídeo bifurcose (Kawakami et al., 2005) e duas isoenzimas 6-cestose exo-hidrolases (6-KEHs). Como essas KEHs localizam-se provavelmente no apoplasto, é possível que estejam envolvidas na degradação da 6-cestose de origem bacteriana, além de também contribuir, juntamente com as FEHs, para o aumento da tolerância ao frio (Van den Ende et al, 2005). As exohidrolases têm a função de mobilizar os frutanos para produção de energia e estão envolvidas em importantes processos, como osmorregulação e tolerância a estresses abióticos (De Coninck et al., 2007).

Exemplo da tolerância ao frio à seca foi mostrado em plantas de arroz e tabaco modificadas geneticamente para sintetizar frutanos. As primeiras apresentaram maior tolerância quando expostas ao frio do que as não modificadas (Kawakami et al., 2008), enquanto as plantas de tabaco apresentaram elevada taxa de crescimento mesmo sob déficit hídrico (Pilon-Smits et al., 1995). Além da regulação osmótica, a localização dos frutanos nos vacúolos na forma solúvel permite o armazenamento de grandes quantidades de carbono que podem ser disponibilizadas rapidamente (Pollock & Chatterton, 1988), como ocorre no caso de restabelecimento de órgãos aéreos ou em casos de estresses ambientais, como seca (Garcia et al., 2011; Oliveira et al., 2016), frio (Asega et al., 2011) ou fogo (Zaidan & Carvalho, 2011), diferentemente do amido que é armazenado nos plastídeos na forma insolúvel e cuja mobilização é mais lenta. Os frutanos também agem como estabilizadores de membrana em condições de estresse, pela flexibilidade estrutural das ligações glicosídicas que interagem com os lípideos das membranas. Hinch et al. (2007) estudaram o efeito dos frutanos de aveia e centeio em lipossomos isolados e verificaram que frutanos com menores graus de polimerização, por serem mais solúveis, são melhores para a formação do estado vítreo, portanto, mais eficientes na proteção das membranas celulares.

Muitas espécies de Asteraceae que acumulam frutanos do tipo inulina são abundantes no Cerrado (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993) e nos campos rupestres (Joaquim et al., 2017). Para citar alguns exemplos, a fenologia em relação ao acúmulo de frutanos já foi estudada em *Chrysolaena obovata*, citada como *Vernonia herbacea* (Carvalho & Dietrich, 1993; Rigui et al, 2015) e em *Aldama discolor*, citada como *Viguiera discolor* (Isejima & Figueiredo-Ribeiro, 1993), sendo observado um decréscimo considerável no conteúdo de açúcares entre a brotação e a floração nos sistemas subterrâneos dessas espécies. Nos sistemas subterrâneos de *Ichthyothere terminalis* as maiores proporções de frutose total foram detectadas no início do período de chuvas (Almeida et al., 2017) e em *Chresta exsucca*, os níveis mais elevados de fruto-oligossacarídeos foram encontrados nas fases de brotação e senescência dos órgãos aéreos (Santos et al., 2017). A fenologia é o estudo do ciclo de vida recorrente dos seres vivos, especialmente em relação ao ambiente e ao clima. Considerando

que o tempo, a duração e o grau de sincronia de várias fases fenológicas estão relacionados com a estrutura, a função e a regeneração das comunidades, o conhecimento sobre a fenologia das plantas é fundamental para se entender a dinâmica dos ecossistemas e a quantidade e a qualidade dos recursos disponíveis (Williams et al., 1999).

A família Amaranthaceae conta com espécies herbáceas, arbustivas ou subarbustivas distribuídas em áreas tropicais e subtropicais, habitando principalmente ambientes alterados, áridos ou salinos. Amaranthaceae, no sentido amplo, inclui a família Chenopodiaceae, uma vez que numerosos estudos em anatomia, morfologia e fitoquímica entre as duas famílias revelaram várias características comuns (Siqueira, 1991; Kadereit et al., 2003; Judd, et al., 2009). Apresenta 169 gêneros com 2360 espécies, entre as quais 146 são encontradas no Brasil (Judd, et al., 2009). O gênero *Gomphrena* é o mais representativo no país, com cerca de 46 espécies distribuídas principalmente em áreas de caatinga, cerrado e campos rupestres, sendo raras em ambientes florestais. *Gomphrena marginata* é de ocorrência restrita à Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, e apesar de ter sido considerada endêmica da região de campos rupestres de Diamantina (Siqueira, 1991), população desta espécie também foi relatada e identificada na região da Serra de Itacambira (Silva et al., 2013).

Muitas espécies de Amaranthaceae apresentam fotossíntese do tipo C4 (Kadereit et al., 2003; Bena et al., 2017). Em um estudo sobre o mecanismo fotossintético em espécies desta família constatou-se que 109 das 122 espécies de *Gomphrena* analisadas por razão isotópica $\delta^{13}\text{C}$ e anatomia foliar apresentaram este tipo de fotossíntese (Sage et al., 2007); entretanto, *G. marginata* não foi incluída neste estudo. Plantas C4 ocorrem principalmente em regiões quentes e secas e apresentam como primeiro produto estável da fotossíntese um composto formado por quatro carbonos, o ácido oxalacético, que em seguida é descarboxilado pela enzima ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). Esses dois processos bioquímicos são separados em dois compartimentos nas folhas, permitindo que ambas as carboxilações ocorram simultaneamente (Buchanan et al., 2015).

A maioria das espécies C4 apresentam uma anatomia foliar não usual, a anatomia Kranz (Kranz = coroa), na qual os feixes vasculares são envolvidos pelas células da bainha, que apresentam paredes celulares espessas e ausência de espaços intercelulares, que por sua vez são cercadas pelas células radiadas e alongadas do mesofilo. Nestas plantas, o CO_2 é fixado na forma de fosfoenolpiruvato nas células do mesofilo, produzindo ácido oxaloacético pela ação da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP-carboxilase), que é revertido a malato ou aspartato. Estes compostos migram para a bainha do feixe através de plasmodesmas, liberando CO_2 , que serve de substrato para a Rubisco, localizada exclusivamente nos cloroplastos das células da bainha (Heldt & Piechulla, 2011). Em alguns casos, como o da

espécie *Borszczowia ralocaspica* (Chenopodiaceae), a anatomia foliar é igual à de uma planta C3, mas devido ao mecanismo de compartimentalização das enzimas fotossintéticas, é considerada uma planta que possui mecanismo fotossintético C4 (Voznesenskaya et al., 2001). Por possuírem dois diferentes compartimentos de fixação de CO₂, plantas C4 elevam as suas concentrações de CO₂ na bainha dos feixes das folhas e apresentam uma baixa taxa de fotorrespiração, processo em que a Rubisco catalisa a fixação O₂ ao invés de CO₂, diminuindo a taxa fotossintética e a produção de biomassa. Além disso, em plantas C3 a razão de transpiração é de aproximadamente 500 moléculas de água para cada molécula de CO₂ fixada, enquanto em plantas C4 essa razão é de 250, ou seja, possuem uma maior eficiência no uso da água.

Estudos anatômicos com algumas espécies de *Gomphrena* do Cerrado reportaram a presença da anatomia Kranz (Fank-de-Carvalho & Graciano-Ribeiro, 2005; Fank-de-Carvalho et al., 2010) e outras, além da anatomia Kranz apresentaram venações bem desenvolvidas e densas (Handro, 1964; Fank-de-Carvalho & Graciano-Ribeiro, 2005), característica presente também em folhas de plantas C4 (McKown & Dengler, 2010). Kadereit et al. (2003) agrupam as diferentes organizações anatômicas das folhas de Amaranthaceae e Chenopodiaceae e nomeiam 17 tipos, citando o nome do gênero mais representativo, entre as espécies que possuem metabolismo fotossintético C4. Pelo fato de plantas C4 poderem apresentar diferentes tipos de anatomia foliar, a composição isotópica do carbono é utilizada, em conjunto com a anatomia, para indicar a via fotossintética das plantas. Devido à cinética do efeito isotópico da Rubisco, que reage preferencialmente com o ¹²C do que ¹³C, quando comparada com a PEP-carboxilase, a razão ¹²C/¹³C é menor nos produtos da fotossíntese em plantas C3, com valores de -22 a -32 ‰, com uma média de -27 ‰, enquanto para plantas C4 entre -9 a -17 ‰, com uma média de -13‰ (Boutton, 1991).

Poucos são os estudos sobre os carboidratos de reserva nos sistemas subterrâneos em espécies de Amaranthaceae, principalmente nas espécies nativas do Brasil. *Gomphrena marginata*, que cresce em ambiente quente e sujeito à seca estacional, foi escolhida para este estudo por acumular consideráveis quantidades de frutanos nos sistemas subterrâneos (Silva et al., 2013) e por sua distribuição restrita aos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço (Giulietti et al., 2009).

2. Objetivos

Tendo em vista que *Gomphrena marginata* Seub. é listada como espécie rara, endêmica de região específica de campos rupestres, portadora de características que conferem

tolerância a condições ambientais adversas, elevada concentração de frutanos nos seus órgãos subterrâneos e com a possibilidade de apresentar metabolismo fotossintético do tipo C4, o presente trabalho teve por objetivos:

- analisar o metabolismo de frutanos e suas variações em plantas coletadas no seu ambiente natural, nas épocas de seca e de chuvas;
- caracterizar o mecanismo fotossintético nesta espécie.

3. Material e Métodos

3.1 Material vegetal

Plantas de *Gomphrena marginata* Seub. foram coletadas na Serra de Itacambira, que pertence à microrregião de Grão-Mogol, norte de Minas Gerais (Figura 2A, C e D) e sua respectiva exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Botânica (SP 441822). O município de Itacambira faz parte do complexo de campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, possui temperatura média anual de 18,5 °C e altitude média de 1.048 m (Cotrim, 2014). A região de coleta localiza-se na área de preservação ambiental “Conjunto Paisagístico da Serra Resplandecente”, nas coordenadas 16°59’47”S, 43°20’01”W, com uma altitude de 1.266 m.

Foram realizadas seis coletas, em cada uma das quais foram coletados três indivíduos nos seguintes períodos do ano, correspondentes a dois ciclos fenológicos que contemplaram diferentes fases de crescimento e desenvolvimento das plantas:

- ciclo fenológico 1: março, agosto e novembro de 2015, respectivamente fim do período de chuvas (fase de crescimento vegetativo), período de seca (fase de dormência) e início do período de chuvas (fase de brotação). Nestas coletas, o sistema subterrâneo de *G. marginata* foi separado em segmentos mediano e proximal (Figura 2B).
- ciclo fenológico 2: agosto e novembro de 2016 e março de 2017, respectivamente nos períodos de seca (fase de dormência), início das chuvas (fase de brotação) e fim das chuvas (fase de crescimento vegetativo). O sistema subterrâneo de *G. marginata* nestas coletas foi separado em segmentos proximal, mediano e distal (Figura 2B).

Após as coletas, folhas e sistema subterrâneo foram lavados, separados, pesados, congelados em N₂ líquido e mantidos a -80° até a realização das análises bioquímicas. O segmento proximal corresponde à região do sistema subterrâneo mais próxima à parte aérea da planta e consiste majoritariamente de estruturas caulinares, o segmento distal corresponde à região apical do órgão e o segmento mediano corresponde à região entre os segmentos proximais e distais do sistema subterrâneo, consistindo ambos de raízes tuberosas. Para as análises anatômicas, as amostras foram fixadas em fixadores específicos, conforme descrito abaixo.

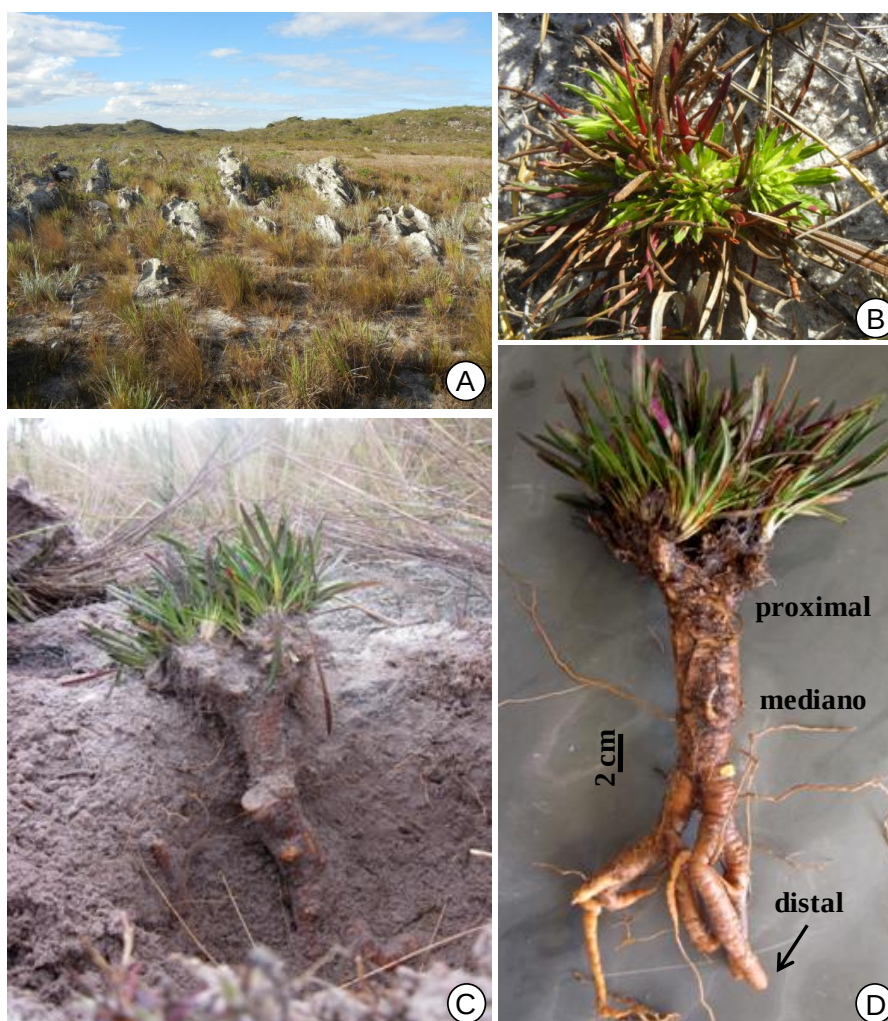


Figura 2. (A) Aspecto geral da área de coleta nos campos rupestres da Serra de Itacambira (MG). (B-D) Plantas de *Gomphrena marginata* em condições de campo em solo arenoso (B-C) e indicações dos segmentos proximal, mediano e distal do sistema subterrâneo (D).

3.2 Condições climáticas nos dois ciclos fenológicos de coleta

Os dados meteorológicos referentes aos anos de 2015 (ciclo fenológico 1) e 2016/2017 (ciclo fenológico 2), foram obtidos no site agritempo (sistema de monitoramento agrometeorológico- <https://www.agritempo.gov.br/agritempo/index.jsp>) e mostram os valores diários de precipitação e as médias diárias de temperaturas mínima e máxima (Figuras 3A e B). Também são apresentados os dados de precipitação mensal e a média mensal de temperaturas mínima e máxima para os dois ciclos estudados (Tabelas 1 e 2).

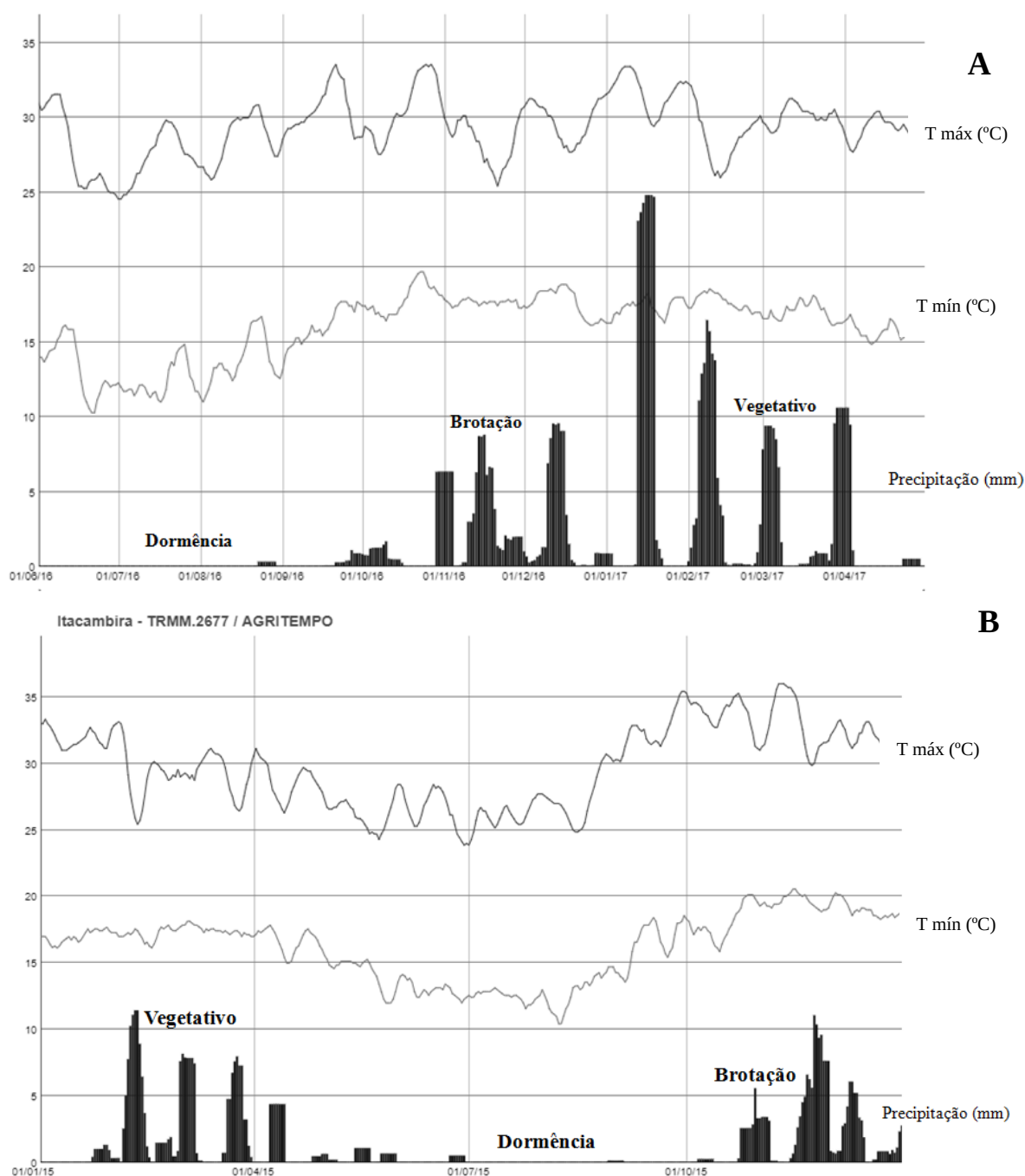


Figura 3. Precipitação diária e temperatura média (T) mínima e máxima diária do município de Itacambira (MG) (www.agritempo.gov.br). (A) Ciclo fenológico 1: janeiro a dezembro de 2015. (B) Ciclo fenológico 2: junho de 2016 a maio de 2017.

Em 2015, março foi o mês de maior precipitação (107,46 mm), quando foi realizada a coleta das plantas na fase de crescimento vegetativo. O período de seca, no qual praticamente não houve precipitação, ocorreu entre junho e setembro (Figura 2A e Tabela 1), sendo a coleta realizada no início de agosto, antes de ocorrerem os pequenos episódios de precipitação do

mês. A última coleta do primeiro ciclo, referente à brotação, foi realizada em novembro, o segundo mês mais chuvoso do ano, com precipitação mensal de 102,09 mm.

A figura 3B e tabela 2 apresentam os dados climáticos do período de junho de 2016 a maio de 2017. A fase de dormência ocorreu entre os meses de junho e setembro, sendo que em junho e julho a precipitação foi zero e nos meses de agosto e setembro a precipitação foi baixa (2,04 e 7,7 mm, respectivamente). A coleta de agosto foi realizada antes das precipitações ocorridas no mês (Figura 3B). A precipitação no mês de novembro foi de 84,4 mm e no mês de março, 127,3 mm, sendo que janeiro e fevereiro foram os meses mais chuvosos do segundo ciclo de coleta. A precipitação total no ciclo 1 foi menor do que no ciclo 2, com 475 mm e 700 mm, respectivamente.

Tabela 1. Médias mensais de temperaturas mínimas e máximas e precipitação total de janeiro a dezembro de 2015, ciclo 1 de coleta. Os meses em que foram realizadas as coletas aparecem em negrito.

Ciclo 1 - 2015			
Mês	Temperatura Mínima (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Precipitação (mm)
Janeiro	15	36	9,03
Fevereiro	15	33	95,94
Março	16	32	107,46
Abril	14	32	34,86
Maio	11	29	11,85
Junho	11	30	3,42
Julho	10	29	0
Agosto	9	32	0,78
Setembro	12	37	0
Outubro	15	36	42,54
Novembro	18	37	102,09
Dezembro	17	35	67,29
Precipitação total:			475,26

Tabela 2. Médias mensais de temperaturas mínimas e máximas e precipitação total de junho de 2016 a maio de 2017, ciclo 2 de coleta. Os meses em que foram realizadas as coletas aparecem em negrito.

Ciclo 2- 2016/2017				
Mês		Temperatura mínima (°C)	Temperatura Máxima (°C)	Precipitação (mm)
Junho	2016	8	33	0
Julho		9	31	0
Agosto		10	32	2,04
Setembro		13	35	7,7
Outubro		15	35	55,9
Novembro		16	33	84,4
Dezembro	2017	15	32	78,4
Janeiro		15	34	173,6
Fevereiro		15	32	139,2
Março		14	32	127,3
Abril		13	31	3,4
Maio		11	30	28,5
Precipitação total:				700,44

Em ambos os ciclos observou-se uma grande amplitude térmica (Tabelas 1 e 2). Em agosto de 2015 a temperatura média mínima mensal foi de 9 °C e a máxima, de 32 °C. No mês de agosto de 2016, as temperaturas médias mínima e máxima foram semelhantes às do ano anterior, com mínima média mensal de 10 °C e máxima, de 32 °C. No primeiro ano de coleta foram registradas temperaturas mais elevadas, principalmente nos meses de setembro e novembro, nos quais a máxima temperatura média mensal foi de 37 °C. Já no ciclo 2, os meses mais quentes foram setembro e outubro, quando foi atingida a temperatura média de 35 °C.

3.2 Métodos

Venação foliar

Folhas foram coletadas e armazenadas em etanol 70%, diafanizadas em hidróxido de sódio 5% e, em seguida, em hipoclorito de sódio 5% (adaptado de Stritmatter, 1973). Posteriormente foram coradas com safranina etanólica 1%, desidratadas em série etanólica e acetato de butila 50 e 100% e montadas em placas de vidro com resina sintética Entellan (Kaiser, 1880).

Anatomia foliar

Amostras de folhas de *G. marginata* foram coletadas e fixadas em FAA 70 (formaldeído, ácido acético glacial e etanol 70%, na proporção 1:1:8 (v:v:v)) (Johansen, 1940), submetidas à bomba de vácuo para retirada do ar contido nos tecidos e mantidas em etanol 70% (Johansen, 1940). Em seguida, as amostras retiradas do terço médio das folhas foram desidratadas em série etílica até 100%, infiltradas e incluídas em resina plástica hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historesin). O material incluído foi seccionado transversalmente a 7 mm de espessura em micrótomo rotativo (Leica RM2245) com navalha descartável. Posteriormente, os cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% (Sakai, 1973) em tampão citrato-fosfato (McIlvaine, 1921) pH 4,5 e montados em resina sintética Entellan para a obtenção de lâminas histológicas permanentes. Cortes à mão foram utilizados para os testes histoquímicos realizados com Sudan IV (Jensen, 1962) para visualização das substâncias lipofílicas, cloreto férrico para compostos fenólicos (Johansen, 1940), lugol (Berlyn & Mikche, 1976) para amido e floroglucina para lignina (Johansen, 1940). A captura de imagens foi realizada em microscópio Olympus BX53 equipado com câmera de vídeo Olympus Q-Color 5, software Pro-Express versão 6.3 (Media Cybernetics).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de folhas foram fixadas em solução de FAA 70 (Johansen, 1940), desidratadas em série etílica e secas pelo método do ponto crítico de CO₂ (Baltec CPD 030) (Horridge & Tamm, 1969). Em seguida, as amostras foram montadas sobre suportes de alumínio e submetidas a banho de ouro (Baltec SCD 050). As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura modelo Philips XL Series XL 20.

Discriminação isotópica do ¹³C

Amostras de folhas de 3 indivíduos de foram secas, moídas e oxidadas. A abundância relativa produzida de ¹³C e ¹²C foi analisada em espectrômetro de massa no Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

Extração e análise de carboidratos solúveis

Para as extrações de carboidratos foi utilizado material liofilizado a partir de aproximadamente 3g de massa fresca de cada segmento do sistema subterrâneo (proximal, mediano e distal) e das folhas. As amostras foram homogeneizadas em etanol 80% e submetidas à extração em banho-maria a 80°C por 15 min, sendo então centrifugadas a 700 g por 15 min. O procedimento foi repetido mais duas vezes. Os resíduos finais foram submetidos a duas extrações aquosas em banho-maria a 60°C por 30 min e filtrados a vácuo

em tecido de algodão. Os sobrenadantes etanólicos e os filtrados aquosos dos sistemas subterrâneos foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório, assim como também as amostras dos extratos de folhas. O extrato final dos sistemas subterrâneos, denominado aqui de extrato bruto, foi submetido à precipitação a frio com três volumes de etanol durante uma noite, seguido de centrifugação a 900 *g* por 15 min a 5 °C para separação das frações de fruto-oligo e fruto-polissacarídeos. O sobrenadante, contendo os fruto-oligossacarídeos, foi concentrado em evaporador rotatório, e o precipitado, que constitui a fração de fruto-polissacarídeos, foi ressuspenso e solubilizado em água. O conteúdo de frutose total, livre e ligada (frutanos), de ambas as frações e nos extratos brutos foi estimado pelo método de antrona modificado para a detecção de cetoses (Jermyn, 1956), obtendo-se a leitura da absorbância em 620 nm em espectrofotômetro.

O conteúdo de açúcares redutores foi determinado nos extratos de folhas e nos extratos brutos dos sistemas subterrâneos de acordo com o método Somogyi-Nelson (Somogyi, 1945) e a quantificação dos açúcares solúveis totais foi realizada através do método do fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956), sendo a absorbância obtida em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 540 nm e 490 nm, respectivamente. Para todas as determinações colorimétricas utilizou-se frutose como padrão.

Para as análises qualitativas os extratos brutos foram submetidos à deionização em colunas de troca iônica, contendo resinas nas formas catiônica (Dowex 50 WX8 - 100) e aniônica (Dowex 1 X 8 -100) (Carvalho & Dietrich, 1993). As amostras deionizadas foram filtradas em membranas de 0,45 µm e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em cromatógrafo DIONEX, modelo ICS 3000, em coluna CarboPac PA-1 (2 X 250 mm nas análises no ciclo fenológico 1 e 4X 250 mm nas análises do ciclo fenológico 2), na concentração de 400 µg mL⁻¹. Para separação cromatográfica dos açúcares dos extratos foliares, foi aplicado um método isocrático, utilizando 100 mM de hidróxido de sódio como eluente. Os açúcares dos extratos deionizados do sistema subterrâneo foram separados utilizando-se um gradiente da mistura dos eluentes A (150 mM de hidróxido de sódio) e B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio), com a seguinte programação: 0-2 min, 25 mM; 2,1-8,5 min, 50 mM; 8,6-10 min, 75 mM; 10,1-28 min, 100 mM; 28,1-30 min, 500 mM; 30,1-40 min, 25 mM (Asega et al., 2008). Foram utilizados como padrões, os açúcares mio-inositol, manitol, glicose, frutose, sacarose, 1-cestose, 6-cestose e nistose, além de frutanos da série da inulina extraídos de tubérculos de *Helianthus tuberosus* e frutanos da série dos levanos, extraídos de raízes tuberosas de *Gomphrena macrocephala*.

Extração enzimática

Foram utilizados aproximadamente 8g de massa de matéria fresca de cada segmento do sistema subterrâneo para as extrações enzimáticas. Toda metodologia de extração e determinação das atividades enzimáticas foi realizada de acordo com Asega e Carvalho (2004) com algumas modificações ajustadas ao material vegetal em estudo. O material foi homogeneizado em tampão citrato-fosfato (McIlvaine) 50 mM pH 5,5, contendo 2 mM de EDTA, 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β -mercaptoetanol e 10% de polivinil polipirrolidona (PVPP). O homogeneizado foi mantido em repouso por 30 min e, em seguida, filtrado em nylon duplo e submetido à precipitação com sulfato de amônio a 20% de saturação. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 12000 g por 20 min. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio para obter 80% de saturação. A mistura foi mantida em repouso por 30 min e após, foi centrifugada por 20 min a 17000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado no tampão de extração, dessalinizado em colunas de Bio Gel P-6 DG e submetido aos ensaios de atividade enzimática. Toda a manipulação do material durante a extração foi realizada a 5 °C.

O conteúdo de proteína nos extratos foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão e a absorbância obtida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595 nm.

Ensaio enzimáticos

Para os ensaios enzimáticos, as incubações foram constituídas do extrato enzimático e substrato específico para cada enzima, na proporção de 1:1 (v/v). Para a SST utilizou-se como substrato a sacarose na concentração final de 100 mM, e a atividade foi determinada pela quantificação da 1-cestose produzida durante a incubação. Para a FFT utilizou-se como substrato a 1-cestose na concentração de 250 mM, determinando-se a atividade pela quantificação do tetrassacarídeo nistose formado, e para a FEH, foi utilizada uma solução de frutanos de *G. marginata* na concentração final de 5%, determinando-se a atividade pela quantificação da frutose liberada na mistura de incubação. Para análise da especificidade da FEH foram utilizadas amostras de *Gomphrena marginata* coletadas na fase de brotação e incubadas com diferentes substratos; 1-cestose (250 mM), nistose (100 mM), inulina de *Helianthus tuberosus* (5%) e levano de *Gomphrena macrocephala* (5%). Os frutanos de *G. marginata* e *G. macrocephala* foram extraídos e purificados a partir dos sistemas subterrâneos dessas plantas especificamente para esses ensaios. Todos os substratos foram preparados em tampão Mc Ilvaine, 50 mM, em pH 5,5. Os extratos foram incubados a 30 °C e o tempo de

incubação foi de 2 h para todas as enzimas. As reações enzimáticas foram interrompidas por fervura em banho-maria durante 5 min.

Amostras das misturas de incubação foram diluídas 10 vezes em água deionizada e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema de cromatografia Dionex modelo ICS 3000, utilizando-se coluna CarboPac PA-1 (2 x 250 mm e 4x 250mm). A eluição dos produtos de incubação foi feita em 150 mM de hidróxido de sódio (eluente A) e gradiente de acetato de sódio, utilizando-se 500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio (eluente B) na mesma programação descrita anteriormente. As quantificações de frutose, 1-cestose e nistose foram obtidas pelas áreas dos picos, utilizando-se padrões externos.

Teor de umidade do solo e das plantas

Amostras de solo foram coletadas no campo, próximo à rizosfera das plantas e analisadas quanto ao teor de umidade. Imediatamente após as coletas, as amostras foram condicionadas e hermeticamente fechadas em recipientes apropriados. As amostras foram pesadas para obtenção da massa fresca (MF) e, em seguida, levadas à estufa a 70°C até peso constante, para determinação da massa seca (MS). O teor de água no solo (U%) foi determinado por meio da seguinte equação:

$$U(\%) = [(MF-MS)/MS] \times 100$$

Os teores de água das folhas e do sistema subterrâneo também foram determinados pelo método gravimétrico. As amostras foram pesadas logo após coleta, para obtenção do peso fresco, e pesadas novamente depois de liofilizadas, para determinação da massa seca.

Potencial osmótico (Ψ_s) dos sistemas subterrâneos

Medidas de potencial osmótico foram realizadas a partir do suco celular retirado de cada segmento do sistema subterrâneo com auxílio de um espremedor manual, utilizando osmômetro de pressão de vapor (modelo 5520 VAPRO, Wescor, Logan-UTAH). O cálculo do potencial osmótico foi feito por meio da equação de Van't Hoff:

$$\Psi_s \text{ (MPa)} = -c \text{ (mOsmol Kg}^{-1}\text{)} \times 2,58/1000,$$

onde c é a osmolaridade e Ψ_s , o potencial osmótico.

As análises de potencial osmótico e teor de umidade do solo foram realizadas somente para as coletas do ciclo fenológico 2.

Análise de dados

Os dados das análises bioquímicas como, conteúdo de carboidratos e atividades enzimáticas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a média dos valores comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. Foi utilizado o programa estatístico Sisvar 5.6.

4. Resultados

4.1 Fenologia

No período de chuvas, entre janeiro e março, as plantas de *Gomphrena marginata* se encontram em fase de crescimento vegetativo, apresentando folhas bem desenvolvidas (Figura 4A). Na fase de dormência, entre junho e agosto, parte das folhas senescem ou apresentam coloração roxa, mas as plantas não perdem totalmente a parte aérea no período de seca (Figura 4B). No início das chuvas, entre outubro e novembro, as plantas apresentam inúmeros brotos (Figura 4C), precedendo as fases de floração e frutificação, em dezembro.

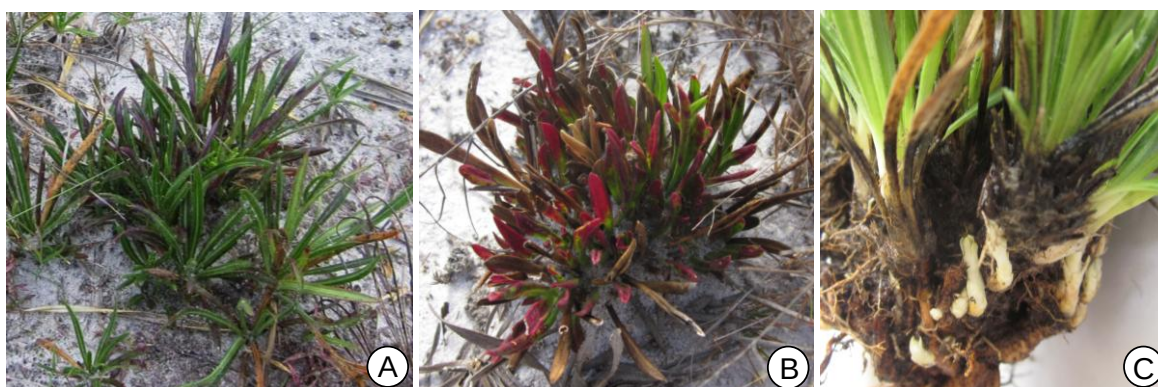


Figura 4. Plantas de *Gomphrena marginata* nas fases (A) vegetativa, (B) dormência e (C) brotação.

4.2 Status hídrico das plantas e do solo

O teor de água nas folhas foi menor na fase de dormência, durante o período de seca, em ambos os ciclos estudados, em comparação com a brotação, no início do período de chuvas. O teor de água das folhas na fase de crescimento vegetativo não foi estatisticamente diferente do verificado nas outras fases (Figura 5).

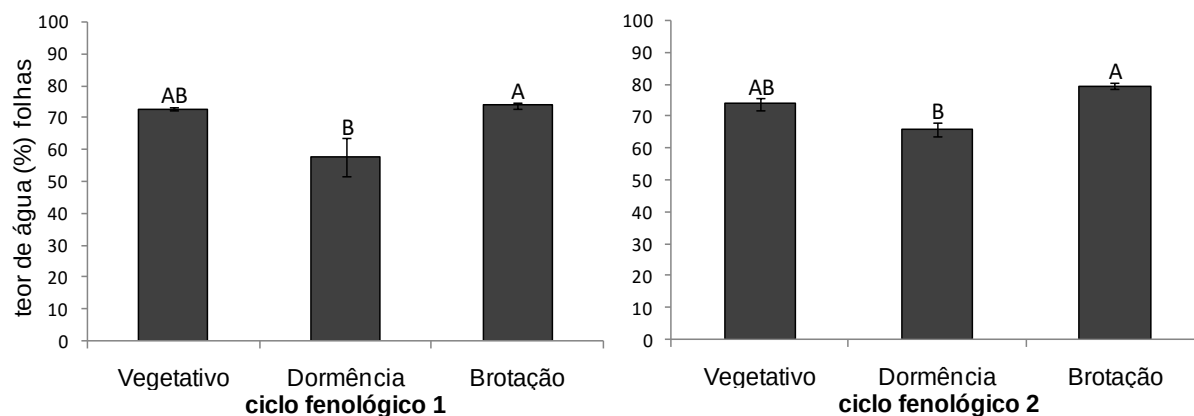


Figura 5. Teor de água em folhas de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo (fim das chuvas), dormência (seca) e brotação (início das chuvas) em dois ciclos fenológicos. As barras representam $\pm$ o erro padrão ($n=3$). Letras comparam o teor de água entre as fases fenológicas ($p<0,05$).

Nos sistemas subterrâneos, o teor de água foi de aproximadamente 70% e se manteve praticamente constante em todas as fases fenológicas (Figura 6). No segundo ciclo, o teor de água no segmento distal foi estatisticamente mais baixo na dormência em comparação à fase de brotação.

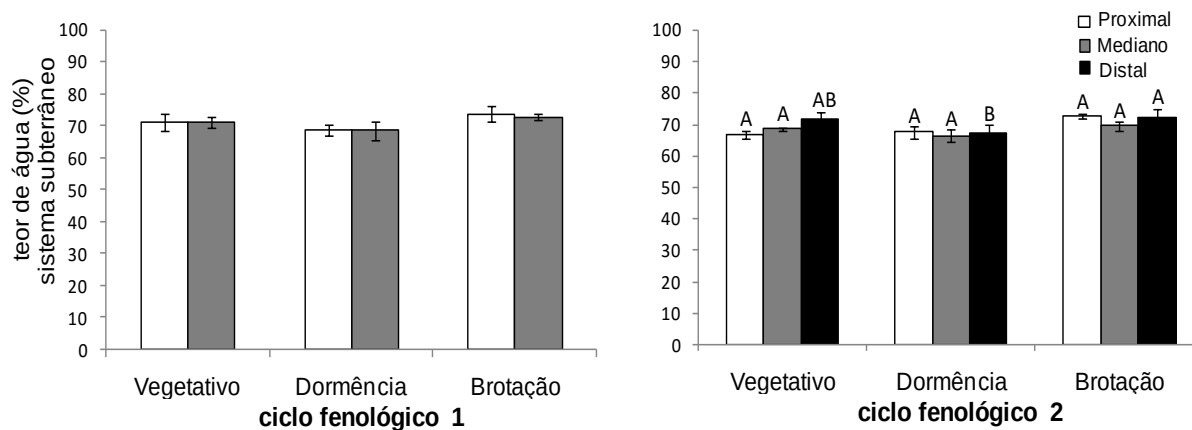


Figura 6. Teor de água dos sistemas subterrâneos (segmentos proximal, mediano e distal) de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo (fim das chuvas), dormência (seca) e brotação (início das chuvas) em dois ciclos fenológicos. As barras representam $\pm$ o erro padrão ($n=3$). Letras maiúsculas comparam o teor de água de cada tipo de segmento entre as fases fenológicas e barras sem letras não apresentaram diferença estatística significativa ($p<0,05$).

O teor mais baixo de umidade do solo na rizosfera foi de aproximadamente 0,6 % no período de seca, e o teor mais elevado foi de 5%, no final do período de chuvas (Figura 7).

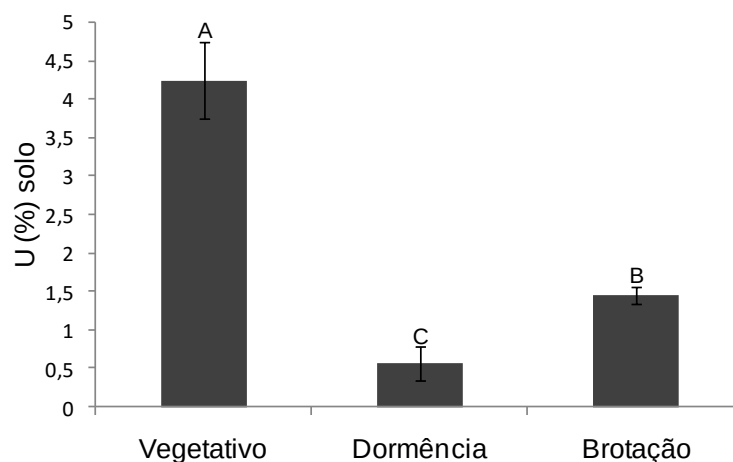


Figura 7. Teor de umidade do solo na rizosfera de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo (fim das chuvas), dormência (seca) e brotação (início das chuvas) no ciclo fenológico 2. As barras representam $\pm$ o erro padrão ($n=3$). Letras comparam a umidade do solo entre as fases fenológicas ($p<0,05$).

O potencial osmótico do suco celular extraído do sistema subterrâneo apresentou valores mais negativos, aproximadamente -1MPa, em plantas coletadas na fase de dormência. O segmento proximal de plantas na brotação foi o que apresentou potencial osmótico mais alto, em torno de -0,6 MPa, em relação aos demais segmentos e fases analisadas (Figura 8).

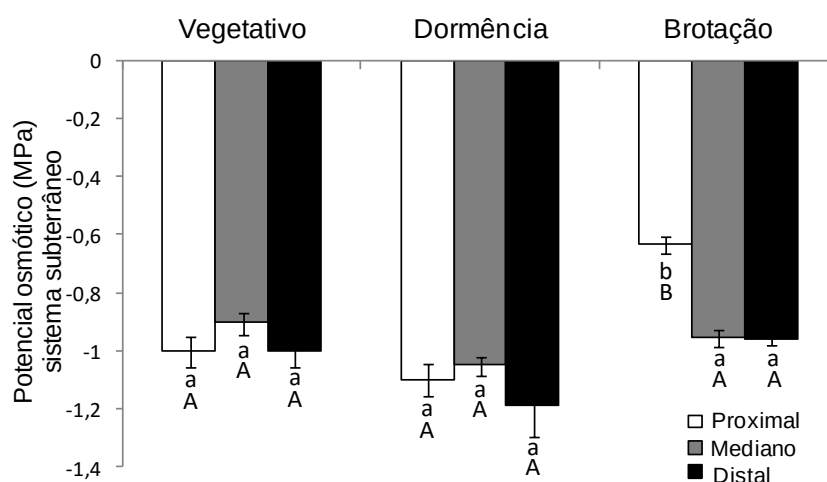


Figura 8. Potencial osmótico (Ψ_s) do suco celular dos sistemas subterrâneos (segmentos proximal, mediano e distal) de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo (fim das chuvas), dormência (seca) e brotação (início das chuvas) do ciclo fenológico 2. As barras representam $\pm$ o erro padrão ($n=3$). Letras maiúsculas comparam o potencial osmótico de cada tipo de segmento entre as fases fenológicas e letras minúsculas comparam o potencial osmótico entre os segmentos (proximal, mediano e distal) dentro de cada fase fenológica ($p<0,05$).

4.3. Folhas

Venação foliar

Folhas de *Gomphrena marginata* (Figura 9A) apresentam venação primária pinada (Figura 9B) e secundária camptódroma do tipo broquidódroma simples, com espaçamento que aumenta e angulação que diminui em direção à base (Figura 9B e C). As nervações terciárias são reticuladas que se anastomosam, com angulação inconsistente (Figura 9C e D). As aréolas são bem desenvolvidas e as vênulas terminais livres vão desde não ramificadas ou apresentam uma, duas ou mais ramificações (Figura 9C e D). A venação última marginal se apresenta fimbriada (Figura 9C). No terço basal a venação é justaposta e paralela (Figura 9E) e as nervuras se afastam à medida que atingem o ápice da folha. A ocorrência de tricomas tectores é abundante na base foliar (Figura 9F).



Figura 9. Folhas de *Gomphrena marginata*. (A) *In vivo*. (B-E) Folhas diafanizadas e coradas com safranina. (B) Aspecto geral da folha apresentando venação primária pinada. (C) Ápice foliar. Setas indicam a venação secundária do tipo broquidódroma simples. (D) Detalhes das aréolas e das vênulas terminais livres da região mediana da folha (setas). (E) Detalhes da venação do terço basal. (F) Microscopia eletrônica de varredura da base foliar mostrando numerosos tricomas tectores. Barras: 1 cm (A-B), 50 μm (C), 100 μm (D e E) e 1 mm (F).

Anatomia foliar

Gomphrena marginata apresenta folha anfiestomática (Figura 10A e B), com tricomas tectores em ambas as superfícies (Figura 10C). A epiderme é unisseriada (Figura 10C-E) constituída por células com paredes anticlinais onduladas (Figura 10A e B) e revestida por uma cutícula delgada, evidenciada com Sudan IV (Figura 10F). Algumas células epidérmicas apresentam parede periclinal externa espessada (Figura 10D-E), principalmente na região do bordo (Figura 10D). O mesofilo é dorsiventral (Figura 10D e E) e o parênquima paliçádico é composto por uma camada de células dispostas perpendicularmente à superfície adaxial e outra camada disposta radialmente aos feixes vasculares. O parênquima lacunoso é constituído por duas a três camadas de células grandes e irregulares (Figura 10E). A nervura central apresenta colênquima anelar em ambas as faces e possui um feixe central do tipo

colateral de maior calibre, envolvido por uma bainha esclerenquimática (Figura 10C-D) e dois feixes acessórios laterais. Os feixes vasculares laterais também são do tipo colateral e possuem bainha parenquimática completa e lignificada (Figura 10E). Grande concentração de amido pode ser observada nas bainhas dos feixes vasculares (Figura 10G).

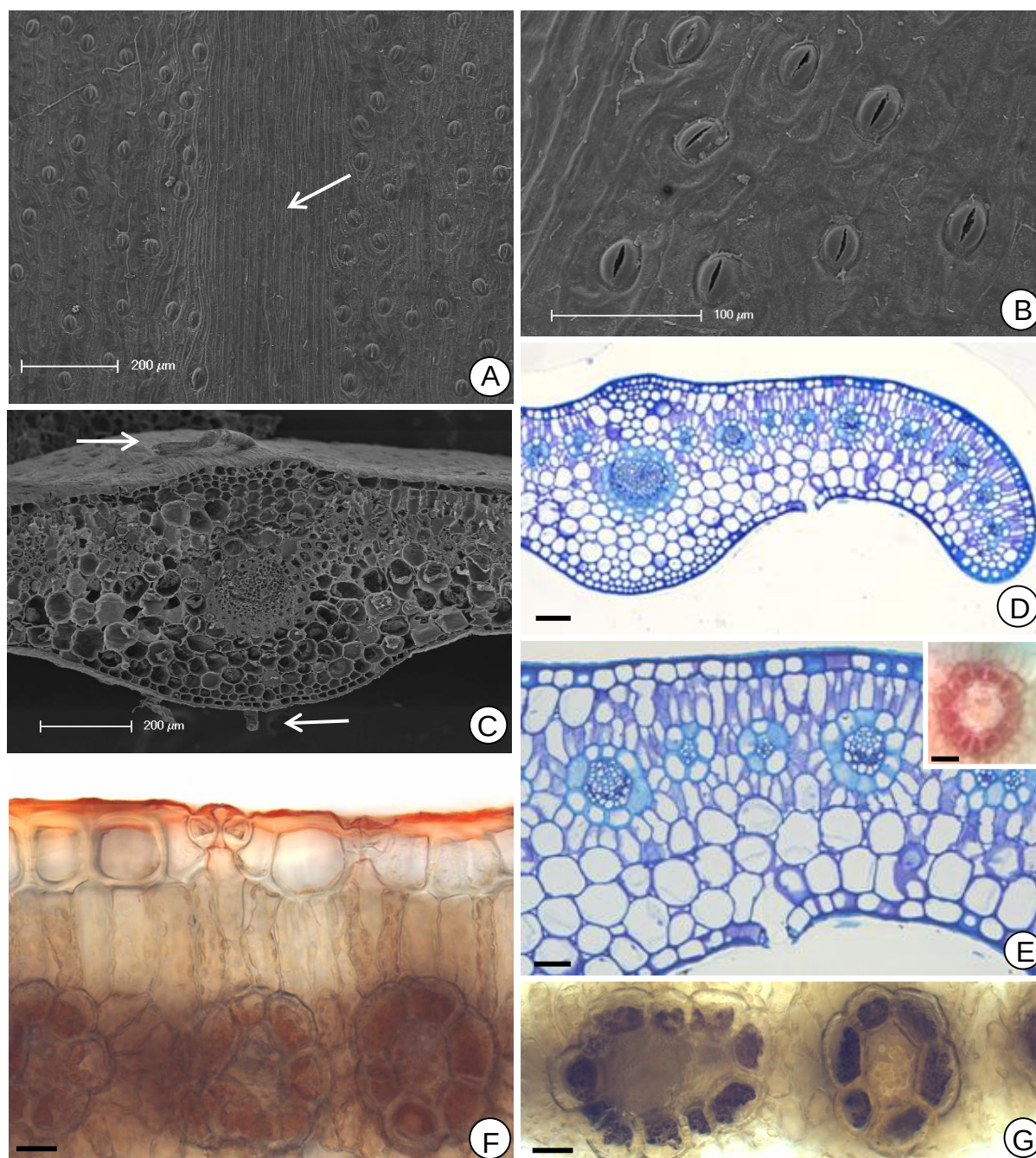


Figura 10. Lâmina foliar de *Gomphrena marginata*. (A-B) Superfícies adaxial e abaxial da epiderme foliar, respectivamente, mostrando a nervura central (seta) e estômatos, observados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). (C-G) Secções transversais. (C) Corte transversal da região da nervura central, observado em MEV, com tricomas tectores (setas) em ambas as superfícies foliares. (D) Aspecto geral da lâmina foliar. (E) Região entre bordo e nervura central mostrando a disposição radiada do parênquima paliçádico em relação aos feixes vasculares (anatomia Kranz) e a bainha do feixe com parede celular lignificada (detalhe). (F) Lâmina foliar corada com Sudan IV evidenciando a espessura da cutícula. (G) Grãos de amido nas células da bainha do feixe vascular evidenciados por lugol. Barras: 200 μm (A e C), 100 μm (B e D), 50 μm (E), 25 μm (F e G).

Discriminação isotópica do $\delta^{13}\text{C}$

A análise da discriminação isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ mostrou um valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ de $-14,2\text{‰} \pm -0,19\text{‰}$ em folhas de *G. marginata*. Este valor encontra-se dentro dos limites de valores de discriminação de plantas C4 (-9 a -17‰) ou CAM (-14 a -33‰) (Szarek & Troughton, 1976).

Análise de carboidratos

No primeiro ciclo fenológico, o teor de carboidratos solúveis totais nas folhas foi menor na fase de dormência, durante a seca, do que nas fases de brotação e crescimento vegetativo, períodos chuvosos. O teor de açúcares redutores na dormência também foi menor em comparação ao encontrado na fase de crescimento vegetativo (Figura 11A). No segundo ciclo analisado, houve diferença estatisticamente significativa somente entre os conteúdos de açúcares redutores, mais elevados na fase de brotação (Figura 11B). Em ambos os ciclos fenológicos, os açúcares solúveis das folhas foram identificados como mio-inositol, glicose e frutose, sendo a glicose e o mio-inositol os açúcares majoritários (Figura 12). No primeiro ciclo a proporção de mio-inositol permaneceu semelhante nas três fases analisadas, enquanto no segundo, este açúcar apresentou menor proporção na fase de crescimento vegetativo. Em ambos os ciclos verificou-se uma proporção mais elevada de glicose na brotação.

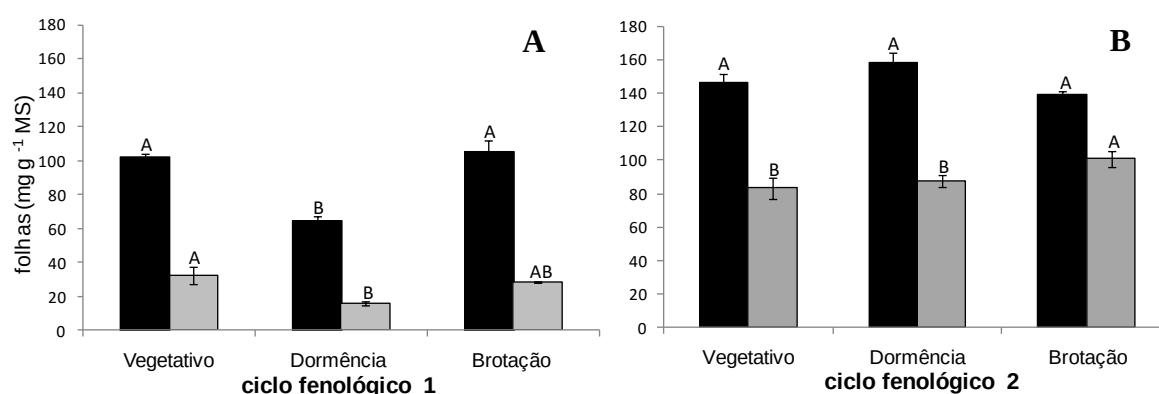


Figura 11. Conteúdo de açúcar solúvel total (barras pretas) e açúcar redutor (barras cinza) em folhas de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo (fim das chuvas), dormência (seca) e brotação (início das chuvas) nos ciclos fenológicos 1 (A) e 2 (B). As barras representam $\pm$ o erro padrão ($n = 3$). Letras comparam o teor de açúcares entre as fases fenológicas ($p < 0,05$).

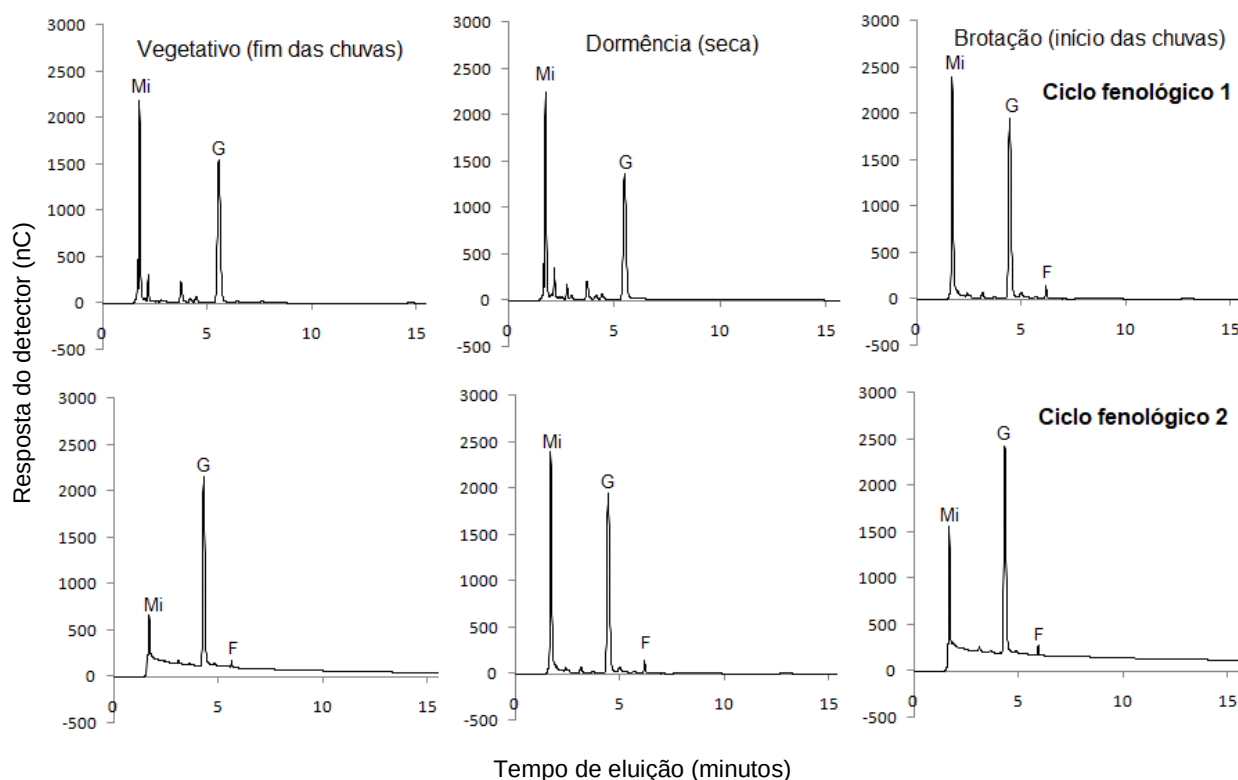


Figura 12. Perfil de carboidratos solúveis por HPAEC/PAD de folhas de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo (fim das chuvas), dormência (seca) e brotação (início das chuvas) em dois ciclos fenológicos. (Mi) mio-inositol, (G) glicose, (F) frutose,

4.4. Sistema subterrâneo

Análise de carboidratos

No ciclo fenológico 1, o conteúdo de frutose total nos extratos brutos dos diferentes segmentos do sistema subterrâneo não apresentou diferença entre as fases estudadas. Porém, houve diferença significativa entre os segmentos proximal e mediano na fase de brotação (Figura 13A). No ciclo fenológico 2, o conteúdo de frutose no extrato bruto, na fase de brotação, foi significativamente inferior no segmento proximal tanto entre as fases fenológicas, como entre os três segmentos analisados (Figura 8B). Na fase de crescimento vegetativo, o conteúdo de frutose foi significativamente mais elevado no segmento mediano, seguido pelo distal e em seguida, pelo proximal (Figura 13B). Nas frações fruto-oligossacarídeos, no ciclo 1, as plantas do período de seca (dormência) apresentaram maiores teores de frutose, mas somente o segmento mediano apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao vegetativo (Figura 13C). No ciclo 2 não houve diferença significativa entre as fases fenológicas, somente entre os segmentos proximal e mediano na fase de brotação, sendo mais elevado no segmento mediano do que no proximal (Figura 13D).

Nas frações fruto-polissacarídeos não houve diferença entre as fases fenológicas em nenhum dos ciclos analisados (Figura 13E e F). No segundo ciclo, o segmento proximal apresentou menores teores em relação ao segmento mediano em todas as fases (Figura 13F).

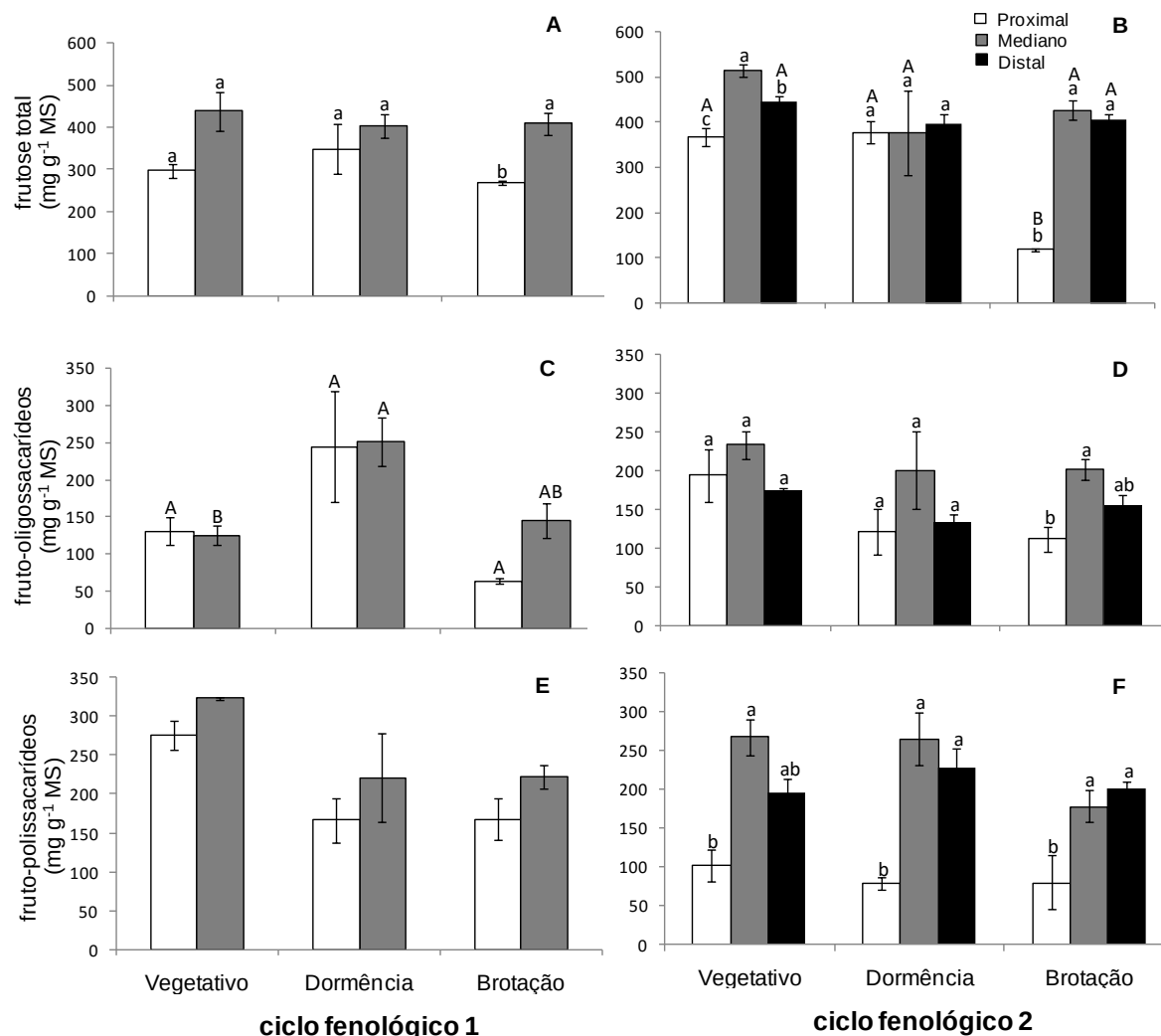


Figura 13. Conteúdo de frutose total nos extratos brutos (A, B), nas frações de oligossacarídeos (C, D) e polissacarídeos (E, F) dos sistemas subterrâneos (segmentos proximal, mediano e distal) de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo (fim das chuvas), dormência (seca) e brotação (início das chuvas) em dois ciclos fenológicos. As barras representam $\pm$ o erro padrão ($n=3$). Letras maiúsculas comparam o conteúdo de frutose total entre as fases fenológicas e letras minúsculas comparam o conteúdo de frutose total entre os segmentos (proximal, mediano e distal) dentro de cada fase fenológica ($p<0,05$) e (E) não apresentou diferença estatística.

A razão fruto-oligosacarídeos: fruto-polissacarídeos no primeiro ciclo fenológico foi maior na dormência, em ambos os segmentos. Comparando-se os dois segmentos no ciclo 1,

essa razão foi mais elevada no segmento proximal, nas fases de crescimento vegetativos e de dormência, o inverso ocorrendo na fase brotação. No segundo ciclo esta razão foi maior no segmento proximal em todas as fases, mas principalmente na vegetativa. Verificou-se também que a razão tendeu a diminuir em direção ao segmento distal do sistema subterrâneo (Figura 14).

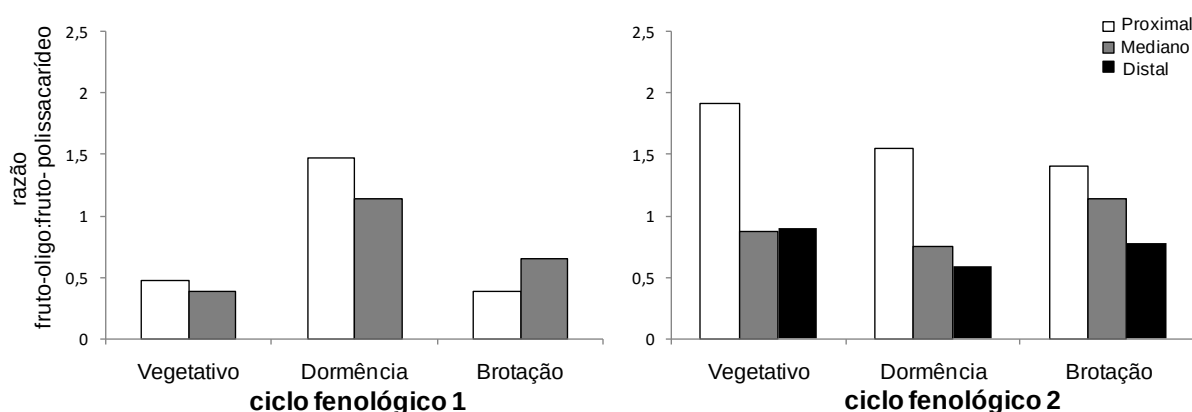


Figura 14. Razão fruto-oligosacarídeos:fruto-polissacarídeos nos sistemas subterrâneos (segmentos proximal, mediano e distal) de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo (fim das chuvas), dormência (seca) e brotação (início das chuvas) em dois ciclos fenológicos 1 e 2.

Os açúcares solúveis totais foram quantificados em todas as amostras analisadas, porém, como o conteúdo de frutose total é muito semelhante ao conteúdo de açúcar solúvel total, conforme o esperado de um carboidrato de reserva que consiste de um polímero de frutose, somente os resultados referentes ao ciclo 1 são apresentados. Nos extratos brutos, o segmento mediano apresentou maiores teores de açúcares solúveis totais em relação ao proximal, com diferença significativa na fase de crescimento vegetativo (Figura 15A). Na fração oligossacarídeos, o segmento mediano na fase de dormência, apresentou maiores conteúdos de açúcares em comparação com o período vegetativo (Figura 15B). Na fração polissacarídeos não houve diferença significativa nem entre os segmentos e nem entre as fases fenológicas (Figura 15C).

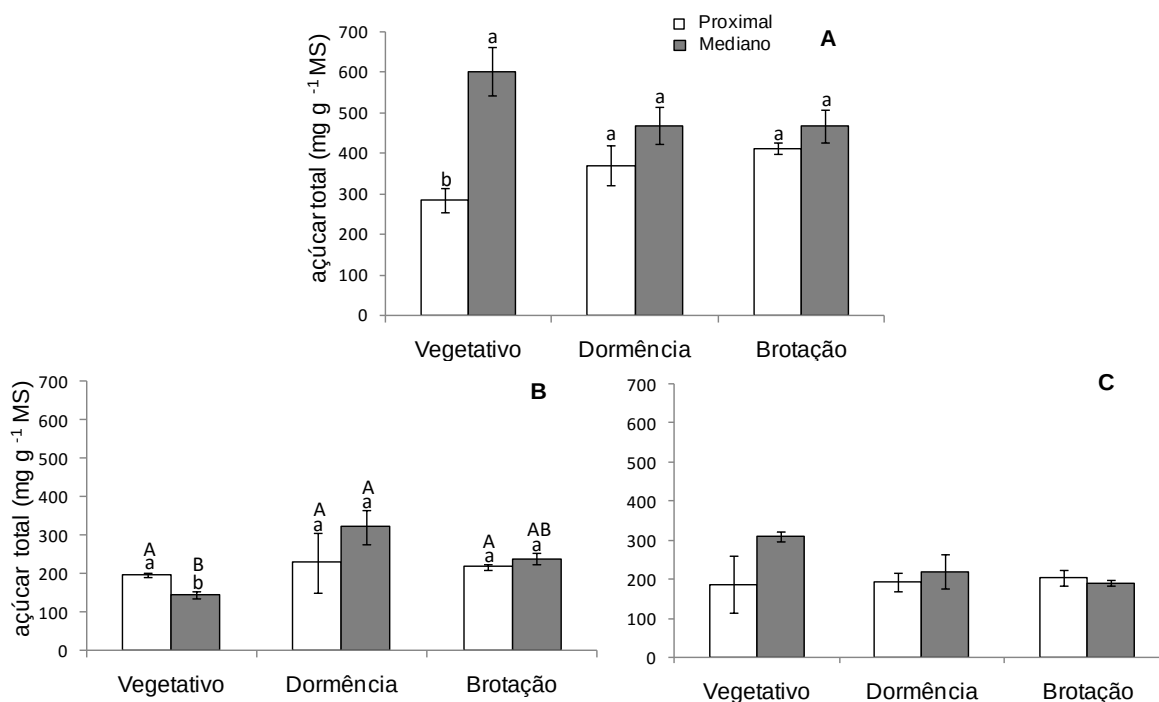


Figura 15. Conteúdo de açúcar solúvel total nos extratos brutos (A), nas frações de oligossacarídeos (B) e polissacarídeos (C) dos sistemas subterrâneos (segmentos proximal e mediano) de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo (fim das chuvas), dormência (seca) e brotação (início das chuvas) do ciclo fenológico 1. As barras representam $\pm$ o erro padrão ($n=3$). Letras maiúsculas comparam o conteúdo de açúcar total entre as fases fenológicas e letras minúsculas comparam o conteúdo de açúcar total entre os segmentos (proximal e mediano) dentro de cada fase fenológica e barras sem letras não apresentaram diferença estatística significativa ($p<0,05$)

As variações nos teores de açúcares redutores não foram estatisticamente significativas no ciclo fenológico 1 (Figura 16A). Já no ciclo 2, os teores foram mais elevados na fase de brotação, em comparação à fase de crescimento vegetativo, em todos os segmentos analisados, e somente no proximal em comparação à fase de dormência (Figura 16B).

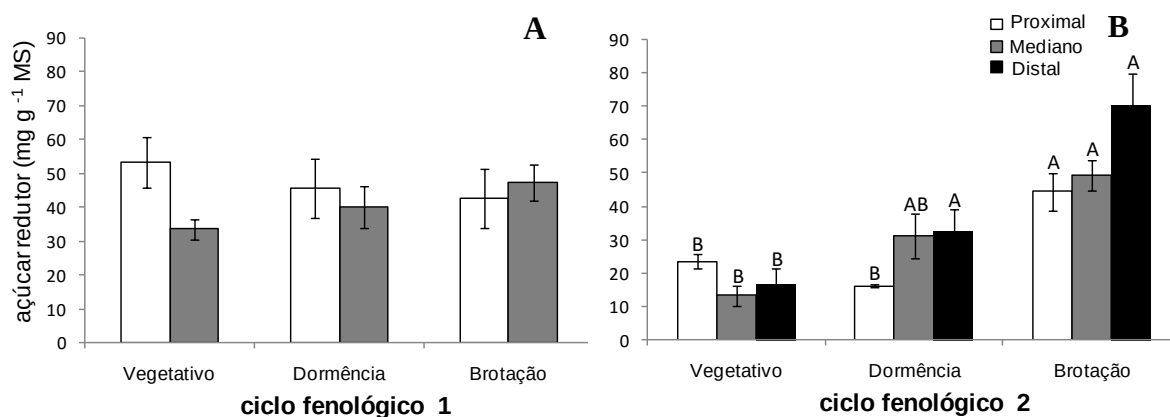


Figura 16. Conteúdo de açúcar redutor nos extratos brutos dos sistemas subterrâneos (segmentos proximal, mediano e distal) de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo (fim das chuvas), dormência (seca) e brotação (início das chuvas) em dois ciclos fenológicos. As barras representam $\pm$ o erro padrão ($n=3$). Letras maiúsculas comparam o conteúdo de açúcar redutor entre as fases fenológicas e barras sem letras não apresentaram diferença estatística significativa ($p<0,05$).

As análises qualitativas dos carboidratos solúveis por HPAEC/PAD revelaram, em praticamente todas as fases fenológicas, a presença de mio-inositol, manitol, glicose, frutose, sacarose, 1-cestose, 6-cestose, nistose e frutanos com grau de polimerização maior que quatro (Figuras 17 e 18). Nos perfis cromatográficos foi detectada a série homóloga de frutanos em todas as fases fenológicas, nos dois ciclos de coleta. Na fase de crescimento vegetativo do ciclo fenológico 1, observou-se uma menor proporção de polissacarídeos em relação aos componentes de menor tamanho molecular, no segmento proximal em relação ao mediano. Na fase de dormência observou-se uma maior proporção de açúcares álcoois e hexoses e na fase de brotação maior proporção de frutose em ambos os segmentos (Figura 17). No ciclo 2, observou-se uma maior proporção de açúcares álcoois, glicose, frutose e sacarose no segmento proximal em relação ao mediano e distal, no período vegetativo. Na fase de brotação observou-se também maior proporção destes açúcares, além do tetrasacarídeo nistose (Figura 18).

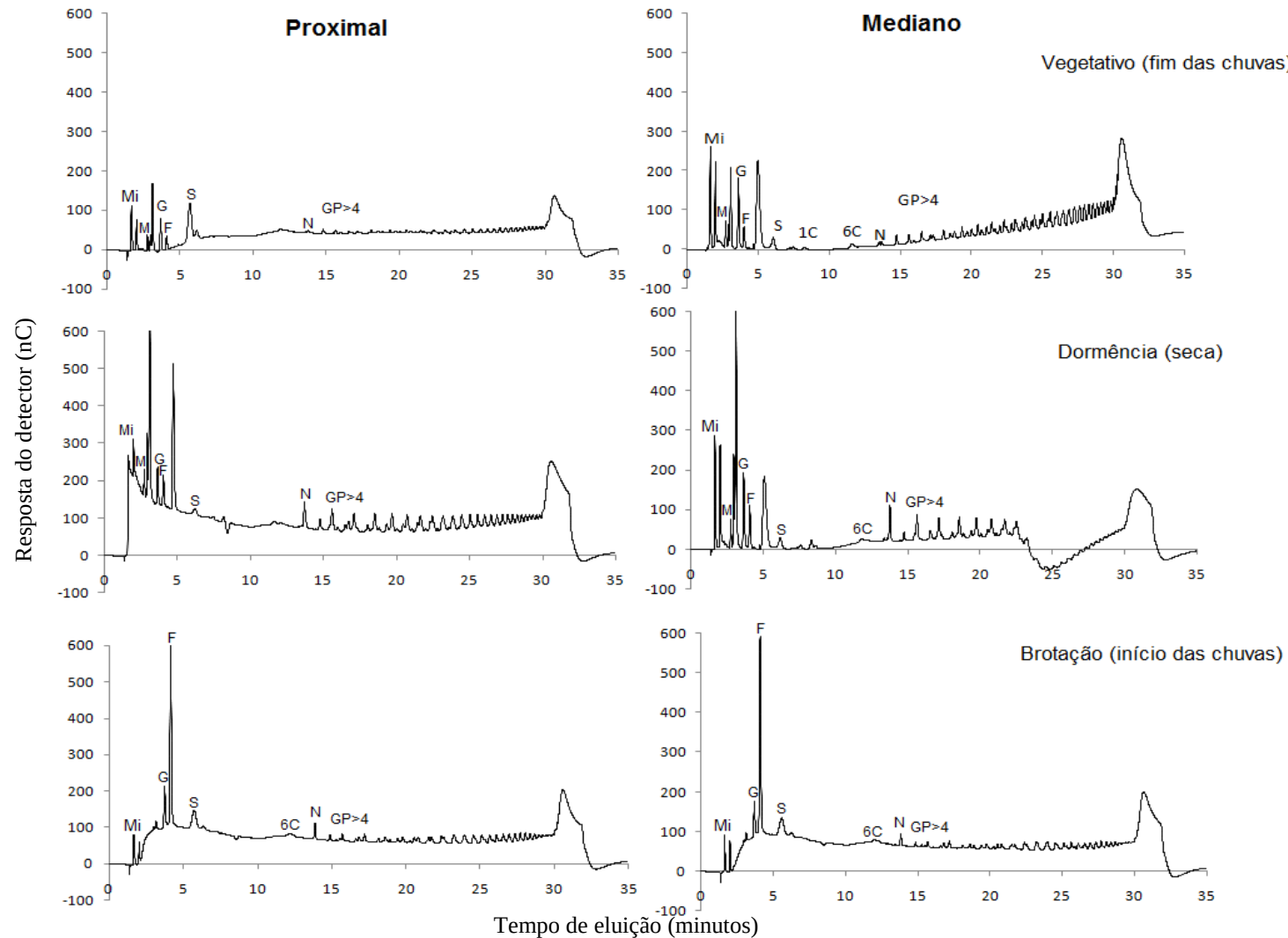


Figura 17. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD de carboidratos solúveis dos extratos brutos dos segmentos proximal (primeira coluna) e mediano (segunda coluna) de órgãos subterrâneos de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo, dormência e brotação do ciclo fenológico 1. (Mi) mio-inositol. (M) manitol, (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (1C) 1-cestose, (6C) 6-cestose e (N) nistose.

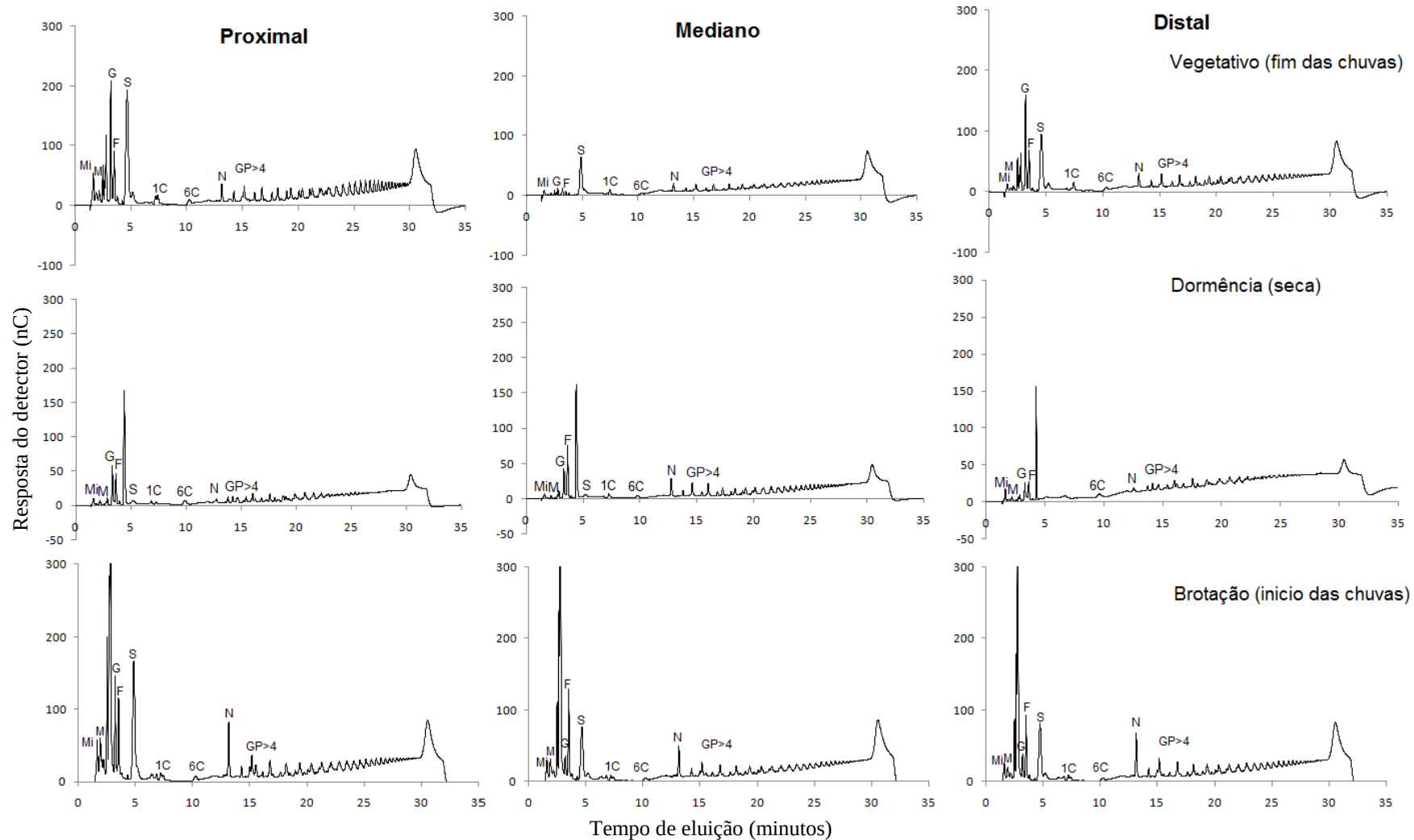


Figura 18. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD de carboidratos solúveis dos extratos brutos dos segmentos proximal (primeira coluna), mediano (segunda coluna) e distal (terceira coluna) de órgãos subterrâneos de *Gomphrena marginata* nas fases de crescimento vegetativo, dormência e brotação do ciclo fenológico 2. (Mi) mio-inositol. (M) manitol, (G) glicose, (F) frutose, (S) sacarose, (1C) 1-cestose, (6C) 6-cestose e (N) nistose.

Atividade das enzimas do metabolismo de frutanos

Para determinar a atividade da enzima de hidrólise frutano-exohidrolase (FEH), foram realizados alguns testes de especificidade com diferentes substratos (Figura 19). A atividade mais elevada foi verificada quando se utilizou o substrato preparado com frutano extraído do sistema subterrâneo de *Gomphrena marginata*. A segunda melhor atividade foi verificada utilizando-se, como substrato, levano de *G. macrocephala*, seguida das atividades obtidas com o trissacarídeo 1-cestose, nistose e inulina de *Helianthus tuberosus*, que foram os substratos sobre os quais a atividade hidrolítica foi mais baixa entre os demais.

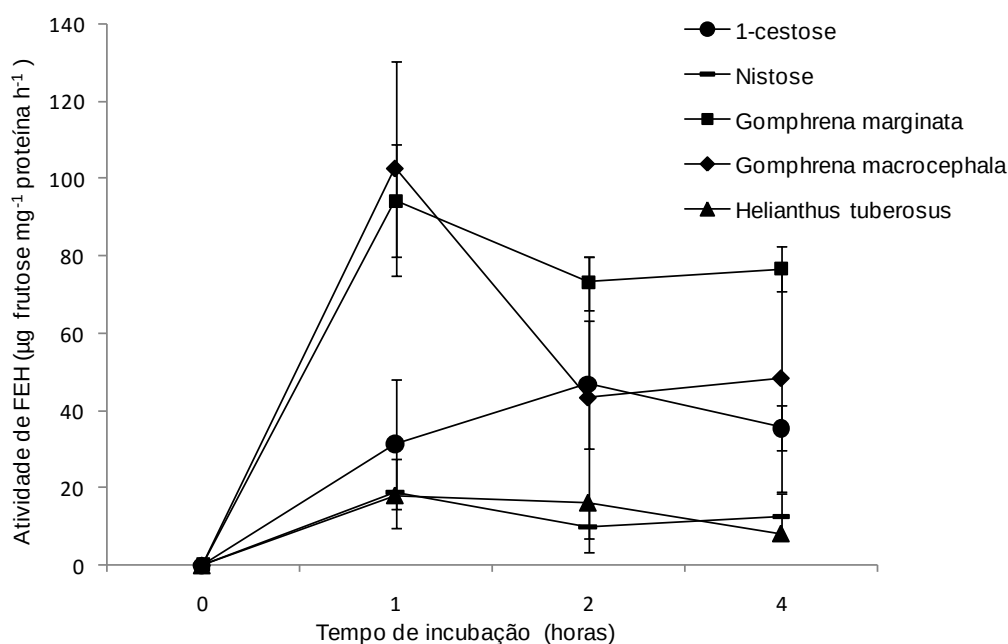


Figura 19. Atividade enzimática da frutano-exohidrolase (FEH) extraída de sistemas subterrâneos de *Gomphrena marginata* sobre diferentes substratos. As barras representam $\pm$ o erro padrão ($n=3$)

No primeiro ciclo analisado, a 1-SST apresentou atividade baixa e somente na fase de crescimento vegetativo nos segmentos proximal e mediano (Figura 20A). No segundo ciclo, a atividade desta enzima não foi detectada em quaisquer das fases fenológicas ou segmentos analisados (Figura 20B).

A atividade da 1-FFT foi detectada nas fases de dormência e brotação no primeiro ciclo. Na dormência, o segmento proximal apresentou atividade mais elevada em comparação à fase de brotação, que por sua vez, apresentou uma maior atividade também no segmento proximal (Figura 20C). No segundo ciclo, a 1-FFT apresentou atividade nas três fases, não sendo, porém, detectada no segmento distal na fase de brotação. Neste ciclo observou-se uma

atividade mais baixa na dormência, com diferença estatisticamente significativa apenas no segmento distal, entre as fases de crescimento vegetativo e de dormência (Figura 20D).

No primeiro ciclo, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa entre as diferentes fases e segmentos, a atividade da FEH mostrou uma tendência de atividade mais alta na fase de brotação, principalmente nos segmentos proximais, e mais baixa na fase de dormência (Figura 20E). No segundo ciclo, a atividade da FEH foi mais alta nos segmentos proximais nas fases de crescimento vegetativo e de brotação e mais baixa na fase de dormência. Na fase de crescimento vegetativo, o segmento proximal apresentou atividade de hidrólise significativamente mais elevada em comparação aos outros segmentos nesta mesma fase (Figura 20F).

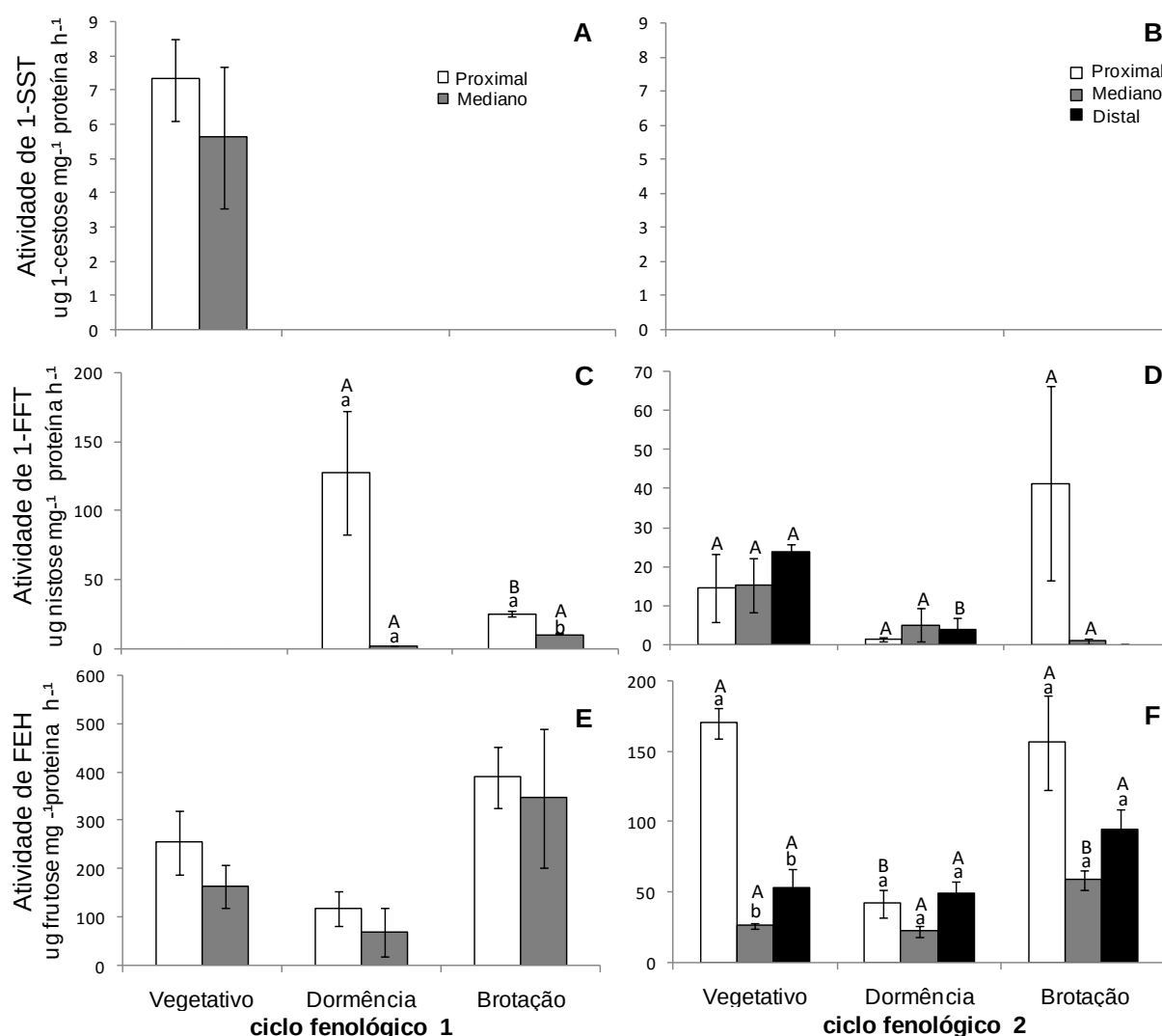


Figura 20. Atividade de sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST) (A, B), de frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT) (C, D) e de frutano-exohidrolase (FEH) em sistemas subterrâneos (segmentos proximal, mediano e distal) de *Gomphrena marginata* nas

fases de crescimento vegetativo (fim das chuvas), dormência (seca) e brotação (início das chuvas) em dois ciclos fenológicos. As barras representam $\pm$ o erro padrão ($n= 3$). Letras maiúsculas comparam as atividades enzimáticas entre fases fenológicas e letras minúsculas comparam as atividades enzimáticas entre os segmentos dentro de cada fase fenológica ($p<0,05$).

5. Discussão

Folhas de *Gomphrena marginata* apresentam anatomia Kranz, uma característica que, juntamente com o valor determinado da isotopia do ^{13}C , de -14,2‰, confirma o metabolismo fotossintético desta espécie como sendo do tipo C4. Muitas espécies de Amaranthaceae e Chenopodiaceae apresentam metabolismo fotossintético C4 e foram classificadas de acordo com a sua anatomia foliar em 17 tipos diferentes (Kadereit et al., 2003). A conformação da anatomia foliar encontrada em *G. marginata* é do tipo “Gomphrena”. As espécies que apresentam este tipo possuem como características em comum o mesofilo dorsiventral, feixes secundários laterais e bainha parenquimática completa, circundada por células parenquimáticas radiadas na porção adaxial do mesofilo. A anatomia foliar de outras espécies de *Gomphrena*, como *G. lanigera*, *G. hermogenesii* e *G. prostata* (Fank de Carvalho et al., 2010) também apresenta características semelhantes à de *G. marginata*, exibindo anatomia Kranz, com a porção adaxial do mesofilo organizada radialmente, e a porção abaxial com células menores, não apresentando formato radial. As variações na anatomia foliar de plantas C4 são provavelmente uma consequência das múltiplas origens independentes de diferentes ancestrais de espécies C3 (Fouracre et al., 2014).

O padrão de venação foliar em *G. marginata* apresenta características de plantas C4 (McKown & Dengler, 2007; McKown & Dengler, 2010), com pequenos espaços entre as nervuras e alta densidade e complexidade das nervações. As aréolas, que são áreas delimitadas por nervuras de várias ordens, são bem desenvolvidas. As vênulas terminais livres podem ser não ramificadas ou com ramificações variáveis e são responsáveis pela distribuição de água nos tecidos (McKown & Dengler, 2010). A vantagem de um padrão de venação bem denso é facilitar o fornecimento de água diretamente para as nervuras localizadas próximas aos estômatos, local onde também ocorrem as trocas gasosas (Brodrigg et al., 2007). O mesmo padrão de venação foi observado nas espécies de Cerrado *G. prostata*, *G. officinalles*, *G. macrocephala* e *G. pohlii* em um estudo realizado por Handro (1964) e em *G. arborescens* (Fank-de-Carvalho et al., 2005), todas apresentando venação primária pinada e secundária broquidódroma. Esse tipo de venação ocorre com mais frequência em plantas de regiões

tropicais por ser mais seguro contra danos celulares e mais eficiente no suprimento de água (Roth et al., 1995).

Outra característica típica de plantas C4 é a presença de grande quantidade de amido nos cloroplastos das células da bainha dos feixes vasculares (Laetsch, 1974; Voznesenskaya et al., 1999), característica também presente nas bainhas vasculares de *G. marginata*..

Em estudo realizado com 158 espécies da subfamília Gomphrenoideae, foi demonstrado que a maioria das espécies C4 ocupam habitats com climas que variam de áridos para semi-áridos, e aproximadamente 70% das C4 ocupam regiões com temperaturas médias superiores a 20 °C (Bena et al., 2017). Além do metabolismo fotossintético C4, folhas de *G. marginata* apresentam algumas características que, segundo Fahn & Cutler, (1992) são consideradas xeromórficas como folhas pequenas estômatos em ambas as faces (anfiestomática) parede periclinal externa das células epidérmicas espessa, e além de longos tricomas, abundantes na região da base foliar, cuja função é manter a umidade e ajudar no controle da temperatura, pelo seu poder de refletância (Fahn & Cutler, 1992). Além disso, a presença destes tricomas pode estar relacionada à proteção das gemas nessas espécies, uma vez que as folhas, nos seus estágios iniciais de desenvolvimento, estão mais vulneráveis a danos mecânicos e herbivoria (Johnson, 1975). Em *G. marginata*, a maioria das folhas se dispõe verticalmente em relação ao solo, o que, segundo Lewis (1972) facilita a dissipação do calor pelo vento. A posição vertical da folha também pode contribuir para melhor captação de água e os tricomas, com abundante presença nas bases foliares, provavelmente ajudam a manter a umidade nessas plantas. Além disso, há evidências de ocorrência de neblina ou orvalho em regiões de campos rupestres, mesmo na época da seca, e a presença desses tricomas também deve contribuir para retenção da umidade na parte aérea. Em folhas de *Combretum leprosum* (Combretaceae), uma espécie da caatinga, foi comprovada a absorção de água pelos tricomas nas folhas, facilitando a manutenção do potencial de água, mesmo sob condição de baixo teor de água no solo (Pina et al., 2016).

Plantas com metabolismo fotossintético C4 são frequentes nos campos rupestres. Na Cadeia do Espinhaço, entre 60 e 85% das espécies de Poaceae apresentam esse metabolismo, porcentagem bem maior em relação a outras áreas campestres no Brasil (Garcia et al, 2009). Os solos nos campos rupestres são muito ácidos, oligotróficos, com baixos níveis de fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) e altos níveis de alumínio (Al) (Schaefer et al., 2016). Com solos extremamente pobres, a vegetação destes ambientes apresenta estratégias para compensar essas limitações de captação de nutrientes (Schaefer et al., 2016), como por exemplo, associações com micorrizas ou algumas raízes especializadas, que exsudam carboxilatos que auxiliam na aquisição de P e micronutrientes (Oliveira et al., 2015). Além

disso, plantas desses ambientes evoluíram para suportar diversas pressões ambientais, como passagem do fogo e baixa disponibilidade de água. A deficiência de fósforo limita o crescimento e desenvolvimento das plantas. Esse macronutriente atua como intermediário nos processos de respiração e fotossíntese e é componente das membranas vegetais e nucleotídeos. Estudos comparativos realizados com gramíneas C3 e C4, submetidas a baixos teores de fósforo, demonstraram que as taxas fotossintéticas e de crescimento em plantas C4 foram maiores, enquanto em plantas C3 houve um declínio, demonstrando que estas últimas são mais sensíveis ao baixo suprimento de fósforo (Ghannoum et al., 2008). Por apresentar mecanismo C4, *Gomphrena marginata*, provavelmente, também está menos sujeita aos possíveis danos causados pela baixa disponibilidade deste nutriente nos solos.

Nas folhas de *G. marginata*, em relação aos carboidratos solúveis, apenas o mio-inositol e a glicose foram identificados em todas as fases e em ambos os ciclos. Açúcares alcoóis são conhecidos como compostos que protegem as plantas contra seca e alta salinidade, e possivelmente esta é a razão da presença do mio-inositol nas folhas de *G. marginata*, pelas características dessas regiões de campos rupestres, em que ocorrem períodos prolongados de seca. Plantas de *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, transformadas com o gene *SaINO1*, mio-inositol 1- fosfato sintase, da espécie halófito *Spartina alterniflora*, apresentaram um aumento da tolerância à salinidade desde a germinação até os subsequentes ciclos de crescimento e desenvolvimento (Joshi et al., 2013). O aumento na proporção de glicose em ambos os ciclos fenológicos em que as plantas foram coletadas e analisadas e também o aumento no teor de açúcares redutores na fase de brotação, verificado no período de maior disponibilidade de água, podem ter contribuído para o fornecimento de energia para o crescimento das plantas nesta fase.. Sacarose não foi detectada nas folhas em nenhuma fase dos ciclos fenológicos. Geralmente, plantas C4 possuem maior capacidade de exportar e transportar açúcares. É provável que por fixarem e exportarem mais carbono por unidade de área de folha do que folhas de espécies C3 (Grodzinski et al., 1998), não tenha sido possível detectar a presença de sacarose nessas folhas.

Quanto ao padrão de alocação de biomassa, plantas de Cerrado, incluindo os campos rupestres, possuem uma razão órgão subterrâneo:parte aérea elevada (Haridasan, 2000). Sistemas subterrâneos espessados são encontrados em muitas espécies ocorrentes neste bioma. Esses órgãos subterrâneos espessados constituem o chamado banco de gemas e são responsáveis pela regeneração das plantas depois do período de seca ou de algum outro distúrbio ambiental que leve à perda dos órgãos aéreos (Klimesová & Klimes, 2007) como, por exemplo, o fogo (Moraes et al., 2016). Sistemas subterrâneos de um grande número de espécies já foram estudados quanto ao acúmulo de reservas, principalmente na família

Asteraceae, com grande ocorrência no Cerrado e cujas espécies acumulam frutanos do tipo inulina (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993; Joaquim et al., 2018). Frutanos são reconhecidos como compostos protetores contra fatores abióticos, como frio, seca e alta salinidade, agindo como osmorreguladores e protetores de membrana (Livingston et al., 2007).

Este é o primeiro estudo em que a presença de frutanos foi associada a uma planta C4. Espécies de gramíneas que acumulam frutanos possuem mecanismo fotossintético C3 (Pollock & Cairns, 1991) e são comuns em regiões de clima temperado. Contudo, a presença de frutanos não foi detectada em gramíneas ocorrentes em uma área de Cerrado no estado de São Paulo (Moraes et al., 2013). A explicação para a ausência desses dois mecanismos, metabolismo de frutanos e fotossíntese C4, seria o fato de ambos constituírem estratégias de adaptação contra a seca, e a ocorrência dos dois mecanismos seria potencialmente redundante (Versluys et al., 2018), porém o sistema subterrâneo espessado de *G. marginata*, cuja anatomia foi descrita no capítulo 1 desta tese, acumula frutanos do tipo levano e esta espécie apresenta metabolismo fotossintético C4. O fato de apresentar os dois mecanismos indica que ambos podem sim ocorrer em conjunto e possivelmente fazem parte das estratégias adaptativas dessas plantas para minimizar os efeitos da seca, frequente nesses ambientes, dentre outros fatores ambientais adversos.

A presença de frutanos do tipo levano, incomum em eudicotiledôneas, pode estar relacionada com a ocorrência do mecanismo fotossintético C4 nessas plantas. *Gomphrena macrocephala*, planta de Cerrado que acumula levanos (Shiomi et al., 1996) e *G. agrestis*, ocorrente nos campos rupestres, na qual também foi encontrado este tipo de carboidrato (Joaquim et al., 2017), apresentam metabolismo fotossintético C4, conforme relatado por Sage et al. (2007), enquanto *Pfaffia glomerata*, espécie de Amaranthaceae C3 (Sage et al., 2007), acumula frutanos, do tipo inulina, os quais constituem 60% da massa seca de suas raízes tuberosas (Caleffi et al., 2015). Já em *Achyranthes bidentata* (Amaranthaceae) foram identificados frutanos com estruturas ramificadas contendo ligações β 2,1 e β 2,6 (Wang et al., 2015), sendo que este gênero, segundo Sage et al. (2007), inclui plantas com metabolismo fotossintético intermediário C3-C4. *Pfaffia glomerata* é uma espécie muito difundida no sul da América tropical e subtropical, sendo que no Brasil ocorre no Cerrado, Amazônia e Mata Atlântica (Marchioretto et al., 2010), enquanto *Achyranthes bidentata*, tem origem asiática e ocorre em florestas (Joshi & Joshi, 2006). Não se sabe a razão de algumas plantas acumularem diferentes tipos de frutanos, podendo este fato estar relacionado à sobrevivência em diferentes condições ambientais (Versluys et al., 2018) e, conseqüentemente, a fatores evolutivos (Hendry & Wallace, 1993).

A capacidade de biossíntese de frutanos é uma característica relativamente recente, surgida provavelmente a partir do desenvolvimento de uma série de FTs (frutossiltransferases) de diferentes ancestrais de invertases vacuolares (Altenbach & Ritsema, 2007). Um dos fatores para o surgimento dos frutanos foi o baixo conteúdo de água, juntamente com o alto conteúdo de sacarose nas células (Valluru & Van den Ende, 2008). O acúmulo de sacarose pode vir a causar a retroinibição da fotossíntese, enquanto a síntese de frutanos a partir desta sacarose permite a continuidade da fotossíntese. Van den Ende (2013) sugere que a capacidade de biossíntese dos frutanos surgiu pelo menos quatro vezes durante o processo evolutivo das plantas que os acumulam; i) em Asterales, espécies que acumulam frutanos do tipo inulina; ii) em Poales, espécies que acumulam frutanos do tipo levano, neoséries, graminanos e séries mistas; iii) em Asparagales e Agavoideae, que acumulam frutanos das neoséries e iv) na eudicotiledônea basal *Pachysandra terminalis* (Buxaceae), que acumula graminanos e que surgiu de um outro tipo de invertase vacuolar. O surgimento da biossíntese dos frutanos que ocorrem em algumas espécies da família Amaranthaceae ainda não foram investigados em relação ao processo evolutivo.

Na fase de brotação, o menor conteúdo de frutose total no segmento proximal em relação aos demais segmentos, bem como os teores mais elevados de açúcares redutores no sistema subterrâneo como um todo, em relação às demais fases, indicam mobilização dos frutanos para a formação de novos brotos e desenvolvimento da parte aérea. Em *Chrysolaena obovata* também os menores teores de frutose total concomitante ao aumento dos açúcares redutores foram observados entre as fases de brotação e floração (Carvalho & Dietrich, 1993) e em *Aldama discolor*, maior proporção de frutose livre também foi encontrada na fase de brotação (Isejima & Figueiredo-Ribeiro, 1993). Como *Gomphrena marginata* não perde suas folhas completamente no período de seca, diferentemente da maioria das espécies de Cerrado e, particularmente de campos rupestres (Rigui et al., 2015; Almeida et al., 2017; Santos et al., 2017), o restabelecimento da parte aérea nessa espécie parece ocorrer de forma mais gradual, não exigindo mobilização intensiva dos carboidratos de reserva durante a fase de brotação. É provável ainda que essas reservas sejam utilizadas em situações mais extremas, como em períodos mais prolongados de seca e em casos de queimadas, minimizando seu gasto metabólico na mobilização destes carboidratos durante um ciclo de desenvolvimento regular e utilizando mais diretamente os açúcares provenientes da fotossíntese para manutenção do seu metabolismo. Em *G. macrocephala*, o conteúdo de frutose total nas raízes tuberosas é maior na pré-dormência e menor no final da dormência, em relação às fases de crescimento vegetativo e reprodutivo, e o conteúdo de polissacarídeos diminui no final da fase de dormência (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993). Diferentemente de *G. marginata*, no entanto,

G. macrocephala perde completamente a parte aérea no período de seca. Em *Ichthyothere terminalis*, Asteraceae de campos rupestres que também perde suas folhas no período de seca, a concentração de oligossacarídeos foi maior nas fases de brotação, crescimento vegetativo e na fase de reprodução, e a maior concentração de frutanos ocorreu na pré-dormência (Almeida et al., 2017). Para as espécies que acumulam frutanos nos sistemas subterrâneos e perdem totalmente a parte aérea no período de seca, como nas Asteraceae *Chrysolaena obovata* (Carvalho & Dietrich, 1993; Rigui et al. 2015) e *Aldama discolor* (Isejima & Figueiredo-Ribeiro, 1991), esses carboidratos são fundamentais para o restabelecimento da parte aérea, pois fornecem energia e esqueletos de carbono para a formação de novos ramos aéreos no início das chuvas. Em estudo realizado com *G. marginata*, no qual os teores de frutose total foram analisados mensalmente durante um ano, Silva et al. (2013) mostraram que estes açúcares variaram de 400 mg g⁻¹ MS no mês de dezembro, coincidente com a época de chuvas e fase de floração, a aproximadamente 800 mg g⁻¹ MS no mês de fevereiro, durante a fase de crescimento vegetativo. Apesar de corresponder ao período de chuvas, os autores explicaram que as variações encontradas podem ter ocorrido por influência de um fenômeno chamado veranico, período sem precipitação durante a estação chuvosa, que pode variar de uma semana a trinta dias. O conteúdo de fruto-oligosacarídeos foi maior em setembro e outubro, período de início das chuvas (Silva et al., 2013), fato não observado no presente trabalho, no qual não se observou diferença significativa nos conteúdos de fruto-oligosacarídeos entre as diferentes fases fenológicas, mas uma grande variação, principalmente nos teores de frutose total, nos diferentes segmentos do sistema subterrâneo. Diferentemente do presente trabalho, no estudo realizado por Silva et al. (2013), os carboidratos foram analisados no sistema subterrâneo como um todo. Portanto, esta diferença de amostragem pode ter influenciado nos resultados obtidos no presente estudo, além das variações meteorológicas que são nitidamente relacionadas com o metabolismo dos carboidratos de reserva. Na espécie *Poa fawcettiae*, uma gramínea de região alpina que acumula frutanos, foram observadas, em campo, maiores concentrações de açúcares solúveis, aproximadamente 70% em relação à massa seca, no final do outono para o inverno (dormência), e menores concentrações, cerca de 50% em relação à massa seca, na primavera e verão (brotação e floração) (Tolsma et al., 2010). Plantas que acumulam frutanos podem ter dinâmicas diferentes de mobilização e síntese desses açúcares, dependendo do conjunto de adaptações que cada espécie apresente para superar períodos desfavoráveis. *G. marginata*, por exemplo apresentou poucas variações no conteúdo de frutanos nas distintas fases fenológicas, mas possui adaptações anatômicas e fisiológicas para superar esses períodos, além do acúmulo de frutanos, utilizado possivelmente em situações extremas, como mencionado acima.

A presença da série homóloga de levano em *G. marginata* foi detectada em todas as fases fenológicas analisadas. No primeiro ciclo fenológico em que os frutanos foram estudados nesta espécie, observou-se uma maior proporção de frutose livre na fase de brotação, enquanto no segundo, uma maior proporção de nistose. Frutanos de cadeias curtas são osmoticamente mais ativos para a manutenção do turgor, preservando o aparato celular que poderia sofrer alguma injúria causada pela desidratação (Garcia et al., 2011; Singh et al., 2015). Foi detectada também no sistema subterrâneo, a presença de mio-inositol e manitol. Esses açúcares álcoois são compostos considerados osmoreguladores e o manitol é o açúcar álcool mais amplamente distribuído na natureza, ocorrendo em mais de 100 espécies de plantas (Abebe et al., 2003). Apesar de muitas espécies produzirem açúcares álcoois, somente algumas parecem transportar grandes quantidades desses compostos pelo floema. Estudos realizados com plantas de trigo transformadas com genes para a síntese de manitol mostraram melhor desempenho no crescimento quando colocadas sob estresse hídrico e de salinidade, em relação às plantas não transgênicas (Abebe et al., 2003). Outros estudos realizados com salsa (*Apium graveolens* - Apiaceae) demonstraram que o manitol forma um complexo com boro (B) e permite que esse micronutriente seja transportado pelo floema para as regiões meristemáticas. Boro é um micronutriente essencial para o crescimento e considerado imóvel no floema na maioria das plantas (Hu et al., 1997). Considerando a baixa disponibilidade de nutrientes no solo em áreas de campos rupestres, esse açúcar álcool pode também estar associado a este micronutriente e teria a função de transportá-lo em plantas de *G. marginata*.

Em relação ao metabolismo enzimático dos frutanos, a enzima 1-SST apresentou atividade baixa e somente na fase de crescimento vegetativo do primeiro ciclo fenológico estudado, enquanto nas outras fases fenológicas e em todo o segundo ciclo, a atividade desta enzima não foi detectada. Em *Chrysolaena obovata* (Asteraceae) a atividade da 1-SST foi maior no período vegetativo e principalmente nos segmentos distais dos rizóforos, órgãos subterrâneos que acumulam frutanos nesta espécie (Portes & Carvalho, 2006; Rigui et al., 2015). Quando plantas desta mesma espécie foram submetidas ao déficit hídrico e ao alto CO₂ foi observada uma diminuição na atividade desta enzima (Oliveira et al., 2016). A atividade de 1-SST também foi observada em outra espécie de Asteraceae *Aldama discolor*, apresentando igualmente queda da atividade em plantas submetidas ao déficit hídrico e alto CO₂ (Oliveira et al., 2013). A ausência de atividade da 1-SST em *G. marginata* no período de seca e até mesmo no início do período das chuvas parece indicar que nessa espécie, a síntese de frutanos não ocorre de forma semelhante às espécies de Asteraceae acumuladoras de frutanos, cuja síntese é significativamente reduzida sob estresse hídrico. Já em raízes de chicória (*Cichorium intybus*), a imposição do estresse hídrico aumentou a atividade e a

expressão da 1-SST, juntamente com o aumento dos teores de sacarose e frutanos (Roover et al., 2000). A 1-SST é a enzima que inicia a síntese de frutanos (Altenbach & Ritsema, 2007), porém em *Dactylis glomerata*, gramínea que acumula levanos, o trissacarídeo 1-cestose não foi identificado em folhas excisadas induzidas à síntese de frutanos, e sim o trissacarídeo 6-cestose, sugerindo que a biossíntese de frutanos possa ser independente da atividade de 1-SST (Maleux & Van den Ende, 2007). Entretanto, em folhas não excisadas de *D. glomerata*, a presença do trissacarídeo e do tetrassacarídeo da série da inulina, 1-cestose e nistose, foi detectada (Chatterton et al., 1993), assim como em *Gomphrena marginata*, na qual a série predominante consiste de uma cadeia com sucessivas ligações β 2,6, portanto, do tipo levano. Uma hipótese para a não detecção da atividade de 1-SST no presente trabalho nas outras fases fenológicas que não a vegetativa e da atividade de 6-SFT em todas as fases, poderia estar relacionada a uma baixa atividade dessas enzimas e baixa produção dos trissacarídeos 1-cestose e 6-cestose, respectivamente. Como pode ser observado nos perfis cromatográficos, o pico referente a estes trissacarídeos, quando detectados, aparecem em baixas proporções em comparação aos outros açúcares, nas diferentes fases e em ambos os ciclos. É fato que a 1-SST nesta espécie possui atividade baixa, e possivelmente constante, nas diferentes fases fenológicas, dificultando portanto, a detecção do seu produto de atividade, a 1-cestose, pelos métodos utilizados. Com um gasto baixo de reservas, como parece ser o caso desta espécie, a atividade de síntese mesmo baixa, como verificado no presente trabalho, pode ser suficiente para contabilizar pelo frutano acumulado.

A 1-FFT, responsável tanto pelo aumento quanto pela diminuição das cadeias de frutanos (Edelman & Jefford, 1968) não apresentou um padrão definido de atividade nas diferentes fases analisadas. No primeiro ciclo fenológico de coletas, a enzima não apresentou atividade na fase de crescimento vegetativo, e no segundo ciclo apresentou uma baixa atividade em todas as fases, porém não foi detectada no segmento distal, na brotação. Em raízes de *Taraxacum officinale* e *Cichorium intybus* cultivadas em campo e analisadas mês a mês no período de um ano, a atividade de 1-FFT permaneceu praticamente constante durante todas as fases de desenvolvimento (Van den Ende & Van Laere, 1996; Van den Ende et al., 2000). Já em yacon (*Polymnia sonchifolia*), que acumula principalmente fruto-oligossacarídeos (FOS) da série da inulina, a atividade de FFT se apresentou relativamente alta no verão (Fukai et al., 1997). Em *G. marginata* a atividade da FFT na fase de crescimento vegetativo do segundo ciclo poderia estar relacionada com o aumento da cadeia de frutanos, enquanto na fase de brotação, quando esta foi detectada somente nos segmentos proximal e mediano, a atividade poderia estar associada com a diminuição do comprimento das cadeias, facilitando a ação da FEH cuja afinidade é maior por frutanos de cadeias curtas, como

reportado para outras espécies (Hellwege et al., 1998; Hellwege et al., 2000; Asega & Carvalho, 2004).

Para avaliar o melhor substrato para a enzima de hidrólise “in vitro”, foram realizadas incubações com diferentes substratos. Assim, extratos incubados com inulina de *Helianthus tuberosus* e nistose (tetrassacarídeo da série da inulina) apresentaram baixa atividade enzimática, seguidos da atividade dos extratos incubados com 1-cestose, demonstrando a baixa afinidade da hidrolase de *G. marginata* por frutanos com ligações β 2,1. Os extratos incubados com substratos extraídos de *G. macrocephala* e da própria *G. marginata* apresentaram atividade enzimática mais elevada e, por essa razão, os frutanos extraídos de *G. marginata* foram utilizados como substrato para os ensaios realizados durante os ciclos fenológicos. A FEH apresentou atividade mais elevada nas fases de brotação e vegetativa do segundo ciclo e especialmente no segmento proximal do primeiro ciclo analisado. Mesmo não apresentando diferença estatisticamente significativa entre as fases, houve tendência de maior atividade na fase de brotação em comparação com as fases de dormência e vegetativa. É provável que nessas fases, vegetativa e de brotação, correspondentes aos períodos de fim e início das chuvas, respectivamente, *G. marginata* mobilize os frutanos para suprir a demanda energética e de carbono para o desenvolvimento de novos ramos aéreos. Em *Helianthus tuberosus*, o aumento da atividade da 1-FEH ocorre gradualmente entre a dormência e a brotação (Marx et al., 1997). *G. marginata* apresentou atividade de FEH em todas as fases em ambos os ciclos fenológicos. A hidrólise dos frutanos é freqüentemente associada a estresses abióticos, para suprimento de energia necessária em resposta aos períodos de seca e frio, permitindo o ajuste osmótico e/ou a estabilização de membranas (Hincha et al., 2002). A imposição de déficit hídrico causou aumento na atividade da 1-FEH em plantas de chicória (Vandoorne et al., 2012), assim como em *Chrysolaena obovata* (Garcia et al., 2015). Em *G. marginata*, a atividade mais elevada da FEH não coincidiu com o período de seca nos campos rupestres, mas sim com as fases de crescimento vegetativo e brotação. Experimentos de imposição de déficit hídrico simulam condições extremas que raramente ocorrem em condições naturais e, conforme detectado nas plantas em campo no presente estudo, o teor de água nos sistemas subterrâneos de reserva se manteve elevado em todas as fases fenológicas, demonstrando que não houve restrição de água para esses tecidos. Variações na atividade de FEH ao longo do comprimento do sistema subterrâneo (rizóforo) também foi detectada em *Crysolaena obovata*, sendo verificada maior atividade no segmento proximal quando a planta foi induzida à brotação (Portes & Carvalho, 2006). Rigui et al. (2015) também observaram, nesta mesma espécie, mas em plantas coletadas no campo, maior atividade de FEH na fase de

brotação, sendo também detectada atividade mais elevada no segmento proximal dos rizóforos.

O teor de água no solo coletado próximo aos sistemas subterrâneos foi baixo, com aproximadamente 5% de água na época chuvosa e menos de 1% no período seco. Solos arenosos como são os solos de regiões de campos rupestres, possuem baixa capacidade de retenção de água e, portanto, apresentam menor disponibilidade de água (Silveira et al., 2016). Apesar do baixo teor de água no solo, houve pouca variação no teor de água nos sistemas subterrâneos, que apresentaram alto teor de água, aproximadamente 70%, nas diferentes fases fenológicas e no potencial osmótico do suco celular, que foi elevado durante todo o ciclo no qual este parâmetro foi avaliado. Esses valores altos de potencial osmótico não condizem com raízes de plantas de ambientes xerófitos, que podem chegar a valores de até -6 MPa ou até mesmo inferiores (Larcher, 2000). No trabalho de Silva et al. (2013), com *G. marginata*, também foi relatada a pequena variação no conteúdo de água nos sistemas subterrâneos dessas plantas. Nesta avaliação realizada durante 12 meses, a porcentagem de água nos tecidos se manteve acima de 80% e o potencial osmótico apresentou pequenas variações. Os sistemas subterrâneos de *G. marginata*, além do acúmulo de reservas, têm a capacidade de armazenar água e manter a hidratação nos tecidos, ajudando a superar períodos de seca durante o inverno, quando praticamente não ocorre precipitação e o armazenamento de água nesses órgãos pode estar diretamente relacionado à presença dos frutanos.

Os campos rupestres possuem um clima bem definido, com invernos secos e verões chuvosos e, particularmente ao longo da Cadeia do Espinhaço, a precipitação total diminui em direção ao norte e a média das temperaturas diminui em direção ao sul (Silveira et al., 2016), sendo a região norte da cadeia, o local onde *G. marginata* ocorre. Muitas espécies dos campos rupestres apresentam mecanismo fotossintético C4 ou CAM, que aumentam a eficiência do uso da água em ambientes quentes e secos (Oliveira et al., 2016). Na cidade de Itacambira (MG), próximo à área de coleta, a precipitação foi praticamente zero entre julho e setembro, no primeiro ciclo de coletas e entre junho e agosto no segundo ciclo de coletas. A amplitude térmica na cidade de Itacambira também é grande, como por exemplo, no mês de agosto de 2015, quando a temperatura média mínima mensal foi de 9° C e a média máxima, de 32° C.

As diferenças encontradas nos conteúdos de carboidratos nessas plantas e nas atividades das enzimas do metabolismo de frutanos durante o primeiro ciclo fenológico em relação ao segundo ciclo podem estar, pelo menos em parte, relacionadas com as diferenças na quantidade de chuvas nos dois ciclos de coleta. No primeiro, a precipitação média anual foi 475,26 mm, bem menor do que os 700,44 mm registrados no segundo ciclo. No primeiro ciclo, as variações nos teores de frutose total foram menos marcantes entre os segmentos e

fases fenológicas e, também, não houve variações nos teores de açúcares redutores. A atividade da enzima FEH, apesar de não diferir estatisticamente entre as fases, mostrou tendência de maior atividade na fase de brotação, que coincidiu com um aumento no pico de frutose no perfil cromatográfico dos carboidratos totais não encontrado nas fases de dormência e crescimento vegetativo. No segundo ciclo de coletas, na fase de brotação, o segmento proximal apresentou baixo conteúdo de frutose total, atividade elevada de FEH e potencial osmótico elevado. Já os segmentos mediano e distal, que se localizam mais profundamente no solo, não apresentaram variações significativas no conteúdo de frutose total, na atividade da FEH e somente pequenas variações do teor de água nas diferentes fases fenológicas. Como discutido acima, plantas de *Gomphrena marginata* permanecem com grande parte de suas folhas, provavelmente ativas fotossinteticamente, e no período de seca, apresentaram teor de água apenas cerca de 10% inferior ao verificado na fase de brotação e início das chuvas. Em vista disso, pode-se sugerir que os sistemas subterrâneos de *G. marginata* atuem como reservatórios de água, com teor de água elevado em todas as fases fenológicas e os frutanos, como compostos osmorreguladores, como já reportado em diversos estudos realizados com outras espécies (Garcia et al., 2011; Parvanova et al., 2004; Pilon-Smits et al., 1995). A função principal dos frutanos em *G. marginata* poderia estar mais relacionada ao acúmulo de água do que à mobilização de reservas logo após o período de seca. A estratégia desta espécie seria manter estáveis os níveis e os comprimentos das cadeias dos frutanos nos segmentos mediano e distal, enquanto na região do sistema subterrâneo mais próxima à parte aérea, ocorrem as variações mais significativas nos conteúdos e nos comprimentos das cadeias desses compostos, demonstrando uma estratégia de minimizar seu gasto metabólico e ao mesmo tempo garantir o suprimento de carbono em casos de seca prolongada. Diferentemente de outras plantas do Cerrado, que possuem órgãos subterrâneos espessados que acumulam frutanos como fonte de energia utilizados após o período de dormência, em que houve perda total da parte aérea, *G. marginata* apresentou um padrão diferente dos ciclos fenológicos das Asteraceae dos cerrados e campos rupestres já estudadas (Carvalho & Dietrich, 1993; Isejima & Figueiredo-Ribeiro, 1993; Almeida et al., 2017) tanto com relação às atividades das enzimas do metabolismo de frutanos, como na proporção dos açúcares em seus sistemas subterrâneos em cada fase.

6. Referências Bibliográficas

- Abebe, T., Guenzi, A. C., Martin, B. & Cushman, J. C.** 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology*, 131: 1748-1755.
- Almeida, L. V., Ferri, P. H., Seraphin, J. C. & Moraes, M. G.** 2017. Seasonal changes of fructans in dimorphic roots of *Ichthyothere terminalis* (Spreng.) Blake (Asteraceae) growing in Cerrado. *Science of the Total Environment*, 598: 404–412.
- Altenbach, D. & Ritsema, T.** 2007. Structure-function relations and evolution of fructosyltransferases. In: Shiomi N., Benkeblia N, Shuichi O., (Eds.), Recent advances in fructooligosaccharides research. Trivandrum: Research Signpost, Kerala, 135-156.
- Asega, A. F. & Carvalho, M. A. M.** 2004. Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant physiology and Biochemistry*, 42: 313-9.
- Asega, A. F., Nascimento, J. R. O., Schroeven, L., Van den Ende, W. & Carvalho, M. A. M.** 2008. Cloning, characterization and functional analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant and Cell Physiology*, 49: 1185– 1195.
- Asega, A. F., Nascimento, J. R. O. & Carvalho, M. A. M.** 2011. Increased expression of fructan 1-exohydrolase in rhizophores of *Vernonia herbaceae* during sprouting and exposure to low temperature. *Journal of Plant Physiology*, 168: 558-565.
- Bancal, P., Carpita, N. C. & Gaudillere, J. P.** 1992. Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis. *New Phytologist*, 120: 313-321.
- Bena, M. J., Acosta, J. M. & Aagesen, L. A.** 2017. Macroclimatic niche limits and the evolution of C4 photosynthesis in Gomphrenoideae (Amaranthaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 184: 283–297.
- Benites, V. M., Schaefer, C. E. G. R., Simas, F. N. B. & Santos, H. G.** 2007. Soils associated with rock outcrops in the Brazilian mountain ranges Mantiqueira and Espinhaço. *Revista Brasileira de Botânica*, 30: 569-577.
- Berlyn, G. P. & Miksche, J. P.** 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames: Iowa State University Press, 326 p.
- Boutton, T. W.** 1991. Stable carbon isotopes ratios of natural materials. II. Atmospheric, terrestrial, marine and freshwater environmental. In: Coleman, D.C.; Fry, B. (Ed.). Carbon isotopes techniques. New York: Academic Press, 155-171 p.

- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-354.
- Brodrigg, T. J., Taylor S., Feild, T. S. & Jordan, G. J.** 2007. Leaf Maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant Physiology*, 144: 1890–1898.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L.** 2015. *Biochemistry & Molecular biology of Plants*, 2nd ed. John Wiley & Sons. 1264p.
- Caleffi, E. R., Krausová, G., Hyrslová, I., Paredes, L. L. R., dos Santos, M. M., Sasaki, G. L., Gonçalves, R. A. C. & Oliveira, A. J. B.** 2015. Isolation and prebiotic activity of inulin-type fructan extrated from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80: 392-399.
- Cairns, A. & Pollock, C. J.** 1988. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. *New Phytologist*, 109: 399-405.
- Carvalho, M. A. M. & Dietrich, S. M. C.** 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Veil.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist*, 123: 735-740.
- Carvalho, M. A. M., Asega, A. F. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 2007. Fructans in Asteraceae from Brazilian cerrado. In: Shiomi N., Benkeblia N, Shuichi O., (Eds.), *Recent advances in fructooligosaccharides research*. Trivandrum: Research Signpost, Kerala, India, 69–91 p.
- Chatterton, N.J., Harrison, P.A., Thornley, W.R. & Bennett, H.** 1993. Structures of Fructan Oligomers in Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Journal of Plant Physiology*. 142: 552-556.
- Cotrim, D. T.** 2014. *Ensaio históricos de Itacambira. Montes Claros- Minas Gerais*. Editora Millenium/Cotrim.
- De Coninck, B., Van Den Ende, W. & Le Roy, K.** 2007. Fructan exohydrolases (FEHs) in plants: Properties, occurrence and 3-D structure. In: Norio, S., Nouredine, B., Shuichi, O. *Recent Advances in Fructooligosaccharies Research*. Research Signpost Publisher, Kerala 157-179.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Edelman, J. & Jefford, T. G.** 1968. The Mechanisim of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus Tuberosus*. *New Phytologist*, 67: 517-531.
- Fank-de-Carvalho, S. M. & Graciano-Ribeiro, D.** 2005. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L.f. (Amaranthaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 19: 377-390.
- Fank-de-Carvalho, S. M., Marchioretto, M. S. & Bão, S. N.** 2010. Anatomia foliar, morfologia e aspectos ecológicos das espécies da família Amaranthaceae da Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, em Alto Paraíso, GO, Brasil. *Biota neotropical*, 10: 78-86.
- Fahn, A. & Cutler, D. F.** 1992. Xerophytes. In: Spez (ed.). *Encyclopedia of plant anatomy*. Editora Gebrüder Borntraeger.
- Fouracre, J. P., Ando, S. & Langdale, J. A.** 2014. Cracking the Kranz enigma with systems biology. *Journal of Experimental Botany*, 65, 3327–3339.
- Fukai, K., Ohno, S., Goto, K., Nanjo, F. & Hara, Y.** 1997. Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science and Plant Nutrition*, 43: 171-177.
- Gallagher, J. A., Cairns, A. J. & Turner, L. B.** 2007. Fructan in temperate forage grasses: agronomy, physiology and molecular biology. In: Shiomi N., Benkeblia N, Shuichi O., (Eds.), *Recent advances in fructooligosaccharides research*. Research Signpost Publisher, Kerala, India, 16- 46 p.
- Garcia, R. J. F., Longhi-Wagner, H. M., Pirani, J. R. & Meirelles, S. T.** 2009. A contribution to the phytogeography of Brazilian campos: an analysis based on Poaceae. *Brazilian Journal of Botany*, 32:703–713.
- 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: 664-70.
- Garcia, P. M. A., Hayashi, A. H., Silva, E. A., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. & Carvalho, M.A.M.** 2015. Structural and metabolic changes in rhizophores of the Cerrado species *Chrysolaena obovata* (Less.) Dematt. as influenced by drought and re-watering. *Frontiers in Plant Science*, 6, Article 721.

- Giulietti, A. M., Menezes, N. L., Pirani, J. R., Meguro, M. & Wanderley, M. G. L.** 1987. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, 9: 1-151.
- Giulietti, A. M., Rapini, A., Andrade, M. J. G., Queiroz, L.P. & Silva, J. M. C.** 2009. Plantas raras do Brasil, Conservação Internacional- Brasil/ Universidade Estadual de Feira de Santana, 496 p.
- Ghannoum, O., Paul, M. J., Ward, J. L., Beale, M. H., Corol, D. & Conroy, J. P.** 2008. The sensitivity of photosynthesis to phosphorus deficiency differs between C3 and C4 tropical grasses Functional Plant Biology, 35: 213-221.
- Grodzinski, B., Jiao, J. & Leonardos, E. D.** 1998. Estimating Photosynthesis and Concurrent Export Rates in C3 and C4 Species at Ambient and Elevated CO2. Plant Physiology, 117: 207–215.
- Handro, W.** 1964. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das Amarantáceas dos Cerrados. Academia Brasileira de Ciências, 4: 479-499.
- Haridasan, M.** 2000. Nutrição mineral de plantas nativas do cerrado. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 12: 54–64.
- Heldt, H-W. & Piechulla, B.** 2011. Plant biochemistry. 3rd ed. London: Elsevier- Academic Press,. 622 p.
- Hellwege, E.M., Raap, M., Gritscher, D., Willmitzer, L. & Heyer, A. G.** 1998. Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflect in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs, FEBS Lett. 427: 25–28.
- Hellwege, E.M., Czapla, S., Jahnke A., Willmitzer, L. & Heyer, A.G.** 2000. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesise the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots, PNAS, 97: 8699–8704.
- Hendry, G. A. F. & Wallace, R. K.** 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In Suzuki, M.; Chatterton, N.J. (Eds.). Science and technology of fructans. Boca Raton: CRC Press,. p. 119–139.
- Henry, R. J. & Darbyshire, B.** 1980. Sucrose:sucrose fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase from *Allium cepa*. Phytochemistry, 19: 1017-1020.
- Hincha, D. K., Zuther, E., Hellwege, E. M. & Heyer, A. G.** 2002. Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. Glycobiology 12: 103- 110.

- Hincha, D. K., Livingston, 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.
- Horridge, G. A. & Tamm, S. L.** 1969. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. *Science*, 163: 817-818.
- Hu, H., Penn, S. C., Lebrilla, C. B. & Brown, P. H.** 1997. Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants. *Plant Physiology*, 11: 649-655.
- Isejima, E. M. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 1993. Fructan variations in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae): the influence of phenology. *Plant and Cell Physiology*, 34: 723-727.
- Jensen, W. A.** 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman, 408 p.
- Jermyn, M. A.** 1956. A new method for determining ketohexoses in the presence of aldohexoses. *Nature*, 177, 38-39.
- Joaquim, E. O., Silva, T. M., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Moraes, M. G. & Carvalho, M. A. M.** 2018. Diversity of reserve carbohydrates in herbaceous species from Brazilian *campo rupestre* reveals similar functional traits to endure environmental stresses. *Flora*, 283, 201-209.
- Johansen, D. A.** 1940. Plant microtechnique. New York: Mc Graw-Hill, 523 p.
- Johnson, H. B.** 1975. Plant pubescence: an ecological perspective. *Botanical Review*, 41: 233-253.
- Joshi, K. & Joshi, A.** 2006. Ethnobotanical Plants Used for Dental and Oral Healthcare in the Kali Gandaki and Bagmati Watersheds, Nepal. *Ethnobotanical Leaflets*, 10: 174-178.
- Joshi, R., Ramanarao, M. V. & Baisakh, N.** 2013. Arabidopsis plants constitutively overexpressing a myo-inositol 1-phosphate synthase gene (*SaINO1*) from the halophyte smooth cordgrass exhibits enhanced level of tolerance to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 65: 61-66.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellog, E. A., Stevens, P. F. & Donoghue, M. J.** 2009. *Sistemática Vegetal - Um enfoque filogenético*. Artmed.
- Kadereit, G, Borsch, T., Weising, K. & Freitag, H.** 2003. Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the Evolution of C4 Photosynthesis. *International Journal of Plant Sciences*, 164: 959-986.
- Kaiser, E.** 1880. Verfahren zur herstellung einer tadellosen glycerin-gelatine, *Botanische Zentralbalat*, 1880, 25-26.

- Kawakami, A., Yoshida, M. & Van Den Ende, W.** 2005. Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene*, 358: 93-101.
- 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.
- Klimesova, J. & Klimes, L.** 2007. Bud banks and their role in vegetative regeneration – A literature review and proposal for simple classification and assessment. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 8: 115–129.
- Laetsch, W. M.** 1974. The c4 syndrome: a structural analysis, *Annual Review of Plant Physiology*, 25: 27-52.
- Larcher, W.** 2000. *Ecofisiologia vegetal*. Editora Rima, São Carlos, 531 p.
- Lewis, M. C.** 1972. The physiological significance of variation in leaf structure. *Science Progress*, 60: 25-51
- Livingston III, D. P., Hinch, D. K. & Heyer, A. G.** 2007. The relationship of fructan to abiotic stress tolerance in plants. In: Shiomi N., Benkeblia N, Shuichi O., (Eds.), *Recent advances in fructooligosaccharides research*. Trivandrum: Research Signpost, Kerala, India, 181-199.
- 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: 671-680.
- Marchioretto, M. S., Miotto, S. T. S. & Siqueira, J. C.** 2010. O gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil. *Hoehnea*, 37: 461-511.
- Marx, S. P., Nosberger, J. & Frehner, M.** 1997. Seasonal variation of fructan-B fructosidase (FEH) activity and characterization of a y5-(2-l)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *New Phytologist*, 135: 267-277.
- McKown, A. D. & Dengler, N. G.** 2007. Key innovations in the evolution of kranz anatomy and C4 vein pattern in Flaveria (Asteraceae) *American Journal of Botany*, 94: 382–399.
- McKown, A. D. & Dengler, N. G.** 2010. Vein patterning and evolution in C4 plants *Botany*, 88: 775–786.
- McIlvaine, T. C.** 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*, 49: 183-186.

- Moraes, M. G., Chatterton, N.J, Harrison, P. A., Filgueiras, T. S. & Figueiredo- Ribeiro, R. C. L.** 2013. Diversity of non-structural carbohydrates in grasses (Poaceae) from Brazil. *Grass and Forage Science*, 68: 165-177.
- Moraes, M. G., Carvalho, M. A. M., Franco, A. C., Pollock, C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 2016. Fire and drought: soluble carbohydrate storage and survival mechanisms in herbaceous plants from the Cerrado. *BioScience*, 66: 107–117.
- 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, R. S., Galvão, H.C., Campos, M.C.R., Eller, C.B., Pearse, S.J. & Lambers, H.** Mineral nutrition of campos rupestres plant species on contrasting nutrient-impooverished soil types. *New Phytologist*, 205: 1183-1194.
- Oliveira, V. F., Silva, E. A. & Carvalho, M. A. M.** 2016. Elevated CO₂ atmosphere minimizes the effect of drought on the cerrado species *Chrysolaena obovata*. *Frontiers in Plant Science*. 7 article 810.
- Oliveira R. S., Abrahão A., Pereira C., Teodoro G. S., Brum, M., Alcantara S. & Lambers H.** 2016. Ecophysiology of campos rupestres plants. In: Fernandes, G. W (Ed). *Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil*, 227-262 p.
- Orthen, B.** 2001. Sprouting of the fructan- and starch-storing geophyte *Lachenalia minima*: effects on carbohydrate and water content within the bulbs. *Physiologia Plantarum*, 113: 308-314.
- Orthen, B. & Wehrmeyer, A.** 2004. Seasonal dynamics of non-structural carbohydrates in bulbs and shoots of the geophyte *Galanthus nivalis*. *Physiologia Plantarum*, 120: 529-536.
- Parvanova, D., Ivanov, S., Konstantinova, T., Karanov, E., Atanasov, A., Tsvetkov, T., Alexieva.V. & Dijilianov, D.** 2004. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 57-63.
- Pilon-Smits, E., 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.
- Pina, A. L. C. B., Zandavalli, R. B., Oliveira, R. S., Martins, F. R. & Soares, A. A.** 2016. Dew absorption by the leaf trichomes of *Combretum leprosum* in the Brazilian semiarid region. *Functional Plant Biology*, 43: 851-861.

- Pirani, J. R., Mello-Silva, R. & Giuliatti, A. M.** 2003. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais, Brasil, Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, 21: 1-24.
- Pollock, C. J. & Cairns, A. J.** 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. Annual review of plant physiology and plant molecular biology, 42: 77-101.
- Pollock, C. J. & Chatterton, N. J.** 1988. Fructans. In: Preiss, J. (Ed) The biochemistry of plants— a comprehensive treatise. New York: Academic Press, 14: 109–140.
- Portes, M. T. & Carvalho, M. A. M.** 2006. Spatial distribution of fructans and fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) in different developmental phases. Plant Science, 170: 624–633.
- Ranwala, A.P. & Miller, W. B.** 2008. Analysis of nonstructural carbohydrates in storage organs of 30 ornamental geophytes by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. New Phytologist, 180: 421-33.
- Rigui, A. P., Gaspar, M., Oliveira, V. F., Purgatto, E. & Carvalho, M. A. M.** 2015. Endogenous hormone concentrations correlate with fructan metabolism throughout the phenological cycle in *Chrysolaena obovata*. Annals of Botany, 115: 1177–1190.
- Ritsema, T. Joling, J. & Smeekens, S.** 2003. Patterns of fructan synthesized by onion fructan : fructan 6G-fructosyltransferase expressed in tobacco BY2 cells - is fructan : fructan 1-fructosyltransferase needed in onion? New Phytologist, 160: 61-67.
- Roover, J., Vandenbranden, K., Van Laere, A. & Van den Ende, W.** 2000. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). Planta, 210: 808-814.
- Roth A., Mosbrugger V., Belz, G. & Neugebauer, H. J.** 1995. Hydrodynamic modelling study of angiosperm leaf venation types. Botanica Acta, 108: 121-126.
- Santos, C. S., Abraão, C. F. & Moraes, M. G.** 2017. Fructan dynamics in the underground organs of *Chresta exsucca* (Asteraceae), a dry season flowering species. Acta Botanica Brasilica, doi: 10.1590/0102-33062017abb0214.
- Sakai, W.S.** 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. Stain Technology, 48: 47-249.
- Sage, R. F., Sage, T. L., Percy, R. W. & Borsch, T.** 2007. The taxonomic distribution of photosynthesis in Amaranthaceae sensu stricto. American Journal of Botany, 94: 1992-2003.

- Schaefer, C. E., Cândido, H. G., Corrêa, G. R., Nunes, J. A. & Arruda, D. M.** 2016. Soils Associated with Rupestrian Grasslands In: Fernandes, G. W (Ed). Ecology and Conservation of Mountaintop Grasslands in Brazil, 55-68p.
- 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: 46-55.
- Silveira, F. A. O., Negreiros, D., Barbosa, N. P. U., Buisson, E., Carmo, F. F., Carstensen, D.W., Conceição, A. A., Cornelissen, T. G., Echternacht, L., Fernandes, G. W., Garcia, Q. S., Guerra, T. J., Jacobi, C. M., Lemos-Filho, J. P., Le Stradic, S., Morellato, L .P. C., Neves, F. S., Oliveira, R. S., Schaefer, C. E., Viana, P. L. & Lambers, H.** 2016. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. Plant Soil, 403: 129–152.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P. & Prasad, S. M.** 2015. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 14: 407-426.
- Siqueira, J. C.** 1991. O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) no Brasil. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Siqueira, J. C.** 2007. O bioma cerrado e a preservação de grupos taxonômicos: um olhar sobre as Amaranthaceae. Pesquisas, botânica, 58: 389-394.
- Shiomi, N., Onodera, S., Vieira, C. C. J. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 1996. Structure of fructan polymers from tuberous roots of *Gomphrena macrocephala* (Amaranthaceae) from the cerrado. New Phytologist, 133: 643-650.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determinatios of sugars. The Journal of Biological Chemistry, 160: 61-68.
- Stritmatter, C. G. D.** 1973. Nueva tecnica de diafanizacion. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, 15: 126-129.
- Szarek, S. R. & Troughton, J. H.** 1976. Carbon Isotope ration in Crassulacean acid metabolism plants. Plant Physiology, 58: 367-370
- 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.

- Tolsma, A. D. Tolhurst, K. & Read S. M.** 2010. Effects of fire, post-fire defoliation, drought and season on regrowth and carbohydrate reserves of alpine snowgrass *Poa fawcettiae* (Poaceae). *Australian Journal of Botany*, 58: 157–168.
- Valluru, R. & Van den Ende, W.** 2008. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany*, 59: 2905-2916.
- Van Den Ende, W. & Van Laere, A.** 1996. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. *Plant Physiology*, 149: 43-50.
- Van den Ende, W., Michiels, A., Wouterghem, D. V., Vergauwen, R. & Van Laere, A.** 2000. Cloning, developmental, and tissue-specific expression of sucrose:sucrose 1-fructosyl transferase from *Taraxacum officinale*. Fructan Localization in Roots. *Plant Physiology*, 123: 71–79.
- 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.** 2013. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Frontiers in Plant Science*, 4, Article 247.
- Vandoorne, B., Mathieu¹, A-S., Van den Ende, W., Vergauwen, R., Périlleux, C., Java, M. & Lutts, S.** 2012. Water stress drastically reduces root growth and inulin yield in *Cichorium intybus* (var. sativum) independently of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 63: 4359-4373.
- Versluys, M., Kirtel, O., Oner, E.T. & Van den Ende, W.** 2018. The fructan syndrome: evolutionary aspects and common themes among plants and microbes. *Plant, Cell & Environment*, 41: 16-38.
- Vieira, C.C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1993. Fructose-containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hill. (Amaranthaceae) at different phenological phases. *Plant, Cell & Environment*, 16: 919-928.
- Vijn, I. & Smeekens, S.** 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology*, 120: 351–359.
- Voznesenskaya, E. V., Franceschi, V. R., Pyankov, V.I. & Edwards, G. E.** 1999. Anatomy, chloroplast structure and compartmentation of enzymes relative to

photosynthetic mechanisms in leaves and cotyledons of species in the tribe Salsoleae (Chenopodiaceae). *Journal of Experimental Botany*, 50: 1779–1795.

Voznesenskaya, E. V., Franceschi, V. R., Kiirats, O., Freitag, H. & Edwards, G. E. 2001. Kranz anatomy is not essential for terrestrial C4 plant photosynthesis. *Nature*, 414: 543-546.

Wang, C., Hua, D. & Yan, C. 2015. Structural characterization and antioxidant activities of a novel fructan from *Achyranthes bidentata* Blume, a famous medicinal plant in China. *Industrial Crops and Products*, 70: 427-434.

Wei, J. & Chatterton, J. 2001. Fructan biosynthesis and fructosyltransferase evolution: Expression of the 6-SFT (sucrose: fructan 6-fructosyltransferase) gene in crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*). *Journal of Plant Physiology*, 158, (9) 1203-1213.

Williams, R. J., Myers, B. A., Eamus, D. & Duff, G. A. 1999. Reproductive phenology of woody species in a north Australian tropical savanna. *Biotropica* 31: 626–636.

Zaidan, L. B. P. & Carvalho, M. A. M. 2011. Nitrogen effects on growth and fructan production in *Vernonia herbaceae* (Vell.) Rusby, an Asteraceae from the Brazilian Cerrado. *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 1: 59-64.

Considerações finais

O sistema subterrâneo espessado de *Gomphrena marginata* é constituído por uma parte caular na região próxima às folhas e, na sua maior parte, por raízes tuberosas com potencial gemífero. Apresentam variação na atividade cambial, produzindo abundantes células parenquimáticas onde são acumulados altos teores de levanos. Além do acúmulo de frutanos, os sistemas subterrâneos desta espécie apresentam altos teores de água, indicando que esses órgãos possuem a capacidade de se manter hidratado, até mesmo nos períodos de estiagem típicos das regiões onde a espécie é encontrada. Os levanos juntamente com o metabolismo fotossintético C4 e outras características foliares, como a presença de tricomas e estômatos em ambas as faces, são adaptações dessas plantas que surgiram ao longo de sua evolução favorecendo possivelmente a superação de longos períodos de seca, solos pobres em nutrientes e grandes variações térmicas. *G. marginata* é considerada uma espécie rara e possui uma distribuição restrita, que se limita aos campos rupestres do norte de Minas Gerais. Siqueira, já em 2007, descreveu que nos últimos 20 anos as espécies de Amaranthaceae

presentes no Cerrado estavam cada vez mais escassas. O gênero *Gomphrena*, dentro da família Amaranthaceae é o de maior ocorrência no Brasil, possuindo 46 espécies, 11 delas exclusivamente nos campos rupestres. Muitas espécies, dentre elas *G. marginata*, vem apresentando redução de suas populações (Siqueira, 2007). Assim, com a devastação do Cerrado e conseqüentemente dos campos rupestres, muitas espécies de Amaranthaceae poderão desaparecer e para que isso não ocorra, é necessário conhecer mais sobre sua fisiologia, bioquímica e anatomia em seu ambiente natural para poder utilizá-las futuramente em programas para a recuperação destes ambientes. Quando espécies endêmicas são extintas, moléculas e compostos biológicos são perdidos definitivamente. Descobrir seu valor como potencial para uso econômico, principalmente em relação ao acúmulo de frutanos, como já foi descrito também em outras espécies desta família, poderá despertar o interesse na proteção dessas áreas de campos rupestres e o surgimento de novas estratégias para cultivo e exploração sustentável, como ocorre com outras espécies nativas.