



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL

CAMILA SILVA DOS SANTOS

VARIAÇÃO FENOLÓGICA DOS FRUTANOS E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DE SACAROSE: SACAROSE FRUTOSILTRANSFERASE (1-SST), FRUTANO
EXOHIDROLASE (1-FEH) E INVERTASE (INV) EM ÓRGÃOS SUBTERRÂNEOS
DE *Chresta exsucca* DC. (ASTERACEAE).

GOIÂNIA

2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Camila Silva dos Santos

Título do trabalho: Variação fenológica dos frutanos e caracterização parcial de sacarose: sacarose frutossiltransferase (1-SST), frutano exohidrolase (1-FEH) e invertase (INV) em órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca* DC. (Asteraceae).

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 25 / 09 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

Versão atualizada em setembro de 2017.

CAMILA SILVA DOS SANTOS

**VARIAÇÃO FENOLÓGICA DOS FRUTANOS E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL
DE SACAROSE: SACAROSE FRUTOSILTRANSFERASE (1-SST), FRUTANO
EXOHIROLASE (1-FEH) E INVERTASE (INV) EM ÓRGÃOS SUBTERRÂNEOS
DE *Chresta exsucca* DC. (ASTERACEAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dra. Moemy Gomes de Moraes

GOIÂNIA

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Santos, Camila Silva dos

Variação fenológica dos frutanos e caracterização parcial de sacarose: sacarose frutossiltransferase (1-SST), frutano exohidrolase (1-FEH) e invertase (INV) em órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca* DC. (Asteraceae). [manuscrito] / Camila Silva dos Santos. - 2017.

xcii, 92 f.

Orientador: Profa. Dra. Moemy Gomes de Moraes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, mapas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Cerrado. 2. *Chresta exsucca*. 3. Fenologia. 4. Inulina. 5. Metabolismo de frutanos. 1. Moraes, Moemy Gomes de, orient.
II. Título.

CDU 581.1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
DE Nº 057

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO. – Aos vinte e nove dias do mês de junho do ano de dois mil e dezessete (29/06/2017), às 14h00min horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profa. Dra. Moemy Gomes de Moraes – orientadora; Profa. Dra. Maria Angela Machado de Carvalho e Prof. Dr. Cirano José Ulhoa para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no Mini-auditório do CERCOMP da UFG, procederem à avaliação da defesa de Dissertação intitulada **“VARIÇÃO FENOLÓGICA DOS FRUTANOS E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE SACAROSE: SACAROSE FRUTOSILTRANSFERASE (1-SST), FRUTANO EXOHIDROLASE (1-FEH) E INVERTASE (INV) EM ÓRGÃOS SUBTERRÂNEOS DE *Chresta exsucca* DC, (ASTERACEAE).”** em nível de mestrado, área de concentração em Botânica, de autoria de **CAMILA SILVA DOS SANTOS**, discente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora Profa. Dra. Moemy Gomes de Moraes que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida à autora da dissertação que, em 43 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1283/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal, a Dissertação foi aprovada por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE VEGETAL, na área de concentração em Botânica

35 pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na
36 secretaria do PPGBV da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções, em trinta dias
37 a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17 horas e 30 min,
38 a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado e para constar
39 eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, assistente administrativa do PPGBV lavrei a presente Ata,
40 que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de
41 igual teor.

42
43 

44 Profa. Dra. Moemy Gomes de Moraes
45 Presidente da Banca
46 UFG/GO

47
48
49 

50 Profa. Dra. Maria Angela Machado de Carvalho
51 INSTITUTO DE BOTÂNICA/SP

52
53
54
55
56
57
58 

59 Prof. Dr. Cirano José Ulhoa
60 UFG/GO
61
62
63
64
65
66
67
68

Ao meu amigo, companheiro e esposo, Celinor Júnior.
“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante...”
(Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal pela oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pelo auxílio financeiro por meio da bolsa de estudos.

À Professora Dr^a. Moemy Gomes de Moraes pelo exemplo de pessoa e de profissional. Agradeço pelos aprendizados, os quais levarei para a vida. Obrigada pelas palavras de apoio e de incentivo. Obrigada pelos lanchinhos e bombons e, claro, pelas broncas. Em cada pequena atitude, eu aprendi com você. Sou grata por isso. Agradeço pela paciência e pela oportunidade de descobrir esse universo fascinante dos frutanos. A você, professora, meu carinho e admiração de sempre!

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, obrigada pelo carinho e parceria em cada momento. Cinara Abraão pelos encontros divertidos, pelas risadas e abraços consoladores. Você é um amor de pessoa! Obrigada por cuidar de mim nessa correria maluca. Valeu demais!

Ao Bruno Tiago pelo auxílio nas coletas, no laboratório e na vida. Te admiro muito, você sabe, obrigada pelas longas e revigorantes risadas juntos.

Ana Carolina e Rafael Vitor, me lembro até hoje do primeiro dia que fui ao laboratório para pedir informações e vocês estavam lá, me receberam com sorrisos e palavras de ânimo; naquele momento eu já sabia que ali era meu lugar. Obrigada pelos ensinamentos, pelas risadas, pelos presentes, pela amizade. Vocês são lindos.

Emiliana minha amiga querida, só Deus sabe o quanto aprendi com você. Obrigada por tudo.

Edson e Bênelly, vocês são mega fofos, agradeço pelo tempo que passamos juntos, sucesso sempre.

Viviane, você é hilária! Amei te conhecer e me desesperar um pouquinho contigo. Amo nossas conversas sobre carboidratos e sobre a vida. Obrigada.

Ao Dr. Murilo pelos preciosos conselhos e sugestões neste trabalho. Muito obrigada.

Agradeço ao Msc. Syd e à Dr^a. Francieli pelo apoio e auxílio neste trabalho. Aprendi muito com vocês.

Ao meu querido orientador de graduação Jales Chaves-Filho, por me encantar com o universo da botânica. Agradecida.

Aos meus companheiros de turma de Mestrado, que aventura! Em especial ao nosso Gabriel, que está em um lugar melhor agora, muita luz meu amigo, muita luz.

Rogério, você é fenomenal. Obrigada por tudo. Cada coleta tive seu apoio e auxílio. Eternamente grata.

Beryl, obrigada pela positividade; Danielle pelos conselhos; Elifaete pelas caronas e risadas; Indiara pelos desabafos, você é muito linda! Ilvan pelas conversas bacanas; João pelos choques de realidade; Priscila por cada cuscuz; Rayna pela força e positividade também; Thiago pela simplicidade, sabedoria e auxílio como colega de trabalho; Tâmara pelo companheirismo e carinho. Vocês são feras! Muito obrigada.

Ao Msc. Rodolph Delfino pelo auxílio nas coletas e dicas valiosas de pesquisa.

À Gleice por todo apoio e palavras de encorajamento. À Msc. Elienai pelas longas, divertidas, edificantes e incentivadoras conversas. Agradeço por todo auxílio para execução deste trabalho.

Aos meus grandes e eternos amigos: Danilo Antônio, Munique, Rose Souza, Damiana, Evanaldo, Jilvani, Ana Maria, Stella, José e Eduardo. Obrigada por cada palavra de apoio. Que Deus transborde suas vidas em alegria. Amo vocês!

À minha querida Psicóloga Fernanda, uma pessoa de amor e luz. Agradecida pelos choros e risadas tão necessários.

Aos meus alunos, obrigada pela inspiração diária.

Ao meu papai Cosme, cujo referencial é inestimável. Te amo!

À minha maninha Carol, obrigada pelo carinho e incentivo.

Ao meu esposo maravilhoso e lindo, Júnior, obrigada por estar ao meu lado em cada passo deste Mestrado. Obrigada por cada cafezinho e cobertor nas madrugadas. Seu apoio foi essencial. Obrigada, príncipe.

A cada um de vocês, gratidão...

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ANEXOS	16
LISTA DE SIGLAS	17
RESUMO GERAL.....	18
ABSTRACT.....	19
1 INTRODUÇÃO GERAL	20
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
4.1 ORIGEM DAS FRUTOSILTRANSFERASES.....	24
4.2 ENZIMA DE SÍNTESE DA 1-CESTOSE: 1-SST	25
4.3 ENZIMA DE PROCESSAMENTO DA MOLÉCULA DE INULINA: 1-FFT	26
4.4 ENZIMA DE HIDRÓLISE DA MOLÉCULA DE FRUTANO: 1-FEH	28
4.5 ENZIMA DE HIDRÓLISE DA SACAROSE: INVERTASE.....	30
4.6 INULINA: ANÁLISES FUNCIONAIS	31
4.7 VARIAÇÃO DE FRUTANOS DEVIDO À SAZONALIDADE	32
4.8 GÊNERO <i>Chresta</i>	33
5 REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO I – A DINÂMICA DOS FRUTANOS NOS ÓRGÃOS SUBTERRÂNEOS DE <i>Chresta exsucca</i> (ASTERACEAE), UMA ESPÉCIE QUE FLORESCE EM ESTAÇÃO SECA	43
RESUMO.....	44
ABSTRACT.....	45
1 INTRODUCTION	46
2 MATERIALS AND METHODS	48
2.1 Study site.....	48
2.2 Plant material	48
2.3 Soluble carbohydrates extraction and analyses.....	49
2.4 Statistical analysis	51
3 RESULTS	51

3.1 Water and carbohydrate contents	52
3.2 Qualitative analysis of carbohydrates	53
4 DISCUSSION.....	53
5 REFERENCES.....	59
CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE SACAROSE: SACAROSE FRUTOSILTRANSFERASE (1-SST), FRUTANO EXOHIDROLASE (1-FEH) E INVERTASE (INV) EM ÓRGÃOS SUBTERRÂNEOS DE <i>Chresta exsucca</i> E VARIAÇÕES FENOLÓGICAS DA I-FEH.....	64
RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
1 INTRODUÇÃO.....	67
2 METODOLOGIA.....	68
2.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	68
2.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	69
2.3 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	69
2.4 ANÁLISE POR HPAEC/PAD.....	70
2.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	70
3 RESULTADOS.....	72
3.1 EFEITO DOS DIFERENTES FATORES NA ATIVIDADE DA 1-FEH.....	77
3.2 PERFIL DE PROTEÍNAS.....	79
3.3 VARIAÇÃO SAZONAL DE FRUTANOS EM <i>C. exsucca</i>	80
4 DISCUSSÃO.....	84
5 CONCLUSÃO.....	86
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
7 REFERÊNCIAS.....	88
8 ANEXOS.....	91

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 Condições ótimas para a atividade enzimática de 1-FEH em diferentes espécies. Fatores: tempo de reação, temperatura de incubação e pH.	30
--	----

CAPÍTULO I

Table 1 Phenological phases of <i>Chresta exsucca</i> collected in Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros (Goiás, Brazil) from October 2015 to July 2016. RE, resprouting; VG, vegetative growth; F-I flowering –I; F-II, flowering II; FR, fruiting; SE, senescence. Bold marks indicate the predominant phase at the collection, * indicate the phase collected.	51
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1 Delineamento composto central rotacional (DCCR) em fase de floração I, para determinação dos valores ótimos de tempo de reação, temperatura (T°C), pH e concentração de substrato para a enzima frutano exohidrolase de órgãos subterrâneos de <i>C. exsucca</i>	71
Tabela 2 Condições ótimas de atividade de 1-SST, 1-FEH e invertase em <i>C. exsucca</i> e diferentes espécies.	85

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 Estruturas iniciais dos trissacarídeos de frutanos, conforme Waterhouse & Chatterton (1993). As demarcações tracejadas indicam as moléculas de sacarose. As ligações entre os monômeros são indicadas por números adjacentes ao respectivo átomo de carbono.21

CAPÍTULO I

Figure 1 Monthly means of maximum (diamonds), average (squares) and minimum (triangles) temperatures (A). Rainfall (bars) and relative air humidity (circles) (B) from October 2015 to September 2016 in Posse, Goiás, Brazil, (www.inmet.gov.br).49

Figure 2 Box-plot showing water content (A), oligosaccharides (B), polysaccharides (C) and oligo:polysaccharides ratio in underground organs of field-grown *Chresta exsucca* plants at different phenological phases. Resprouting (RE), vegetative growth (VG), flowering I (F-I), flowering II (F-II), fruiting (FR) and senescence of the aerial organs (SE). Dashed line in D indicates oligo:polysaccharides ratio = 1. Different letters indicate different medians (n = 4, p < 0.05).52

Figure 3 HPAEC/PAD profiles of oligosaccharides and polysaccharides of underground organs of *Chresta exsucca* in different phenological phases. Glucose (G), fructose (F), sucrose (S), 1-kestose (1-K), degree of polymerization (DP).55

CAPÍTULO II

Figura 1 Atividade de sacarose: sacarose frutossiltransferase (1-SST)) da região mediana em raízes de *Chresta exsucca* ocorrente no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros-GO, durante crescimento vegetativo (coleta fevereiro). Variações de tempo (n = 2), temperatura e pH (n = 3). As barras indicam erro padrão da média.72

Figura 2 Cromatogramas analisados por HPAEC/PAD da região mediana de órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca* para 1-SST (coleta fevereiro). Análise de tempo (A), temperatura (B) e pH (C). Tempo 0 = linha preta e tempo 6 = linha azul. Extrato branco = ausência de substrato. G = glicose, F = frutose, S = sacarose, 1-K = 1-kestose e N = nistose.73

Figura 3 Atividade de invertase em diferentes condições de tempo e temperatura da região proximal em raízes de *Chresta exsucca* ocorrente no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros-GO, durante crescimento vegetativo (coleta fevereiro). Variações de tempo (A) e temperatura (B). As barras indicam erro padrão da média (n = 3).74

Figura 4 Atividade de 1-FEH em diferentes condições de tempo (A) e pH (B) da região proximal em raízes de *Chresta exsucca* ocorrente no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros-GO, as barras indicam erro padrão da média (n = 3).75

Figura 5 Atividade de 1-FEH da região proximal de órgãos subterrâneos de *C. exsucca*, na fase de floração I, em condições ótimas: tempo - 5 minutos; pH - 5,5 e concentração de substrato - 6%. As barras indicam erro padrão da média, n = 3.76

Figura 6 Variação da atividade de 1-FEH da região proximal de órgãos subterrâneos de *C. exsucca* em diferentes fases fenológicas. Condições ótimas: tempo - 5 minutos; temperatura 50°C; pH - 5,5 e concentração de substrato - 6%. As barras indicam erro padrão da média, n = 3. P = 0,00013.76

Figura 7 Efeito de diferentes fatores na atividade da 1-FEH em *Chresta exsucca*. A = fator temperatura; B = fator concentração de substrato; C = fator pH e D = fator tempo. Correlação negativa (azul) e correlação positiva (cinza).76

Figura 8 Gráficos de superfície para atividade de 1-FEH da região proximal de órgãos subterrâneos de *C. exsucca*. Relação dos fatores: temperatura-tempo (A) e pH-tempo (B). Atividade em U/mL. Relação dos fatores: tempo-pH (C), tempo-substrato (D) e pH-temperatura (E). Atividade em $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ proteína}\cdot\text{h}^{-1}$... 78

Figura 9 Perfil proteico da região proximal dos órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca*, coletados em fevereiro (Cv), maio (Fl I) e julho (Fl II). M = marcador molecular (kDa). A seta indica provável unidade de 1-FEH.79

Figura 10 Produção de frutose nas diferentes condições dos ensaios: 2 e 4 (A); 5 e 8 (B); 21 e 23 (C) e 22 e 28 (D). F = frutose.80

Figura 11 Cromatogramas analisados por HPAEC/PAD da região proximal de órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca* para 1-FEH. Oligossacarídeos (A) e polissacarídeos (B). G = glicose, F = frutose, S = sacarose, 1-K = 1-kestose e N = nistose. BR = brotação, CV = crescimento vegetativo, FL I = floração I, FL II = floração II; FR = frutificação, SN = senescência. II = coleta em setembro.81

LISTA DE ANEXOS

CAPÍTULO II

Anexo 1 Mapa do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros entre os municípios de Alto Paraíso e Cavalcante (GO). Área de abrangência do bioma Cerrado no Brasil. Mapa desenvolvido no programa ArcGIS v.10,5@91

Anexo 2 *Chresta exsucca* em Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros-GO. Coletas: outubro/15 a julho/16. Ciclo fenológico: brotação (A), crescimento vegetativo (B), floração I (C), floração II (D), frutificação (E), senescência (F).92

LISTA DE SIGLAS

1-FEH - Frutano exohidrolase	F-I – Floração I
1-FEHIIa – Frutano exohidrolase IIa	F-II – Floração II
1-FEHIIb – Frutano exohidrolase IIb	G – Glicose
1-FFT – Frutano: frutano 1- frutosiltransferase	GP/ GPs – Grau (s) de polimerização
1-K – 1-cestose	HPAEC/PAD – Cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (do inglês <i>High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection</i>)
1-SST - Sacarose: sacarose 1- frutosiltransferase	INV – Invertase
6-FEH – Frutano 6-exohidrolase	kDa – Kilodaltons
6&1-FEH – Frutano 6,1-exohidrolase	MF – Massa fresca
6-SST – Sacarose: sacarose 6- frutosiltransferase	MS – Massa seca
6-SFT – Sacarose: frutano 6- frutosiltransferase	N – Nistose
BR – Brotação	nC – Nanocoulomb
BSA – Bovine serum albumin	nm – Nanômetros
CV – Crescimento vegetativo	PVPP – Polivinilpolipirrolidona (do inglês <i>polyvinylpolypyrrolidone</i>)
EROs – Espécies reativas de oxigênio	S - Sacarose
F – Frutose	SEN – Senescência
FL – Floração	
FR – Frutificação	

RESUMO GERAL

Variação fenológica dos frutanos e caracterização parcial de sacarose: sacarose frutossiltransferase (1-SST), frutano exohidrolase (1-FEH) e invertase (INV) em órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca* DC. (Asteraceae) – A sazonalidade climática é fator de grande influência em plantas do Cerrado. Em fases de alta demanda energética o acúmulo de carboidratos torna-se recurso importante para manutenção dos vegetais em ambiente de condições adversas como seca, frio e fogo. Nesse sentido, o estudo das enzimas do metabolismo de carboidratos é importante para compreender as estratégias metabólicas utilizadas por esses vegetais. *Chresta exsucca* apresenta frutanos do tipo inulina e perfil fenológico distinto de outras espécies de Asteraceae do Cerrado: floresce na estação seca e a rebrota ocorre em várias épocas do ano. O objetivo deste trabalho foi verificar a variação no dos carboidratos em órgãos subterrâneos de *C. exsucca* em diferentes fases fenológicas; verificar as condições ótimas de atividade enzimática de sacarose: sacarose frutossiltransferase (1-SST), frutano exohidrolase (1-FEH) e invertase (INV) e analisar a atividade de 1-FEH nas diferentes fases fenológicas. Foram realizadas extração e quantificação de carboidratos solúveis totais e a razão oligossacarídeo: polissacarídeo foi < 1 na senescência. As caracterizações enzimáticas foram realizadas em diferentes condições de tempo, temperatura, pH e concentração de substrato. Em *C. exsucca* as condições ótimas para as enzimas do metabolismo de frutanos se assemelham às demais espécies de Asteraceae. O delineamento composto central rotacional para a enzima 1-FEH permitiu constatar que tempo de reação e pH foram significativos sobre a atividade de 1-FEH em *C. exsucca*. Durante a brotação houve maior atividade de 1-FEH comparado às outras fases fenológicas. Os frutanos armazenados nos órgãos subterrâneos de *C. exsucca* e as características de suas enzimas são importantes para a manutenção dessa planta, resultando em constante rebrota e intensa fase reprodutiva, mesmo em estação seca.

Palavras-chave: Cerrado, *Chresta exsucca*, fenologia, inulina, metabolismo de frutanos.

ABSTRACT

Phenological variation of fructans and partial characterization of sucrose: sucrose fructosyltransferase (1-SST), fructan exohydrolase (1-FEH) and invertase (INV) in underground organs of *Chresta exsucca* DC. (Asteraceae) - Climatic seasonality is a factor of great influence in Cerrado plants. In phases of high energetic demand, carbohydrate accumulation becomes an important resource for the maintenance of plants in adverse environmental conditions, such as drought, cold and fire. Thus, the study of enzymes of carbohydrate metabolism is important in understanding metabolic strategies used by these plants. *Chresta exsucca* has inulin-type fructans and a distinct phenological profile compared to other Asteraceae species from Cerrado. This species flowers in the dry season and resprouting occurs throughout the year. The objective of this work was to verify the carbohydrate variations in the underground organs of *C. exsucca* in different phenological phases; to verify the optimal conditions for enzymatic activity of sucrose: sucrose fructosyltransferase (1-SST), fructan exohydrolase (1-FEH) and invertase (INV) and to analyze 1-FEH activity in different phenological phases of this species. Total soluble carbohydrate extraction and quantification were performed and the ratio of oligosaccharide: polysaccharide was <1 in senescence. Enzymatic characterization was carried out in different conditions of time, temperature, pH and substrate concentration. The enzymatic conditions for fructan metabolism in *C. exsucca* resemble other Asteraceae species. The central rotational compound design for 1-FEH showed that reaction time and pH factors influenced 1-FEH activity in *C. exsucca*. Resprouting had higher 1-FEH activity compared to other phenological phases. Therefore, fructans stored in the underground organs of *C. exsucca*, as well as the characteristics of fructan enzymes are essential for maintenance of this plant, resulting in constant resprouting and intense reproductive phase, even in the dry season.

Keywords: Cerrado, *Chresta exsucca*, fructan metabolism, phenology, inulin.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado, típico do Brasil Central, é constituído por diferentes fitofisionomias desde formações campestres a formas mais densas, como o cerradão (COUTINHO, 1990). No Cerrado ocorrem duas estações bem definidas: uma chuvosa e outra estação seca (EITEN, 1977). O período chuvoso ocorre entre outubro e abril e o seco entre maio e setembro; com temperaturas anuais em torno de 23°C, a precipitação média anual do cerrado está entre 1.200 e 1.800 mm (COUTINHO, 2002).

A baixa disponibilidade de água e a ocorrência de fogo em períodos secos, bem como os solos ácidos, são características do Cerrado que podem limitar o desenvolvimento dos vegetais. A presença de órgãos subterrâneos de resistência, remineralização da biomassa e a ocorrência de súber com camadas espessas são algumas respostas adaptativas das plantas às pressões ambientais no Cerrado (COUTINHO, 2002). Adicionalmente, o acúmulo de carboidratos em órgãos subterrâneos é recurso importante para crescimento e desenvolvimento das plantas e tornou-se característica típica dos grupos de vegetais que crescem no Cerrado (JOAQUIM *et al.*, 2014).

No estrato herbáceo do Cerrado, Asteraceae é uma família de grande importância e abrangência (BATALHA & MANTOVANI, 2001; CARVALHO *et al.*, 2007; ROSSATTO *et al.*, 2013). Muitas espécies dessa família acumulam frutanos no vacúolo das células parenquimáticas de órgãos subterrâneos espessos (SILVA *et al.*, 2015). Significativas quantidades de frutanos são encontradas em órgãos subterrâneos de várias espécies que ocorrem no Cerrado (FIGUEIREDO-RIBEIRO *et al.*, 1986; TERTULIANO & FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993); havendo, também, a possibilidade de estímulo da produção desses carboidratos mediante fornecimento de nitrogênio, como ocorreu em *Chrysolaena obovata* (Less.) M. Dematt., anteriormente denominada *Vernonia herbacea* (Vell) Rusby (CUZZUOL *et al.*, 2003).

Frutanos são polímeros de frutose derivados da sacarose, os quais podem conter pelo menos duas unidades de frutose adjacentes (VAN LAERE & VAN DEN ENDE, 2002) e também possuem uma unidade interna ou uma unidade terminal de glicose (LEWIS, 1993). Constituem o principal carboidrato de reserva em aproximadamente 15% das espécies de Angiospermas (HENDRY, 1987) e em cerca de 60% das espécies de Asteraceae que ocorrem em uma área restrita do cerrado em Moji-Guaçu/SP, Brasil (CARVALHO *et al.*, 2007). O armazenamento dos frutanos nos vegetais é estimulado em altas concentrações de sacarose e sua hidrólise ocorre em períodos com alta demanda energética, como a brotação e crescimento (VIEIRA & FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993; RITSEMA & SMEEKENS, 2003).

De acordo com o tipo de ligação glicosídica, diferentes tipos de frutanos podem ser formados (Figura 1), os quais são encontrados em vários táxons de plantas. A inulina é uma série linear com ligações do tipo β (2,1) entre as unidades de frutose e a menor formação é o trissacarídeo 1-cestose. Esse tipo de frutano é encontrado em *C. obovata*, *Cichorium intybus* L., *Helianthus tuberosus* L. e em outras Asteraceae (ASEGA & CARVALHO, 2004; VAN DEN ENDE, 2013). Os levanos são lineares, com ligações do tipo β (2,6) e formados a partir do trissacarídeo 6-cestose, os quais constituem os principais tipos de frutanos encontrados em monocotiledôneas (LIVINGSTON *et al.*, 2009), em Amaranthaceae (SHIOMI *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2013) e em *Pachysandra*, uma Buxaceae (VAN DEN ENDE *et al.*, 2011). Frutanos ramificados possuem ligações do tipo β (2,1) e β (2,6), contendo levanos ou inulina como estrutura principal e uma ou mais ramificações, e estão presentes em *Triticum aestivum* L. (trigo) e *Hordeum vulgare* L. (cevada) (BANCAL *et al.*, 1992). Outros tipos de frutanos são as neosséries de inulina. Estas possuem ramificações lineares com ligações do tipo β (2,1), porém com uma molécula de glicose entre duas unidades de frutose, esse tipo de frutano é identificado em *Allium cepa* L. e *Asparagus officinallis* L. (SHIOMI, 1989). As neosséries de levanos são formadas a partir de moléculas de neocestose e possuem uma molécula interna de glicose como na neossérie de inulina, todavia, com ligações do tipo β (2,6) (LIVINGSTON *et al.*, 2009), sendo encontrados em *Avena sativa* L. e *Lolium temulentum* L. (SIMS *et al.*, 1992; LIVINGSTON *et al.*, 1993).

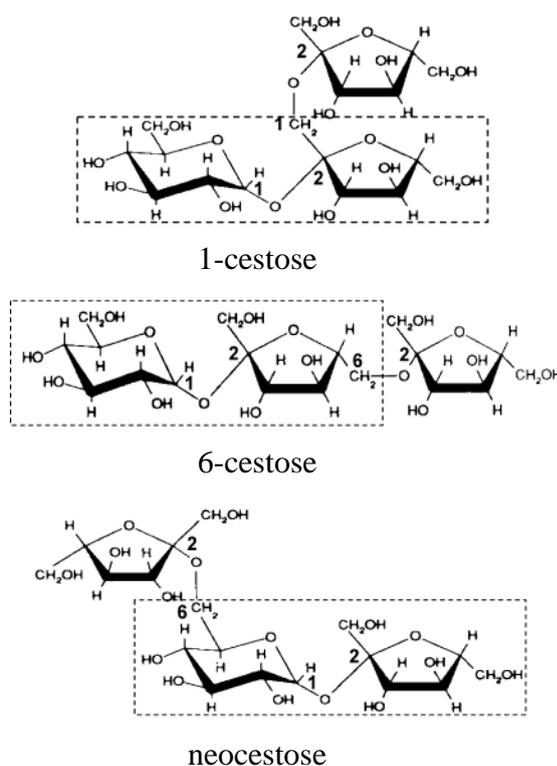


Figura 1 Estruturas iniciais dos trissacarídeos de frutanos, conforme Waterhouse & Chatterton (1993). As demarcações tracejadas indicam as moléculas de sacarose. As ligações entre os monômeros são indicadas por números adjacentes ao respectivo átomo de carbono.

Edelman & Jefford (1968) propuseram o primeiro modelo para o metabolismo de frutanos com base na inulina, o tipo de frutano presente nas Asteraceae e também o mais conhecido e estudado (VAN LAERE & VAN DEN ENDE, 2002), encontrada em tubérculos de *Helianthus tuberosus*. De acordo com esse modelo, a síntese de inulina é iniciada pela formação do trissacarídeo 1-cestose por meio da enzima sacarose: sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99). Em seguida, a enzima frutano: frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100) é a responsável pelo alongamento da cadeia de frutanos, transferindo um resíduo de frutose de uma molécula com grau de polimerização igual ou superior a 3 para outra molécula de frutano. A frutano 1-exohidrolase (1-FEH, EC 3.2.1.153) realiza a hidrólise de frutanos por meio da retirada gradativa da ligação terminal β (2,1) não redutora da molécula; a enzima degrada apenas frutanos, sendo incapaz de degradar sacarose (VAN DEN ENDE *et al.*, 2002). A invertase (INV, EC 3.2.1.26) hidrolisa a sacarose, disponibilizando glicose e frutose para posterior utilização em importantes processos metabólicos (ROOVER *et al.*, 1999; ROITSCH *et al.*, 2003).

A ocorrência de frutanos nos vegetais está relacionada aos mecanismos de sobrevivência das plantas em estações frias e secas, indicando a importância desses carboidratos nessas condições (RITSEMA & SMEEKENS, 2003). Além da atuação como molécula de reserva, os frutanos desempenham importante papel como antioxidantes (PESHEV *et al.*, 2013); na estabilização de membranas (HINCHA *et al.*, 2000; VEREYKEN *et al.*, 2001; HINCHA *et al.*, 2002; RITSEMA & SMEEKENS, 2003) e na redução do potencial osmótico das células (BIELESKI, 1993; VERGAUWEN *et al.*, 2000).

Nesse sentido, os estudos sobre o metabolismo de frutanos e sobre as enzimas que possibilitam sua síntese e utilização, fornecem subsídios para compreensão dos mecanismos fisiológicos de sobrevivência, utilizados por espécies do Cerrado em condições adversas.

2 JUSTIFICATIVA

A significativa atuação dos frutanos na proteção e resistência dos vegetais submetidos a condições de estresse têm impulsionado os estudos sobre as propriedades e funcionalidades desses carboidratos. Para isso, o estudo das enzimas que participam do metabolismo dos frutanos torna-se primordial, já que as etapas do metabolismo são determinadas por essas proteínas e, em decorrência de importantes atuações no mecanismo de defesa das plantas e de seu potencial de utilização, os frutanos são interessantes do ponto de vista científico.

Condições abióticas como redução de água e o excesso de frio propiciaram um ambiente evolutivo que conduziu à adaptação para a síntese e acúmulo de frutanos nas plantas (HENDRY

& WALLACE, 1993). O metabolismo de frutanos mediado pelas frutossiltransferases resultou em mecanismos de resistência e adaptação das espécies presentes em ambientes de clima frio e seco. Isso pode ser observado quando verificam-se alterações no grau de polimerização das moléculas de inulina, as quais ocorrem em diferentes fases fenológicas de uma mesma espécie. Em *Cichorium intybus*, *Helianthus tuberosus*, *Chrysolaena obovata* e *Aldama discolor* (Backer) E. Schiller & Panero (anteriormente nomeada *Viguiera discolor* Backer), o grau de polimerização varia com a fase fenológica, predominando oligossacarídeos nas fases de brotação e floração e polissacarídeos na fase de dormência. Neste sentido, compreender o padrão do metabolismo de frutanos em *C. exsucca* permite verificar a influência da fenologia nos mecanismos de resistência e adaptação dessa espécie.

A inulina é o tipo de frutano mais conhecido e estudado, encontrado em várias espécies de Asteraceae (Van den Ende & Van Laere, 2002). É um carboidrato de reserva muito utilizado em dietas de baixa caloria substituindo o açúcar, já que contém baixo índice calórico (Carvalho *et al.* 2007). Na indústria farmacêutica inulina é utilizada para prevenção de doenças intestinais, por meio da produção de prebióticos e, também, utilizada para tratamento da osteoporose (Carvalho *et al.* 2007; Kinget *et al.* 1998; Tomomatsu, 1994). Assim, novas fontes de inulina podem ser estudadas para aplicações biotecnológicas (Carvalho *et al.* 2007).

O estudo da enzima 1-FEH torna-se promissor, visto que, FEHs são encontradas em plantas produtoras e não produtoras de frutanos (VAN DEN ENDE *et al.*, 2003b; CONINCK *et al.*, 2007). Em *C. obovata*, a enzima é estimulada em condições de frio e, principalmente, desfolha. As espécies *C. intybus*, *P. sonchifolia* e *A. discolor* apresentaram intensificação da atividade de 1-FEH sob o efeito de desfolha, nas quais as condições de estresse favorecem a significativa atuação de 1-FEH.

Não há estudos sobre o metabolismo de frutanos em *Chresta exsucca*, portanto, conhecer o funcionamento e as propriedades que regulam seu metabolismo é fundamental para compreender os mecanismos de sobrevivência e reprodução de espécies que vivem em condições de Cerrado, além de possibilitar o manejo e produção desses carboidratos. A espécie apresenta fenologia distinta se comparada a outras espécies de Asteraceae, visto que a fase de floração ocorre em período de seca e a fase de senescência em período chuvoso.

Esse fator ressalta a importância da continuidade dos estudos a respeito das enzimas que participam do metabolismo de frutanos em espécies do Cerrado, visto que tais carboidratos contribuem para mecanismos fisiológicos de resistência a estresse e condições adversas. Além disso, frutanos do tipo inulina são promissores para utilização na indústria alimentícia e farmacêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as variações no metabolismo de frutanos nos órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca* DC. ocorrente no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros (GO) em diferentes fases fenológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as variações quantitativas e qualitativas dos frutanos nas raízes de *C. exsucca* em diferentes fases fenológicas.

Determinar as condições ótimas de atividade como tempo, temperatura e pH para as enzimas (1-SST, 1-FEH e invertase) nessa espécie;

Verificar as variações da atividade da enzima 1-FEH em diferentes fases fenológicas.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 ORIGEM DAS FRUTOSILTRANSFERASES

Os frutanos e as principais enzimas envolvidas em seu metabolismo são encontrados no vacúolo celular (FREHNER *et al.*, 1984) podendo, também, ocorrer no apoplasto (VAN DEN ENDE *et al.*, 2005b; LIVINGSTON & HENSON, 1998). Acredita-se que ancestrais das invertases vacuolares originaram as frutosiltransferases capazes de metabolizar os frutanos (RITSEMA *et al.*, 2006). A provável origem das enzimas SST e FFT são as invertases do tipo vacuolar, ao passo que FEHs originaram a partir das invertases da parede celular (RITSEMA & SMEEKENS, 2003; VALLURU & VAN DEN ENDE, 2008).

Ao traçar a filogenia das frutosiltransferases, sugere-se que as enzimas envolvidas na síntese de frutanos evoluíram independentemente em monocotiledôneas e dicotiledôneas (VAN DEN ENDE *et al.*, 2002). Ancestrais de invertases vacuolares de plantas não produtoras de frutanos, duplicaram-se em invertases vacuolares I e II, provavelmente antes da divisão em monocotiledôneas e dicotiledôneas. A partir de invertases vacuolares do tipo II, formas precursoras de 1-SST especializaram-se em diferentes formas autênticas de 1-SSTs e, também, 1-FFT (VAN DEN ENDE, 2013). As invertases vacuolares do tipo I são relacionadas à origem

de 6-SST e 6-SFT (sacarose: frutano 6-frutosiltransferase) em *Pachysandra terminalis* Siebold & Zucc., uma eudicotiledônea basal. Esse fato é considerado um marco evolutivo recente e confirma a origem polifilética das enzimas que fazem parte do metabolismo de frutanos (VAN DEN ENDE *et al.*, 2011). A origem das enzimas que possibilitam a biossíntese de frutanos pode ter ocorrido em pelo menos quatro momentos durante o processo de diversidade evolutiva das plantas, a partir de seis táxons em que sabidamente há acúmulo de frutanos: chicória, trigo, azevém, cebola, *Agave* e *Pachysandra* (VAN DEN ENDE, 2013).

As enzimas FEHs e as invertases da parede celular podem ter originado a partir de um mesmo ancestral (β -frutosidase) por esse motivo, determinadas enzimas FEHs atuam no apoplasto (LIVINGSTON & HENSON, 1998; VAN DEN ENDE *et al.*, 2005a; LE ROY *et al.*, 2008). FEHs e invertases são muito similares em estrutura, mesmo que apresentem funcionalidades enzimáticas e preferências por substratos distintas (frutanos e sacarose, respectivamente), as sequências de aminoácidos dessas enzimas são altamente homólogas (VAN DEN ENDE *et al.*, 2002; CONINCK *et al.*, 2005).

4.2 ENZIMA DE SÍNTESE DA 1-CESTOSE: 1-SST

A 1-SST é a enzima que catalisa a formação do trissacarídeo 1-cestose. A partir da sacarose, a 1-SST transfere uma molécula de frutose para o carbono-1 da frutose de outra molécula de sacarose, resultando na síntese de 1-cestose e liberando glicose (VAN LAERE & VAN DEN ENDE, 2002). Portanto a 1-SST é a enzima da etapa inicial de síntese da série da inulina, produzindo 1-cestose e glicose a partir de elevadas concentrações de sacarose (VAN DEN ENDE *et al.*, 1996). A atividade da 1-SST é estimulada na presença de fotoassimilados, pois o aumento na concentração de sacarose poderia induzir o gene regulador de 1-SST (CARVALHO *et al.*, 2007).

Em gramíneas, a atividade enzimática de 1-SST foi detectada em *Hordeum vulgare* (cevada) (SIMMEN *et al.*, 1993). Após exposição à luz contínua, as folhas excisadas da espécie apresentaram significativo acúmulo de carboidratos. Durante as primeiras horas de iluminação, o principal carboidrato encontrado foi a sacarose; os níveis de glicose e frutanos aumentaram nas horas seguintes. A presença de 1-cestose foi predominante no início da exposição, evidenciando a ação da enzima 1-SST (SIMMEN *et al.*, 1993). Ainda nesse estudo, foi detectada a atividade da invertase, havendo formação de glicose e frutose, mas sem formação de trissacarídeos. Caracterizou-se dois tipos de invertases, sendo denominadas invertases I e II. A atividade ótima de invertase I, por exemplo, ocorreu em temperatura de 30°C e invertase II em temperatura de

45°C. Sugere-se que a invertase possa atuar como uma enzima frutosidase, enzima responsável pela hidrólise de oligossacarídeos, bem como fructosiltransferase (SIMMEN *et al.*, 1993).

Em eudicotiledôneas, *Aldama discolor* acumula até 80% de frutanos em sua massa seca, com predominância de polissacarídeos. A atividade de 1-SST foi caracterizada pela síntese de 1-cestose, a partir da sacarose, sendo que a temperatura ótima de atividade foi de 30°C e o pH 6. Nessa espécie a 1-SST apresenta aumento de atividade no início da dormência das raízes, portanto sua atividade é influenciada pela fenologia (ITAYA *et al.*, 1999).

Em *C. obovata* verificou-se que a atividade de 1-SST é distribuída de forma desigual nos rizóforos da espécie, nos quais altos valores de atividade são registrados em tecidos jovens, na região distal do órgão e valores reduzidos de atividade da enzima em regiões proximais. Além disso, verificou-se alto conteúdo de fruto-oligossacarídeos na região distal, detectados em todas as fases de desenvolvimento (salvo brotação), caracterizando tais tecidos como aptos para síntese de frutanos e possibilitando a alta atividade de 1-SST nessa região ao longo de quase todo o ciclo de desenvolvimento da planta (PORTES & CARVALHO, 2006).

Os brotos de *Cichorium intybus* (chicória) não apresentam atividade de sacarose: sacarose 1 fructosiltransferase (1-SST), todavia, após submissão à seca observa-se aumento da atividade de 1-SST e conseqüente elevação da concentração de frutanos nas raízes e folhas da planta (ROOVER *et al.*, 2000). Seca e redução da quantidade nitrato também induzem atividade de 1-SST nessa espécie (AMEZIANE *et al.*, 1997; ROOVER *et al.*, 2000). De acordo com Van den Ende & Van Laere (1996), a atividade de 1-SST está relacionada ao crescimento da raiz de chicória, pois a ação da enzima diminui gradualmente ao longo da estação de crescimento, sendo que, ao cessar o crescimento da raiz, a atividade de 1-SST também é interrompida.

Nesse sentido, em resposta a condições de baixas temperaturas, altas concentrações de gás carbônico, deficiência de oxigênio nos tecidos ou excisão de folhas, os frutanos podem desempenhar importantes funções fisiológicas, sendo a atuação de 1-SST primordial para iniciar a síntese da série da inulina (ALBRECHT *et al.*, 1993; PERSON & CAIRNS, 1994; SMART *et al.*, 1994).

4.3 ENZIMA DE PROCESSAMENTO DA MOLÉCULA DE INULINA: 1-FFT

A enzima 1-FFT catalisa a transferência de resíduos de frutose entre moléculas de frutanos e sua atividade contribui para o grau de polimerização médio. As diferentes espécies de vegetais podem apresentar inulina com distintos graus de polimerização.

A inulina armazenada em *Cichorium intybus* e *H. tuberosus* apresenta grau de polimerização GP em torno de 35 (POLLOCK *et al.*, 1996) e *Chrysolaena obovata* possui GP em torno de 40, podendo ocorrer variações entre as fases fenológicas (CARVALHO *et al.*, 1998; PORTES *et al.*, 2008). Os órgãos subterrâneos de *Polymnia sonchifolia* apresentam inulina com grau de polimerização médio menor que 10 (OHYAMA *et al.*, 1990). Padrões de distribuição de inulina purificada (livre de sais e outras proteínas) foram determinados em análises por cromatografia de permeação em gel. Observou-se que 76% da inulina de *H. tuberosus* apresentou GP superior a 40. Em *Dahlia variabilis* Hort. 65% das amostras de inulina apresentaram alto GP e, em *Cynara scolymus* L., registrou-se 100% de moléculas de inulina purificada com GP superior a 40 (PRAZNIK & BECK, 1985). Tais informações ressaltam que diferentes graus de polimerização ocorrem em distintas espécies, condição modulada por 1-FFT.

Em *A. discolor*, o grau de polimerização médio da inulina é de 150 (ISEJIMA & FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993). Inulina com alto grau de polimerização também é encontrada em *Echinops ritro* L. (VERGAUWEN *et al.*, 2003) e *Cynara scolymus* (PRAZNIK & BECK, 1985; HELLWEGE *et al.*, 1998).

Acredita-se que as características da 1-FFT são as responsáveis pelas diferenças no GP entre as espécies. Diferenças nas afinidades de 1-FFT por um substrato doador ou receptor resultam em diferentes graus de polimerização na série de inulina (CARVALHO *et al.*, 2007; LIVINGSTON *et al.*, 2009). As características da 1-FFT de cada espécie são fundamentais para regulação do grau de polimerização dos frutanos, o qual pode ser influenciado por fatores ambientais. (ITAYA *et al.*, 1997).

Os genes que codificam 1-FFT de *H. tuberosus* e *C. scolymus* introduzidos em protoplastos de tabaco (*Nicotiana sp.*) mostraram que a inulina produzida por 1-FFT de *C. scolymus* foi maior que a inulina resultante em *H. tuberosus*, pela mesma enzima. Esse resultado indica que as características da 1-FFT determinam o comprimento da cadeia de inulina a ser sintetizada nestas espécies (HELLWEGE *et al.*, 1998).

A 1-FFT também pode atuar na redução do grau de polimerização dos frutanos, uma vez que modifica o tamanho e a distribuição desses compostos (LASSEUR *et al.*, 2006); normalmente, a enzima mantém níveis constantes de atividade, o que favorece a ação da enzima também na redução da cadeia de frutanos durante a mobilização e auxiliando a atuação da atividade de 1-FEH (CARVALHO *et al.*, 2007).

Em chicória, a ausência de atividade da 1-SST induz 1-FFT a utilizar a sacarose como substrato receptor para unidades de frutossil dos frutanos com alto grau de polimerização,

contribuindo para resistência ao frio e facilitando a hidrólise de inulina (VAN LAERE & VAN DEN ENDE, 2002).

No estudo comparativo da sequência de aminoácidos da 1-FFT de *A. discolor* (que acumula inulina com alto GP) e *H. tuberosus* (que acumula inulina com GP médio de 35), verificou-se mais de 90% de semelhança entre as duas espécies (DE SADELEER *et al.*, 2015). Após alteração de aminoácidos nas posições M19F e H308T no sítio ativo da 1-FFT de *A. discolor*, verificou-se a redução na capacidade de produção de moléculas de inulina com alto grau de polimerização, indicando que o GP depende da correta sequência desses aminoácidos em 1-FFT (DE SADELEER *et al.*, 2015).

Além disso, 1-FFT atua em condições específicas, sendo variáveis entre diferentes espécies. Em *Chrysoleaena obovata* o tempo de reação para 1-FFT foi de 6 horas e a temperatura 30 °C (ASEGA & CARVALHO, 2004; PORTES *et al.*, 2008). Em *Cichorium intybus* o melhor pH para atividade da enzima foi de 5,2, temperatura 30 °C e tempo ótimo de 60 minutos (KUSCH *et al.*, 2009). Em *H. tuberosus* o melhor pH para atividade da enzima foi de 5,5 e temperatura 25 °C (KOOPS & JONKER, 1994).

4.4 ENZIMA DE HIDRÓLISE DA MOLÉCULA DE FRUTANO: 1-FEH

As plantas que acumulam frutanos normalmente ocorrem em locais sujeitos ao frio e/ou seca (HENDRY & WALLACE, 1993). Em situações de estresse, a planta necessita utilizar frutose livre para realizar processos metabólicos, como crescimento e reprodução; assim, a degradação dos frutanos é necessária. A hidrólise de frutanos é possível pela ação da enzima frutano exohidrolase (1-FEH) (EDELMAN & JEFFORD, 1968; FREHNER *et al.*, 1984). A 1-FEH transfere uma unidade terminal de frutosil, a partir de um frutano, para a água. As 1-FEHs diferem-se das invertases pelo substrato utilizado, enquanto a 1-FEH utiliza frutanos, a invertase utiliza sacarose como substrato principal (VERHAEST *et al.*, 2007).

FEHs desempenham funções importantes nas plantas que sintetizam frutanos: hidrolisam as reservas de frutanos (VAN DEN ENDE *et al.*, 2001), o que aumenta a quantidade de frutose livre e a concentração de frutanos com baixo GP, sob condições de estresse (VAN LAERE & VAN DEN ENDE, 2002) e fornece substrato para obtenção de energia e crescimento em fases de alta demanda.

Desse modo, a produção de oligossacarídeos, possibilita a redução do potencial osmótico (BIELESKI, 1993; VERGAUWEN *et al.*, 2000) e contribui para tolerância ao frio por meio da

estabilização de membranas (HINCHA *et al.*, 2000). Assim, a enzima atua na determinação do padrão e do grau de polimerização final dos frutanos (VAN DEN ENDE *et al.*, 2003a).

Edelman & Jefford (1964) indicaram possível atividade de duas enzimas 1-FEHs em *H. tuberosus*. Claessens *et al.* (1990) também sugeriram a ocorrência de uma segunda enzima 1-FEH, contudo, apenas mais tarde descreveu-se a purificação de 1-FEHII em raízes de chicória (ROOVER *et al.*, 1999). A enzima purificada foi capaz de hidrolisar ligações β (2,1) em inulina e a frutose não interferiu nas atividades de 1-FEHII. Todavia, a sacarose inibiu significativamente sua ação, demonstrando que trata-se, de fato, de uma enzima frutano exohidrolase e não de uma invertase, à qual necessita de sacarose como substrato (ROOVER *et al.*, 1999).

Diferentes tipos de FEHs são conhecidas em plantas produtoras e não produtoras de frutanos, como: 1-FEH, 6-FEH e 6&1-FEH (CONINCK *et al.*, 2007). 6-FEH foi caracterizada em *Beta vulgaris* L., espécie que não produz frutanos. Embora a função dessa enzima não esteja bem definida, foi proposto que sua atividade pode estar ligada à defesa contra patógenos (VAN DEN ENDE *et al.*, 2003b). Efeitos de desfolha na indução de atividade de 1-FEH também foram estudados e verificados em *P. sonchifolia* (FUKAI *et al.*, 1997) e *A. discolor* (DEGASPERI *et al.*, 2003).

FEHs têm sido clonadas a partir de chicória e trigo. As enzimas são ativadas em condições que causam a degradação de frutanos. A ativação de 1-FEH, nomeada 1-FEHI, está condicionada ao frio (ROOVER *et al.*, 1999). Contudo, a expressão de 1-FEHII é induzida tanto pelo frio quanto pela desfolha (VAN DEN ENDE *et al.*, 2001; VAN LAERE & VAN DEN ENDE, 2002). No trigo, as duas isoformas degradam ligações do tipo β (2,1) (VAN DEN ENDE *et al.*, 2003a). 1-FEHI e 1-FEHII possuem 98% de similaridade, todavia, algumas propriedades são diferenciadas entre essas enzimas, 1-FEHI, por exemplo, é inibida em maior intensidade na presença de sacarose (ROOVER *et al.*, 1999); o peso molecular também é distinto, em *C. intybus*, o peso molecular de 1-FEHI é de 68kDa (CLAESSENS *et al.*, 1990) e de 1-FEHII foi estimado em 64kDa (ROOVER *et al.*, 1999).

Com base nos estudos de Roover *et al.* (1999), duas isoformas de enzimas independentes e ativas foram purificadas e nomeadas 1-FEHIIa e 1-FEHIIb (VAN DEN ENDE *et al.*, 2001). As isoformas 1-FEHIIa e 1-FEHIIb foram purificadas a partir de raízes de chicória (*C. intybus*) e de folhas de endívia belga (*Cichorium endivia* L.), esta apresenta altas concentrações de 1-FEHIIa (VAN DEN ENDE *et al.*, 2001). Verhaest *et al.* (2005) descreveram a estrutura de 1-FEHIIa em chicória, a enzima apresenta atividade acentuada na espécie quando ocorre a desfolha, indicando

que esta enzima pode ser estimulada em qualquer fase do desenvolvimento, sempre que necessário (ROOVER *et al.*, 1999; VAN DEN ENDE *et al.*, 2001).

Em *C. obovata*, 1-FEH também foi clonada e caracterizada (ASEGA *et al.*, 2008). A enzima foi detectada em rizóforos da espécie na fase de brotação e realizou hidrólise predominantemente de ligações tipo β (2,1). A atividade enzimática de 1-FEH em *C. obovata* foi inibida em 81% na presença de sacarose. Desfolha e baixa temperatura também induziram atividade de 1-FEH na espécie (ASEGA & CARVALHO, 2004; PORTES & CARVALHO, 2006; ASEGA *et al.*, 2008). As condições para os ensaios com 1-FEH em diferentes espécies estão na tabela 1.

Tabela 1 Condições ótimas para a atividade enzimática de 1-FEH em diferentes espécies. Fatores: tempo de reação, temperatura de incubação e pH.

Espécie	Tempo de reação	Temperatura	pH	Artigo
<i>Cichorium intybus</i>	1 h	35 °C	5,5	KUSCH <i>et al.</i> ,2009
<i>Chrysolaela obovata</i>	2 h	40 °C	5,5	ASEGA & CARVALHO, 2004
<i>Helianthus tuberosus</i>	1 h	40 °C	5,2	MARX <i>et al.</i> , 1997
<i>Triticum aestivum</i>	1 h	30 °C	-	VAN DEN ENDE <i>et al.</i> , 2003a

4.5 ENZIMA DE HIDRÓLISE DA SACAROSE: INVERTASE

As invertases desempenham função essencial no metabolismo da sacarose, sendo capaz de hidrolisá-la (ROOVER *et al.*, 1999; VERHAEST *et al.*, 2007). A enzima possui genes silenciosos e genes expressos que são induzidos em locais e durações altamente específicos (GODT & ROITSCH, 1997; STURM, 1999). Nos vegetais, as invertases são classificadas em apoplásticas, citoplasmáticas ou vacuolares (STURM, 1999). As invertases localizadas no apoplasto e no vacúolo desempenham funções fundamentais no metabolismo das plantas e são classificadas como invertases do tipo ácidas (ROITSCH *et al.*, 2003). Ao hidrolisar irreversivelmente a sacarose, as invertases apoplásticas possibilitam a liberação de monossacarídeos, os quais são transportados para o interior da célula e disponibilizados rapidamente, de acordo com a necessidade da planta (ROITSCH *et al.*, 2003).

A atividade das invertases possibilita aumento da pressão osmótica das células, estimulando o alongamento das células e crescimento do vegetal (GIBEAUT *et al.*,1990). Genes de invertases ácidas têm sido relacionados à regulação de fermentos em plantas, como em tubérculos de *Ipomoea batatas* Lam. (batata doce) (MATSUSHITA & URITANI, 1974) e no ápice das raízes de *Daucus carota* L. (cenoura selvagem) (STURM & CHRISPEELS, 1990), nas

quais após ferimentos ou tecidos envelhecidos, aumento na expressão gênica e na atividade de invertases apoplásticas foi detectado. A correlação entre o aumento na atividade de invertase e a incidência de patógenos também foi estudada (STURM & CHRISPEELS, 1990).

As invertases também podem atuar em conjunto com fitormônios, exercendo importantes funções no metabolismo primário das plantas (ROITSCH *et al.*, 2003); auxiliando em seu desenvolvimento por meio da regulação da fotossíntese e em respostas a estímulos externos, como estresse (ROITSCH & GONZÁLEZ, 2004). Giberelinas promovem alongamento das células e são fundamentais para indução da floração. Esse hormônio tem sido relacionado ao aumento de atividade de invertase em vários órgãos de plantas como caule de cana-de-açúcar (SACHER *et al.*, 1963), tubérculos de alcachofra de Jerusalém (EDELMAN & HALL, 1964), beterraba (PALMER, 1966), hipocótilos de lentilha (SEITZ & LANG, 1968) e entrenós de feijão (MORRIS & ARTHUR, 1985) e aveia (KAUFMAN *et al.*, 1973). Além de giberelinas, outros fitormônios atuam em conjunto com as invertases. As citocininas são relacionadas ao crescimento do vegetal e contribuem com maior disponibilidade de carboidratos; os brassinosteróides estimulam a atividade de invertases ácidas; o ácido abscísico aumenta atividade de invertases e, ainda, o etileno estimula a redução da atividade das invertases (possivelmente para estímulo da frutificação por meio da ativação de outras enzimas). A regulação de invertases pelos fitormônios está interligada à capacidade de defesa da planta em respostas a ataques de patógenos ou outros danos (ROITSCH *et al.*, 2003).

Em *Cichorium intybus*, invertase apresenta ótimo de atividade em pH 5,2, temperatura 30°C e tempo de 60 minutos (KUSCH *et al.*, 2009). Em *Chrysolina obovata* o pH ótimo é 5,5, temperatura é de 30 °C e o tempo ótimo de reação 4 horas (ASEGA & CARVALHO, 2004).

4.6 INULINA: ANÁLISES FUNCIONAIS

A inulina é o tipo de frutano mais conhecido e estudado (VAN LAERE & VAN DEN ENDE, 2002). É um carboidrato com diversas aplicações na indústria (CARVALHO *et al.*, 2007) e de significativa utilidade em mecanismos de defesa, podendo atuar como antioxidante (PESHEV *et al.*, 2013); na estabilização de membranas (HINCHA *et al.*, 2000; VEREYKEN *et al.*, 2001; HINCHA *et al.*, 2002; RITSEMA & SMEEKENS, 2003) e na redução do potencial osmótico das células (BIELESKI, 1993; VERGAUWEN *et al.*, 2000).

A atuação da inulina como antioxidante é fundamental para conservação e proteção do vegetal em condições de estresse (PESHEV *et al.*, 2013). Fatores bióticos e abióticos como excesso de luz, desequilíbrio de nutrientes, seca e herbivoria podem causar o estresse oxidativo,

resultando na intensificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (PESHEV *et al.*, 2013). Essas moléculas reativas são bastante tóxicas aos vegetais (ELSTNER & OSSWALD, 1994), são produzidas principalmente durante a respiração e a fotossíntese (MOLLER, 2001). As EROs podem induzir a degradação oxidativa dos lipídeos, alterando a conformação da membrana plasmática e desintegrando-as; bem como oxidar DNA e proteínas. Nesse sentido, os frutanos, principalmente do tipo inulina, exercem a função de antioxidantes, capturando EROs e impedindo que danos sejam causados à célula (PESHEV *et al.*, 2013). No que se refere à estabilização de membranas, a inulina com grau médio de polimerização estabiliza lipossomos durante estresse, interagindo com os lipídios da membrana e resultando em efeitos de proteção celular (HINCHA *et al.*, 2000; VEREYKEN *et al.*, 2001; HINCHA *et al.*, 2002).

A participação do metabolismo de frutanos na redução do potencial osmótico foi demonstrada durante a expansão das pétalas de *Hemerocallis* sp. e de *Campanula rapunculoides* L. Quando ocorre a hidrólise dos frutanos, há redução no potencial osmótico, o que leva à redução no potencial hídrico para direcionar o movimento da água, necessária para o alongamento celular (BIELESKI, 1993; VERGAUWEN *et al.*, 2000).

4.7 VARIAÇÃO DE FRUTANOS DEVIDO À SAZONALIDADE

O Cerrado, considerado um dos 25 *hotspots* mundiais, é reconhecido por altos índices de biodiversidade (MYERS *et al.*, 2000). É o 2º maior bioma brasileiro e ocupa cerca de 23% do território nacional (RATTER *et al.*, 1997). Tal representatividade é possível em decorrência de inúmeros mecanismos adaptativos adquiridos ao longo do processo evolutivo. Os vegetais desenvolveram estratégias de sobrevivência que tornaram possível a perpetuação das espécies em condições típicas do Cerrado.

A sazonalidade climática exerce influência sobre fenologia da planta e, conseqüentemente, no metabolismo de frutanos. Declínio de frutanos e aumento na concentração de frutose ocorrem durante a brotação e floração de *Chrysolaena obovata*, já no período de dormência, maiores quantidades de frutanos foram registradas (CARVALHO & DIETRICH, 1993). Em *Taraxacum officinale* L. registrou-se alteração no grau de polimerização dos frutanos com a chegada da estação seca, havendo aumento da frutose e diminuição de frutanos com alto grau de polimerização (WILSON *et al.*, 2001). Em espécies como *Gomphrena macrocephala*, *Aldama discolor* e *Chrysolaena obovata*, por exemplo, a brotação ocorre no início do período chuvoso e a floração no período com maior índice de precipitação; durante o período de seca, essas espécies encontram-se na fase de dormência do sistema subterrâneo (CARVALHO &

DIETRICH, 1993; ISEJIMA & FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993; VIEIRA & FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1993). Nesse sentido, a ocorrência de chuvas constitui um dos principais fatores para mudanças fenológicas nos vegetais (CHAMBERS *et al.*, 2013). Em *Ichthyothere terminalis*, observou-se que a sazonalidade exerce maior influência no controle do metabolismo de frutanos do que a fenologia (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Portanto, o armazenamento de carboidratos é fundamental para o ideal desenvolvimento da planta durante as variações de temperatura, disponibilidade hídrica e/ ou estresse ao longo do ano. Esse estoque energético possibilita eficaz recuperação da biomassa e desenvolvimento do vegetal após determinado estresse ou condição adversa (SUZUKI & STUEFER, 1999).

4.8 GÊNERO *Chresta*

Chresta é um gênero adaptado às condições áridas do cerrado, campo limpo e campo rupestre, em elevações de 500 a 2400 m (MACLEISH, 1985). Essas condições ocorrem na região da Chapada dos Veadeiros, região que foi formada durante o período Quaternário e tornou-se local de refúgio para várias populações de organismos no Pleistoceno. MacLeish (1985) afirma que é possível que a região da Chapada dos Veadeiros tenha sido o alicerce para dispersão e diversificação de espécies de *Chresta*. Esta unidade de conservação apresenta importante riqueza de biodiversidade e endemismo de espécies (MUNHOZ & FELFILI, 2006).

Chresta exsucca é um subarbusto com folhas alternas espiraladas, sésseis, lâmina foliar elíptica. Sinflorescência corimbiforme, flores são lilás e o fruto é do tipo cipsela. Um indivíduo pode atingir até 2 metros de altura. No Brasil são reportadas 15 espécies para o gênero *Chresta*, sendo 14 endêmicas e oito são restritas ao Cerrado. Dentre essas 15 espécies, apenas *C. exsucca* ocorre, também, na Bolívia (SINISCALCHI, 2016). A espécie ocorre com predominância na região Centro-Oeste do Brasil (BFG, 2015).

Os sistemas subterrâneos de *Chresta* podem ser distintos entre as espécies. *Chresta curumbensis* (Philipson) H.Rob. apresenta raízes tuberosas, enquanto que *Chresta sphaerocephala* DC. possui sistema difuso (APPEZZATO-DA-GLÓRIA *et al.*, 2008). Em *C. exsucca* observa-se um padrão prioritariamente tuberoso, contudo, alguns indivíduos apresentam sistema difuso, observado em rebrotas.

Chresta sphaerocephala foi documentada como a espécie mais frequente em fragmentos de Cerrado (ALMEIDA *et al.*, 2005). A espécie acumula frutanos do tipo inulina no parênquima cortical e vascular das raízes laterais e um único indivíduo pode ocupar uma área de até 10 metros de diâmetro (APPEZZATO *et al.*, 2008).

Chresta curumbensis também apresenta longas cadeias de frutanos do tipo inulina (GP >50) no sistema subterrâneo (JOAQUIM *et al.*, 2014). *C. curumbensis* apresentou 25% de carboidratos solúveis na massa seca e cristais de inulina foram visualizados no cilindro vascular, especificamente no parênquima de reserva das raízes tuberosas. Esses fatores podem estar relacionados às estratégias adaptativas da planta em condições de seca e fogo (JOAQUIM *et al.*, 2014).

C. exsucca é fonte promissora de compostos bioativos. A composição química de extratos brutos inclui esteróides, triterpenos e flavonóides (SCHINOR *et al.*, 2006). Além disso, atividade tripanocida, leishmanicida, antibacteriana e antifúngica foram estudadas, mostrando resultado positivo no combate ao *Leishmania amazonensis* e inibindo o crescimento de cepas de bactérias como *Staphylococcus aureus penicilinase*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (SCHINOR *et al.*, 2006). Entretanto, os frutanos ainda não foram estudados nessa espécie e este trabalho é o primeiro a descrever os frutanos em uma espécie ocorrente no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros.

5 REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, G. *et al.* Fructan content of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) under hypoxia and following reoxygenation. **New Phytologist**, v. 123, p. 471-476. 1993.
- ALMEIDA, A. M. *et al.* Diversidade e ocorrência de Asteraceae em cerrados de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 5, p. 1-17. 2005.
- ALMEIDA, L. V.; FERRI, P. H.; SERAPHIN, J. C. MORAES, M. G. Seasonal changes of fructans in dimorphic roots of *Ichthyothere terminalis* (Spreng.) Blake (Asteraceae) growing in Cerrado. **Science of the Total Environment**, v. 598, p. 404-412. 2017.
- AMEZIANE, R. *et al.* Stage of development is an important determinant in the effect of nitrate on photoassimilate (13C) partitioning in chicory (*Cichorium intybus*). **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 25-33. 1997.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. *et al.* Underground systems of Asteraceae species from the Brazilian Cerrado. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 135, p. 103-113. 2008.
- ASEGA, A. F.; CARVALHO, M. A. M. Fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 313-319. 2004.
- ASEGA, A. F. *et al.* Cloning, characterization and functional analysis of 1-FEHcDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. **Plant Cell Physiology**, v. 49, p. 1185-1195. 2008.
- BANCAL, P.; CARPITA, N. C.; GAUDILLERE, J. P. Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis. **New Phytologist**, v. 120, p. 313-321. 1992.
- BATALHA, M. A.; MANTOVANI, W. Floristic composition of the cerrado in the Pé-de-Gigante Reserve (Santa Rita do Passa Quatro, Southeastern Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 15, p. 289-304. 2001.
- BIELESKI, R. Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower. **Plant Physiology**, v. 103, p. 213-219. 1993.
- BRAZIL FLORA GROUP (BFG). Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085-1113. 2015.
- CARVALHO, M. A. M.; DIETRICH, S. M. C. Variation in fructan contents in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. **New Phytologist**, v. 123, p. 735-740. 1993.
- CARVALHO, M. A. M.; PINTO, M. M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Inulin production by *Vernonia herbacea* is influenced by mineral fertilization and time of harvest. **Brazilian Journal of Botany**, v. 21, p. 275-280. 1998.

- CARVALHO, M. A. M.; ASEGA, A. F.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructans in Asteraceae from Brazilian Cerrado, p. 69-91. In **Recent advances in fructooligosaccharides research**. Edited by N. Shiomi, N. Benkeblia, and O. Shuichi. Research Signpost, Kerala. 2007.
- CHAMBERS, L. E *et al.* Phenological changes in the southern hemisphere. **Plos one**, v. 8, p. 10-22. 2013.
- CLAESSENS, G.; VAN LAERE, A.; DE PROFT, M. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 136, p. 35-39. 1990.
- CONINCK, B. DE.; VAN DEN ENDE, W.; LE ROY, K. Fructan exohydrolases (1-FEHs) in plants: properties, occurrence and 3-D structure, p. 157-180. In: Shiomi N, Noureddine B, Shuichi O, eds. **Recent advances in fructooligosaccharides research**. Trivandrum, India: Research Signpost. 2007.
- COUTINHO, L. M. Fire in the Ecology of the Brazilian Cerrado, p. 82-105. In J. G. Goldammer [ed.], **Fire in the tropical biota**. Springer-Verlag, Berlin, DE. 1990.
- COUTINHO, L. M. O bioma do cerrado, p. 77-91. In **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois** (A.L. Klein ed). Editora Unesp, São Paulo. 2002.
- CUZZUOL, G. R. F. *et al.* Crescimento e conteúdo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas à adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 81-91. 2003.
- DE SADELEER, E. *et al.* 1-FFT amino acids involved in high DP inulin accumulation in *Viguiera discolor* (Baker). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 616-624. 2015.
- DEGASPERI, M. I. *et al.* Fructan degradation and hydrolytic activity in tuberous roots of *Viguiera discolor* (Baker) (Asteraceae), an herbaceous species from the Cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 11-21. 2003.
- EDELMAN, J.; HALL, M. A. Effect of growth hormones on the development of invertase associated with cell wall. **Nature**, v. 201, p. 296-297. 1964.
- EDELMAN, J.; JEFFORD, T. G. The mechanism of fructose polymers in plants. 4. b-fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. **Biochemical Journal**, v. 93, p. 148-161. 1964.
- EDELMAN, J.; JEFFORD, T. G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. **New Phytologist**, v. 67, p. 517-531. 1968.
- EITEN, G. Delimitação do conceito de Cerrado. **Vegetatio**, v. 36, p. 169-178, 1977.
- ELSTNER, E. F.; OSSWALD, W. Mechanisms of oxygen activation during plant stress. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B. **Biological Sciences**, v. 102, p. 131-154. 1994.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. *et al.* Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 9, p. 159-166. 1986.

- FREHNER, M.; KELLER, F.; WIEMKEN, A. Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 116, p. 197-208. 1984.
- FUKAI, K. *et al.* Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 43, p. 171-177. 1997.
- GIBEAUT, D. M. *et al.* Cell wall and enzyme changes during graviresponse of the leaf-sheat pulvinus of oat (*Avena sativa*). **Plant Physiology**, v. 94, p. 411-416. 1990.
- GIBEAUT, D. M. *et al.* Cell wall and enzyme changes during graviresponse of the leaf-sheat pulvinus of oat (*Avena sativa*). **Plant Physiology**, v. 94, p. 411-416. 1990.
- GODT, D. E.; ROITSCH, T. Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. **Plant Physiology**, v. 115, p. 273-282. 1997.
- HELLWEGE, E. M. *et al.* Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 427, p. 25-28. 1998.
- HENDRY, G. A. F. The ecological significance of fructan in a contemporary flora. **New Phytologist**, v. 106, p. 201-216. 1987.
- HENDRY, G. A. F.; WALLACE, R. K. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: Suzuki M. & Chatterton, J. N. (eds.) **Science and Technology of fructan**. Boca Raton: CRC Press. 1993.
- HINCHA, D. K. *et al.* Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 535-540. 2000.
- HINCHA, D. K. *et al.* Specific effects of fructo and glucooligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. **Glycobiology**, v. 12, p. 103-110. 2002.
- ISEJIMA, E. M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructan variations in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae): the influence of phenology. **Plant Cell Physiology**, v. 34, p. 723-727. 1993.
- ITAYA, N. M.; BUCKERIDGE, M. S.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Biosynthesis in vitro of high-molecular-mass fructan by cell-free extracts from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). **New Phytologist**, v. 136, p. 53-60. 1997.
- ITAYA, N. M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; BUCKERIDGE, M. S. Synthesis of fructans by fructosyltransferase from the tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 435-442. 1999.
- JOAQUIM, E. O. *et al.* Inulin contents and tissue distribution in underground storage organs of Asteraceae species from the Brazilian rocky fields. **Botany**, v. 92, p. 827-836. 2014.

- KAUFMAN, P. B. *et al.* Regulation of invertase levels in avena stem segments by gibberellic acid, sucrose, glucose, and fructose. **Plant Physiology**, v. 52, p. 221-228. 1973.
- KINGET, R. *et al.* Colonic drug targeting. **Journal of Drug Targeting**, v. 6, p. 129–149. 1998.
- KOOPS, A. J.; JONKER, H. H. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* 'Colombia' 1-Fructan: fructan fructosyltransferase. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, p. 1623-1631. 1994.
- KUSCH, U. *et al.* Inhibitors of plant invertases do not affect the structurally related enzymes of fructan metabolism. **New Phytologist**, v. 181, p. 601-612. 2009.
- LASSEUR, B. *et al.* Molecular and functional characterization of a cDNA encoding fructan: fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT)/ fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 2719-2734. 2006.
- LE ROY, K. *et al.* Influencing the binding configuration of sucrose in the active sites of chicory fructan 1-exohydrolase and sugar beet fructan 6- exohydrolase. **New Phytologist**, v. 178, p. 572-80. 2008.
- LEWIS, D. H. Nomenclature and diagrammatic representation of oligomeric fructans – a paper for discussion. **New Phytologist**, v. 124, p. 583-594. 1993.
- LIVINGSTON, D. P.; CHATTERTON, N. J.; HARRISON, P. A. Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). **New Phytologist**, v. 123, p. 725-734. 1993.
- LIVINGSTON, D. P.; HENSON, C. A. Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second phase cold hardening. **Plant Physiology**, v. 116, p. 403-408. 1998.
- LIVINGSTON, D. P.; HINCHA, D. K.; HEYER, A. G. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. Review. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 2007-2023. 2009.
- MACLEISH, N. F. F. Revision of *Chresta* and *Pycnocephalum* (Compositae: Vernoniaeae). **Systematic Botany**, v. 10, p. 459-470. 1985.
- MARX, S. P.; NOSBERGER, J.; FREHNER, M. Seasonal variation of fructan-beta-fructosidase (FEH) activity and characterization of a beta (2,1) linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). **New Phytologist**, v. 135, p. 267-277. 1997.
- MATSUSHITA, K.; URITANI, I. Change in invertase activity of sweet potato in response to wounding and purification and properties of its invertases. **Plant Physiology**, v. 54, p. 60-66. 1974.
- MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561-591. 2001.

- MORRIS, D. A.; ARTHUR, E. D. Effects of gibberellic acid on patterns of carbohydrate distribution and acid invertase activity in *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v. 65, p. 257-262. 1985.
- MUNHOZ, C. B. R.; FELFILI, J. M. Floristics of the herbaceous and subshrub layer of a moist grassland in the Cerrado biosphere reserve (Alto Paraíso de Goiás), Brazil. **Journal of Botany**, v. 63, p. 343–354. 2006.
- MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858. 2000.
- OHYAMA, T. *et al.* Composition of storage carbohydrate in tubers of yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 36, p. 167-171. 1990.
- PALMER, J. M. The influence of growth regulating substances on the development of enhanced metabolic rates in thin slices of beetroot storage tissue. **Plant Physiology**, v. 41, p. 1173-1178. 1966.
- PERSON, S. P.; CAIRNS, A. J. Fructan biosynthesis in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.): a comparison of the de novo synthesis in vivo and in vitro. **New Phytologist**, v. 128, p. 395-402. 1994.
- PESHEV, D. *et al.* Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 1025-1038. 2013.
- POLLOCK, C. J. *et al.* Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants, p. 97-113. In: Zamsk, E.; Shaffer, A. A. (Eds) **Photoassimilate Distribution in Plants and Crops – Source and Sink Relationships**, New York: A.A. Marcel Dekker Inc, 1996.
- PORTES, M. T.; CARVALHO, M. A. M. Spatial distribution of fructans and fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby in different developmental phases. **Plant Science**, v. 170, p. 624-633. 2006.
- PORTES, M. T.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; CARVALHO, M. A. M. Low temperature and defoliation affect fructan-metabolizing enzymes in different regions of the rhizophores of *Vernonia herbacea*. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1572-1581. 2008.
- PRAZNIK, W.; BECK, R. H. F. Application of gel permeation chromatographic systems to the determination of the molecular weight of inulin. **Journal of Chromatography**, v. 348, p. 187-197. 1985.
- RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230. 1997.
- RITSEMA, T.; SMEEKENS, S. Fructans: beneficial for plants and humans. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 223-230. 2003.
- RITSEMA, T. *et al.* Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose- binding box. **The Plant Journal**, v. 48, p. 228-237. 2006.

- ROITSCH, T. *et al.* Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 513-524. 2003.
- ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M. Function and regulation of plant invertases: Sweet sensations. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 606-613. 2004.
- ROOVER, J. DE. *et al.* Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus* L. **Physiology Plant**, v. 106, p. 28-34. 1999.
- ROOVER, J. DE. *et al.* Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). **Belgium Plant**, v. 210, p. 808-814. 2000.
- ROSSATTO, D. R.; STERNBERG, L. S. L.; FRANCO, A. C. The partitioning of water uptake between growth forms in a Neotropical savanna: do herbs exploit a third water source niche? **Plant Biology**, v. 15, p. 84-92. 2013.
- SACHER, J. A.; HATCH, M. D.; GLASZIOU, K. T. Regulation of invertase synthesis in sugar cane by auxin and sugar-mediated control system. **Physiology Plantarum**, v. 16, p. 836-842. 1963.
- SEITZ, K.; LANG, A. Invertase activity and cell growth in lentil epicotyls. **Plant Physiology**, v. 43, p. 1075-1082. 1968.
- SCHINOR, E. C. *et al.* Biological activities and chemical composition of crude extracts from *Chresta exsucca*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 83-90. 2006.
- SHIOMI, N. Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in liliaceous plants. **Journal Plant Physiology**, v. 134, p. 151-155. 1989.
- SHIOMI, N. *et al.* Structure of fructan polymers from tuberous roots of *Gomphrena macrocephala* (Amaranthaceae) from the Cerrado. **New Phytologist**, v. 133, p. 643-650. 1996.
- SILVA, F. G. *et al.* Seasonal changes in fructan accumulation in the underground organs of *Gomphrena marginata* Seub. (Amaranthaceae) under rock-field conditions. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, p. 46-55. 2013.
- SILVA, T. M. *et al.* Anatomy and fructan distribution in vegetative organs of *Dimerostemma vestitum* (Asteraceae) from the campos rupestres. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 03-09. 2015.
- SIMMEN, U. *et al.* Fructan synthesis in excised barley leaves. Identification of two sucrose-sucrose fructosyltransferases induced by light and their separation from constitutive invertases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 459-468. 1993.
- SIMS, I. M.; POLLOCK, C. J.; HORGAN, R. Structural analysis of oligomeric fructans from excised leaves of *Lolium temulentum*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 2989-2992. 1992.

- SINISCALCHI, C. M.; LOEUILLE, B. F. P.; PIRANI, J. R. A new species of *Chresta* (Vernonieae, Asteraceae) endemic to the Mata Atlântica Domain, Brazil. **Phytotaxa**, v. 244, p. 80-88. 2016.
- SMART, D. R.; CHATTERTON, N. J.; BUGBEE, B. The influence of elevated CO₂ on non-structural carbohydrate distribution and fructan accumulation in wheat canopies. **Plant Cell Environment**, v. 17, p. 435-442. 1994.
- STURM, A. Invertases: primary structures, functions and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant Physiology**, v. 121, p. 1-7. 1999.
- STURM, A.; CHRISPEELS, M. J. cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. **Plant Cell**, v. 2, p. 1107-1119. 1990.
- SUZUKI, J. I.; STUEFER, J. On the ecological and evolutionary significance of storage in clonal plants. **Plant Species Biology**, v. 14, p. 11-17, 1999.
- TERTULIANO, M. F.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the Cerrado. **New Phytologist**, v. 123, p. 741-749. 1993.
- TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v.48, p. 61-65. 1994.
- VALLURU, R.; VAN DEN ENDE, W. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. Review Article. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 2905-2916. 2008.
- VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE, A. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during growth, storage and forcing. **Plant Physiology**, v. 149, p. 43-50. 1996.
- VAN DEN ENDE, W. *et al.* Purification and characterization of fructan: fructan fructosyltransferase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). **Planta**, v. 199, p. 493-502. 1996.
- VAN DEN ENDE, W. *et al.* Defoliation induces 1-FEHII (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEHIIa e 1-FEHIIb). Mass fingerprint of the 1-FEHII enzymes. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1186-1195. 2001.
- VAN DEN ENDE, W. *et al.* Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. Mini-Review. **The Scientific World Journal**, v. 2, p. 1281-1295. 2002.
- VAN DEN ENDE, W. *et al.* Fructan 1- exohydrolases: β (2,1) trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. **Plant Physiology**, v. 131, p. 621-631. 2003a.
- VAN DEN ENDE, W. *et al.* Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-1-FEHs) in non-fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel 'cell-wall invertaselike' specific 6-1-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **The Plant Journal**, v. 36, p. 697-710. 2003b.

- VAN DEN ENDE, W. *et al.* Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum* L.). **New Phytologist**, v. 166, p. 917-932. 2005a.
- VAN DEN ENDE, W. *et al.* Molecular cloning and characterization of a high DP fructan: fructan 1-fructosyltransferase from *Viguiera discolor* (Asteraceae) and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Physiology Plantarum**, v. 125, p. 419-429. 2005b.
- VAN DEN ENDE, W. *et al.* 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**, v. 155, p. 603-614. 2011.
- VAN DEN ENDE, W. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. Review. **Plant Physiology**, v. 4, p. 1-11. 2013.
- VAN LAERE, A.; VAN DEN ENDE, W. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 803-813. 2002.
- VEREYKEN, I. J. *et al.* Fructans insert between the headgroups of phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1510, p. 307-320. 2001.
- VERGAUWEN, R.; VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE, A. The role of fructan in flowering of *Campanula rapunculoides*. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1261-1266. 2000.
- VERGAUWEN, R.; VAN LAERE, A.; VAN DEN ENDE, W. Properties of fructan: fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from *Cichorium intybus* L. and *Echinops ritro* L., two Asteraceae plants storing greatly different types of inulin. **Plant Physiology**, v. 133, p. 391-401. 2003.
- VERHAEST, M. *et al.* X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. **The Plant Journal**, v. 41, p. 400-411. 2005.
- VERHAEST, M. *et al.* Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor. **New Phytologist**, v. 174, p. 90-100. 2007.
- VIEIRA, C. C. J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructose-containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae) at different phenological phases. **Plant, Cell and Environment**, v. 16, p. 919-928. 1993.
- WATERHOUSE, A. L.; CHATTERTON, N. J. Glossary of fructan terms. In M Suzuki, NJ Chatterton, eds, **Science and Technology of Fructans**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 1-7. 1993.
- WILSON, R. G.; KACHMAN, S. D.; MARTIN, A. R. Seasonal changes in glucose, fructose, sucrose, and fructans in the roots of dandelion. **Weed Science**, v. 49, p. 150-155. 2001.

CAPÍTULO I

**A DINÂMICA DOS FRUTANOS NOS ÓRGÃOS SUBTERRÂNEOS DE *Chresta exsucca*
(ASTERACEAE), UMA ESPÉCIE QUE FLORESCE EM ESTAÇÃO SECA**

RESUMO

A dinâmica dos frutanos nos órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca* (Asteraceae), uma espécie que floresce em estação seca - A sazonalidade climática influencia a fenologia das plantas nativas do Cerrado. As ervas e subarbustos tendem a florescer na estação chuvosa. No entanto, algumas espécies podem florescer na estação seca. Os carboidratos de reserva, armazenados nos órgãos subterrâneos, são utilizados para dar suporte às fases de alta demanda energética e, ainda, proteger as plantas dos danos causados por estresse ambiental. O objetivo deste estudo foi avaliar as variações de carboidratos armazenados em diferentes fases fenológicas nos órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca*. A espécie floresce na estação seca e possui sistema subterrâneo difuso, o qual armazena frutanos do tipo inulina. A fase de rebrota foi contínua, sem um período de dormência dos órgãos subterrâneos. Os teores de oligossacarídeos foram maiores do que os polissacarídeos, exceto na senescência, única fase com relação oligo: polissacarídeo <1. Portanto, as variações de frutanos em *C. exsucca* foram semelhantes a outras espécies de Asteraceae quanto às fases fenológicas, todavia, os eventos fenológicos ocorrem em períodos distintos. Os frutanos armazenados nos órgãos subterrâneos *C. exsucca* suprem as demandas energéticas de desenvolvimento e manutenção desta estrutura complexa, essencial para a persistência desta espécie no meio ambiente e também para garantir a reprodução em condições severas, como a seca.

Palavras-chave: Carboidratos não estruturais, Cerrado, fenologia, inulina, seca.

ABSTRACT

Fructan dynamics in the underground organs of *Chresta exsucca* (Asteraceae), a dry season flowering species - Climatic seasonality influences phenology of Cerrado native plants. Herbs and subshrubs tend to flower in rainy season; however some species with this life form flower in the dry season. Reserve carbohydrates, stored in the underground organs are used to support high energy demanding phases, but also may protect plants from damage during environmental constrains. The objective of this study was to evaluate the variations of stored carbohydrates at different phenological phases in the underground organs of field-grown plants of *Chresta exsucca*. This species flowers in dry season and has a diffuse underground system which stores inulin-type fructans. Resprouting was continual, without a dormancy period of the underground organs. Oligosaccharide contents were always higher than polysaccharides, except in senescence, the only phase with oligo: polysaccharide ratio <1 . Thus, fructan variations in *C. exsucca* were similar to other Asteraceae species concerning the phenological phases, but the phenological events occur at distinct periods. Fructans stored in the underground organs *C. exsucca* supply the energetic demands for development and maintenance of this complex structure, which is essential for the persistence of this species in the environment, and also to ensure reproduction in harsh conditions, such as drought.

Keywords: Cerrado, drought, inulin, non-structural carbohydrate, phenology.

1 INTRODUCTION

Cerrado occupies nearly 23% of the Brazilian territory and its vegetation has several physiognomies throughout a wide geographical area (Ratter *et al.* 1997). Cerrado phytophysiological forms are constituted by a gradient of forms, from grasslands to woodlands, determined by abiotic factors, mainly soil fertility, water table depth and fire frequency (Franco *et al.* 2014). Rainfall seasonality is another crucial determinant of the Cerrado. Rainy season occurs from October to April, when most of rainfall precipitation occurs. In dry season, from May to September, rainfall is considerably reduced to 0-50 mm (Silva *et al.* 2008), resulting in soil water deficit, particularly for herbs and subshrubs (Rossatto *et al.* 2013).

Though these growth forms are affected by seasonal drought, they predominate in open physiognomies of Cerrado and have high diversity compared to trees (Ratter *et al.* 1997). Another feature of these plants is the high proportion of belowground phytomass (Haridassan 2000), very often represented by several morphological types of perennial organs with buds and reserve compounds (Apezatto-da-Glória *et al.* 2008). This enables plants to regrow following seasonal drought or fire.

Seasonality may also influence on the phenological cycle of Cerrado herbaceous plants (Mantovani & Martins 1988). For this plant group, rainfall is positively correlated with the number of flowering species. Herbs and subshrubs typically sprout with the first rains and gradually develop as rainy season progresses. Reproduction occurs in the period with higher water availability (Batalha & Martins 2004). Aerial shoots senesce after reproduction at the beginning of dry season and only the underground organs remain dormant in the environment (Mantovani & Martins 1988). This pattern is exemplified by the Asteraceae *Chrysolaena obovata* (previously named *Vernonia herbacea*), *Aldama discolor* (previously named *Viguiera discolor*), *Ichthyothere terminalis* and by the Amaranthaceae *Gomphrena macrocephala* and *G. marginata* (Carvalho & Dietrich 1993; Isejima & Figueiredo-Ribeiro

1993; Vieira & Figueiredo-Ribeiro 1993; Silva *et al.* 2013; Almeida *et al.* 2017). All these species accumulate fructans in their underground organs.

Fructans are fructose-based polymers present as a reserve compound in 15% of Angiosperms, including the derived Asteraceae (Hendry 1993). In this family, fructans are linear molecules with β (2,1) linkages between fructosyl units and a terminal glucose residue, constituting the inulin-type. Edelman & Jefford (1968) proposed a model for inulin synthesis in *Heliantus tuberosus* tubers which starts with the fructosyl transfer between two sucrose molecules by the enzyme sucrose:sucrose 1 fructosyltransferase (1-SST), producing the trisaccharide 1-kestose and free glucose. Following, the enzyme fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) transfers fructosyl units between fructan molecules, producing one fructan molecule with higher degree of polymerization (DP), and another with lower DP. Inulin hydrolysis is the function of fructan exohydrolase (1-FEH), which removes terminal fructosyl.

Inulin stored in underground organs is used to resume growth during sprouting or defoliation (Raccuia & Melili 2010), since these processes require carbon, but the absence of aerial organs disable photosynthesis. Additionally, fructans are believed to protect plants against environmental constrains such as cold and drought, since fructan-accumulating plants are expressive in the flora of temperate and arid zones, with seasonal frost or drought (Hendry 1993), such as the Cerrado. This protective role can be achieved by membrane stabilization (Hincha *et al.* 2007) and by having antioxidant properties (Peshev *et al.* 2013).

Changes in fructan metabolism have been observed throughout the seasonal growth in Cerrado herbs with the typical phenological cycle. Generally, herbs accumulate carbohydrates during vegetative growth, which are later used for reproduction in the rainy season (Carvalho & Dietrich 1993; Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993; Vieira & Figueiredo-Ribeiro 1993; Almeida *et al.* 2017). However, there are variations in this pattern. Phenological notes in a floristic study of the tribe Vernonieae (Asteraceae) showed that some species differ according to the

reproduction period, flowering in the dry season, as exemplified by *Chresta* species (Moreira & Teles 2014). This arises the question about how reserve dynamics occur in a dry season flowering species. Though, how species with distinct periods of phenological shifts use their reserves are poorly known. For this reason, the objective of this study was to evaluate the variations of stored carbohydrates in different phenological phases in underground organs of field-grown plants of *Chresta exsucca*, a species with reproduction in the dry season.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Study site

The study was carried out in Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Alto Paraíso de Goiás, Goiás, Brazil (13 ° 51' - 14 ° 10' S and 47 ° 25' - 47 ° 42' W), with altitudes between 800 and 1,650 m. This site is recognized due to the biodiversity richness and high endemism (Munhoz & Felfili 2006), with different Cerrado phytophysionomies, from which rocky outcrops and open grasslands are the most representatives (Lenza *et al.* 2011). Meteorological data for the period from October 2015 to September 2016 were obtained from the station closest to the study site, located in Posse municipality, Goiás, Brazil (www.inmet.gov.br) (Fig. 1).

2.2 Plant material

Chresta exsucca DC. is an herbaceous species with 0.6 – 2 m high, syncephalous, lilac flowers and cypsela-type fruits (MacLeish 1985). The voucher was deposited in the Herbarium of the Universidade Federal de Goiás (UFG 50894). *C. exsucca* individuals were evaluated for identification of the predominant and secondary phenological phases (Table 1). Four distinct plants, distant > 10 m from each other, in the predominant phenological phase were sampled in October 2015, December 2015, February 2016, May 2016, and July 2016. Thickened

underground organs were washed in distilled water, cut, weighed, immediately frozen and stored in liquid nitrogen. In the laboratory, samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until extraction. Water content (WC) was determined by oven drying ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$) aliquots of fresh material (1.0 g) to constant mass (DM), and expressed as a percentage of the fresh mass ($n = 4$).

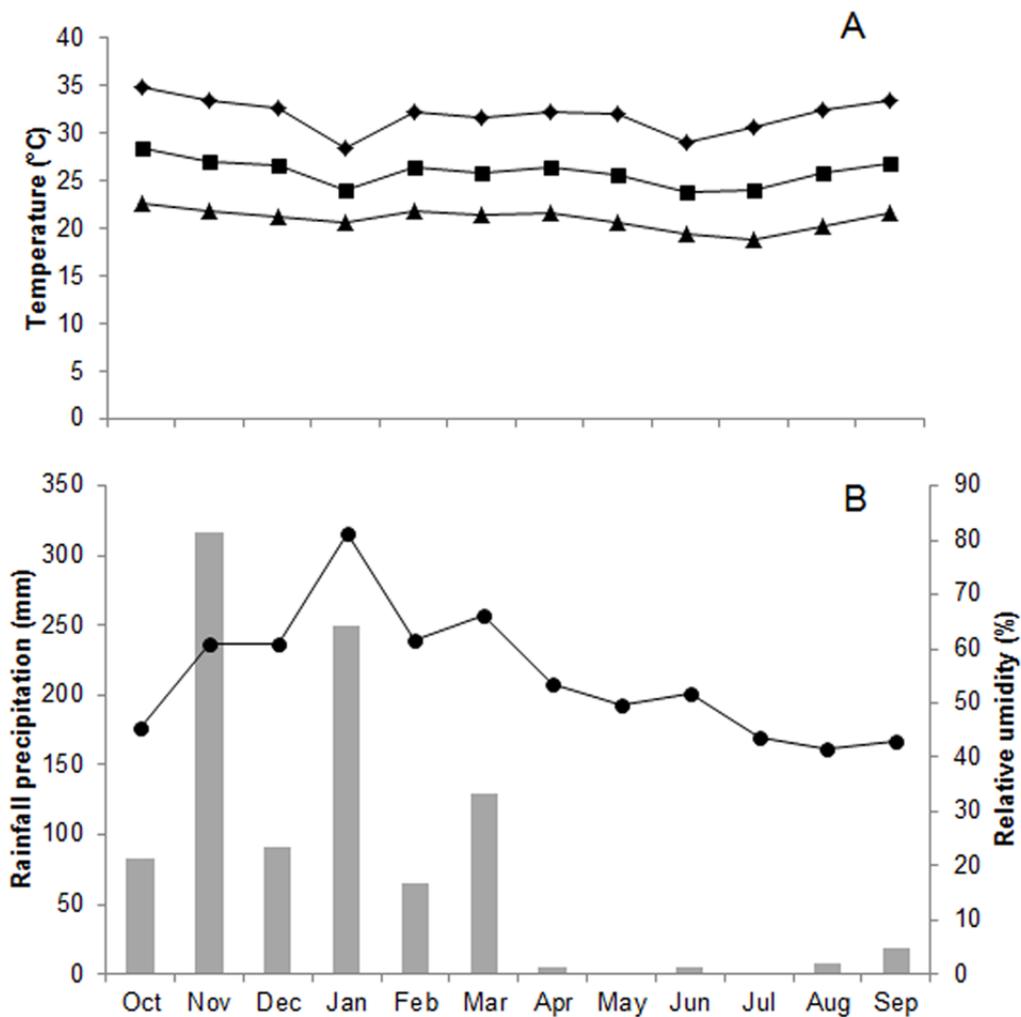


Figure 1 Monthly means of maximum (diamonds), average (squares) and minimum (triangles) temperatures (A). Rainfall (bars) and relative air humidity (circles) (B) from October 2015 to September 2016 in Posse, Goiás, Brazil, (www.inmet.gov.br).

2.3 Soluble carbohydrates extraction and analyses

Soluble carbohydrates were extracted in aliquots of fresh material (1.5 g). Samples were boiled in aqueous ethanol (80%) for 10 min for enzyme inactivation. In sequence, samples were homogenized and filtered. Residues were re-extracted twice in aqueous ethanol (80%) at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$

for 15 min. All the ethanolic filtrates were pooled and constituted the oligosaccharides fraction. Residues were extracted twice in distilled water (60 °C) for 30 min. The aqueous filtrates were collected and constituted the polysaccharides fraction (Carvalho *et al.* 1998). The fractions were vacuum-concentrated in rotary evaporator (39 °C), and analyzed independently.

Oligo and polysaccharide fractions were deionized using ion exchange resins (Amberlite IRA 120, cationic and Amberlite IRA 410, anionic), eluted with 10 volumes of ultrapure water (18 M Ω). The purified fractions had the pH neutralized, were concentrated in rotary evaporator, solubilized in ultrapure water and adjusted to the final concentration of 400 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ of fructose equivalents.

Total soluble carbohydrates were quantified by the phenol-sulfuric method using glucose as standard at 490 nm (Dubois *et al.* 1956). Free and combined fructose content was determined by the anthrone reagent using fructose as standard at 620 nm (Jermyn 1956). All quantifications were done in triplicate.

The purified fractions were filtered through membranes (0.45 μm) and analyzed by high-performance anion exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection (HPAEC / IPAD) on CarboPac PA100 column (4 x 250 mm) with the correspondent guard column, coupled in a ICS 5000 chromatograph (Dionex). Mobile phase was a gradient of sodium acetate (500 mM) in sodium hydroxide (100 mM) with the following schedule: 0-10 min: 5 mM; 10.1 - 35min, 5 - 50 mM; 35.1 - 40 min, 50 - 375 mM; 40.1 -45min, 500 mM, eluted at 1 mL.min⁻¹ (Silva *et al.* 2015). Chromatograms were prepared in the same scale of time and detector response. Extracts obtained from *Helianthus tuberosus* L. (Asteraceae) tubers were used as standard for comparison and identification of soluble carbohydrates.

2.4 Statistical analysis

Water content, oligosaccharides and polysaccharides levels and the oligo:polysaccharide ratio of samples collected at different phenological phases were submitted to Kruskal-Wallis analysis of variance, followed by Dunn's test for multiple comparisons ($p < 0.05$). This test was chosen since data did not fulfil the requirements for parametric analysis.

3 RESULTS

Chresta exsucca has a diffuse underground system with thickened organs with orthogravitropic and diagravitropic growth. Plants resprouting were found throughout the studied period, being more intense in the rainy season, followed by vegetative growth (Tab. 1). The development of reproductive organs occurred in the dry season, with the development of flower buds (Flowering-I), flower opening (Flowering –II) and fruiting. Senescence of the aerial organs occurred in the rainy season. However, plants resprouted before the full senescence of the aerial organs (Tab. 1). Therefore the period with typical dormancy of the underground organs was not observed in the sampling period.

Table 1 Phenological phases of *Chresta exsucca* collected in Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros (Goiás, Brazil) from October 2015 to July 2016. RE, resprouting; VG, vegetative growth; F-I flowering –I; F-II, flowering II; FR, fruiting; SE, senescence. Bold marks indicate the predominant phase at the collection, * indicate the phase collected.

Month of collection	Season	Phenological phases
October 2015	Rainy	RE, FR* , SE
December 2015	Rainy	RE, VG, SE*
February 2016	Rainy	RE*, VG* , SE
May 2016	Dry	RE, VG, F-I*
July 2016	Dry	RE, VG, F-II*

3.1 Water and carbohydrate contents

The underground organs of *C. exsucca* had higher water contents during vegetative growth, which occurred in the rainy season. The lowest contents were found in plants resprouting and during flowering-II. Medians ranged from 52.9% in flowering-II to 67.37% in vegetative growth (Fig. 2A). *C. exsucca* had from 6 – 23% of total soluble carbohydrates (oligos

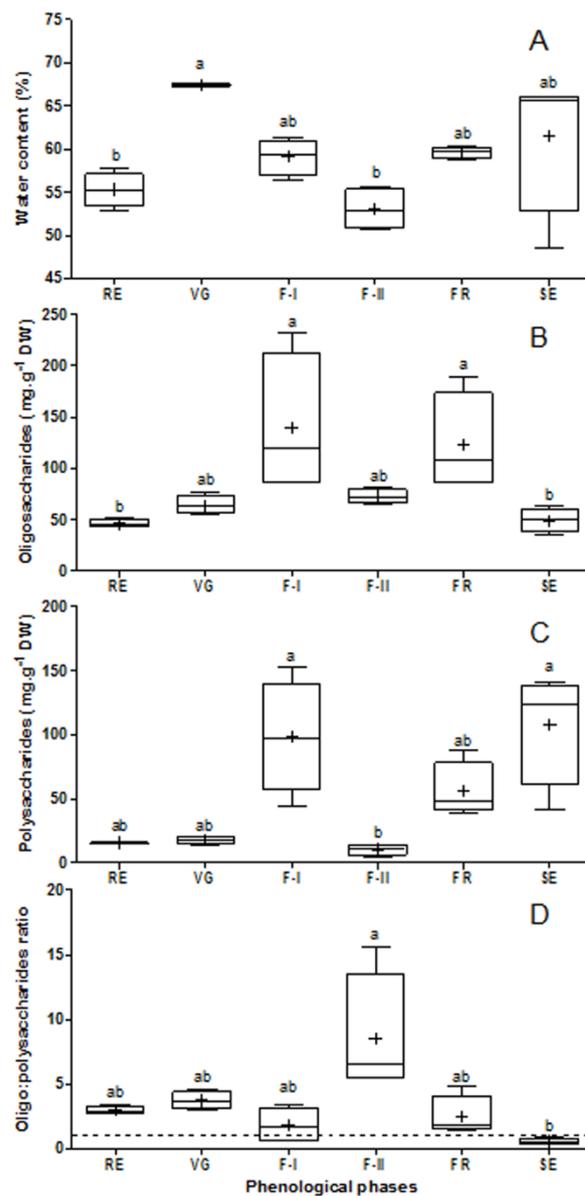


Figure 2 Box-plot showing water content (A), oligosaccharides (B), polysaccharides (C) and oligo:polysaccharides ratio in underground organs of field-grown *Chresta exsucca* plants at different phenological phases. Resprouting (RE), vegetative growth (VG), flowering I (F-I), flowering II (F-II), fruiting (FR) and senescence of the aerial organs (SE). Dashed line in D indicates oligo:polysaccharides ratio = 1. Different letters indicate different medians (n = 4, p < 0.05).

+ polysaccharides) in the underground organs. Higher oligosaccharide levels in flowering-I and fruiting phases, while the lowest levels were found during senescence of the aerial organs and resprouting (Fig 2B). The highest polysaccharide contents were detected in senescence and flowering-I, differing from flowering-II in which polysaccharides decreased (Fig 2C). Oligosaccharide contents were always higher than polysaccharide contents, except in senescence. This was demonstrated by the oligo: polysaccharide ratio, which was always higher than 1. This ratio was higher in flowering-II and differed from senescence (Fig 2D), the only phase with values of the oligo: polysaccharide ratio <1.

3.2 Qualitative analysis of carbohydrates

Thickened underground organs of *C. exsucca* store inulin-type fructans. In all analyzed phases, peaks of glucose, fructose, sucrose, 1-kestose (DP3) and nystose (DP4) were detected (Fig. 3). The highest peaks of free glucose, fructose and small peaks of fructans with other DPs were found in resprouting and vegetative growth. In flowering II, glucose and fructose peaks were also high, though peaks of high-DP fructans were observed. In flowering-I, glucose and fructose peaks remained high in oligosaccharides fraction, but high-DP fructan peaks were present. Underground organs of plants in senescence of the aerial organs had fructans with DP higher than 50 (Fig. 3).

4 DISCUSSION

The timing of phenological shifts in *C. exsucca* differs from other Asteraceae species from Cerrado, as exemplified by *C. obovata* (Carvalho & Dietrich 1993; Rigui *et al.* 2015), *A. discolor* (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993; Itaya *et al.* 1999) and *Ichthyothere terminalis* (Almeida *et al.* 2017). These species have a well-defined phenological cycle with seasonal

development, characterized by resprouting in the beginning of the rainy season, senescence and abscission of the aerial organs at the end of the rainy season and dormancy of the underground organs in the dry season. In Cerrado, great part of the herbaceous species flowers with the increase on rainfall precipitation (Batalha & Martins 2004). However, in *C. exsucca* flowering occurred during a 3-4 month period in the dry season and senescence of the aerial organs, in the rainy season (Tab. 1). Furthermore, resprouting is continual throughout the year, lacking a period with the characteristic dormancy of the underground organs. These differences suggest the occurrence of distinct strategies to regulate water contents and reserve compounds metabolism, since the use of these resources may be high due to intense resprouting throughout the year and flowering in the dry season.

As *C. exsucca* has a short period without aerial organs compared to other herbaceous species, the extended presence of leaves indicates the potential for photoassimilate synthesis, even in the dry season. Studies on photosynthesis of Cerrado herbaceous species are scarce, but native trees have several photosynthetic strategies in rainy and dry seasons. Some species reduce the carbon assimilation rate in the dry season, while others maintain unchanged rates and there are species that have reduced carbon assimilation rates even in the rainy season (Palhares *et al.* 2010). This suggests that herbs and shrubs may have several photosynthetic strategies in response to climatic seasonality.

Reduced water contents in the underground organs were detected in field grown *C. exsucca* during flowering II, but this was expected, since this phase occurred in the middle of the dry season. The reduction on soil water availability is an important determinant of water contents in the underground organs, as verified in *I. terminalis* (Almeida *et al.* 2017). In general, water contents of the sampled underground organs were lower when compared with other species: in rhizophores of *C. obovata* irrigated plants water content was 85% (Garcia *et al.* 2011). In tuberous roots of irrigated *A. discolor* water content was 80% (Oliveira *et al.* 2013). Dimorphic

thickened roots of field-grown *I. terminalis* plants have 61-85%, with the highest values in the rainy season (Almeida *et al.* 2017).

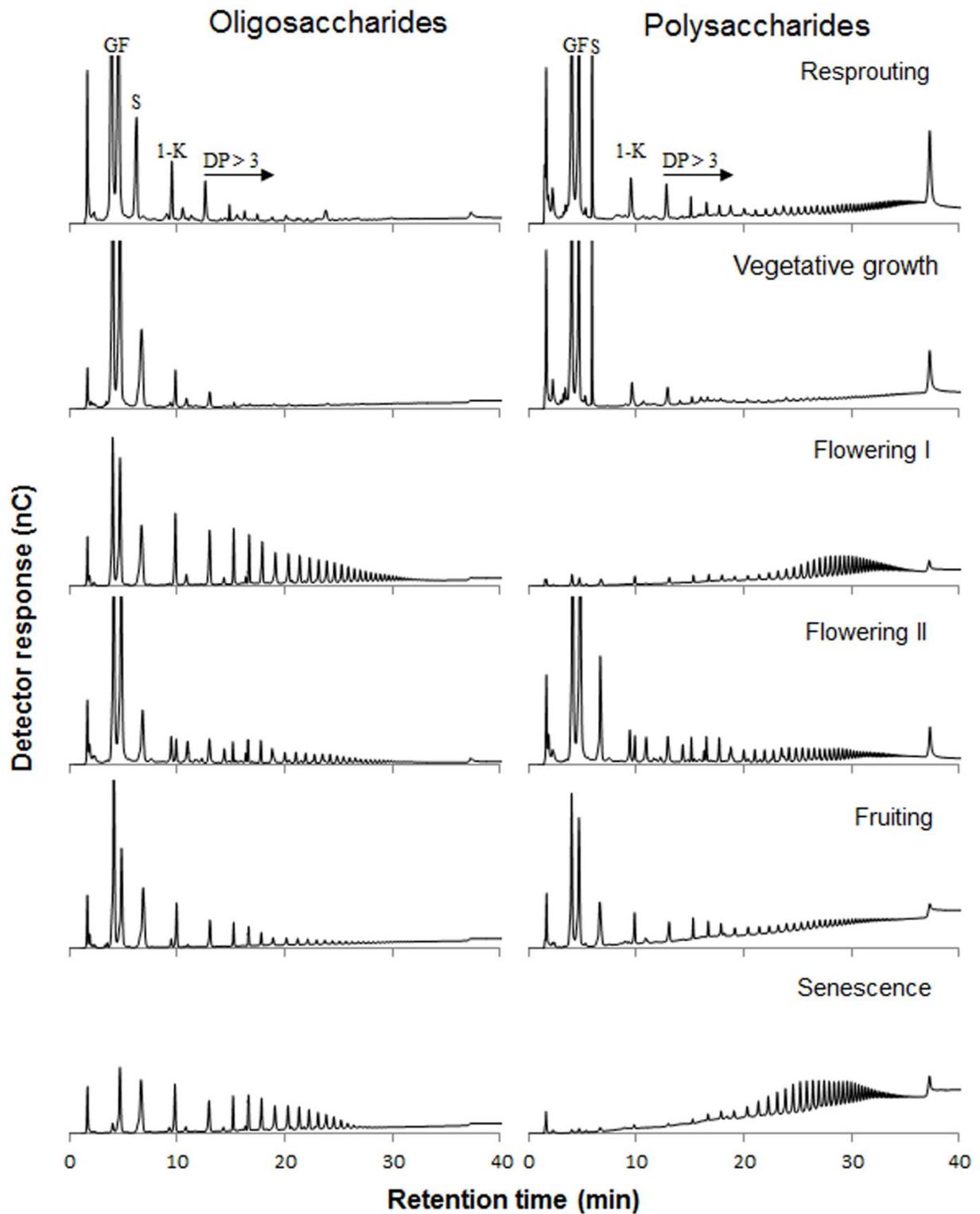


Figure 3 HPAEC/PAD profiles of oligosaccharides and polysaccharides of underground organs of *Chresta exsucca* in different phenological phases. Glucose (G), fructose (F), sucrose (S), 1-kestose (1-K), degree of polymerization (DP).

Water content is variable in the underground organs among Asteraceae species, as well as fructan content (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993), because storage of resources depends on the relative distribution of tissues in a specific organ (Moraes *et al.* 2013). During dry periods, water content maintenance of in vegetative organs depends on the interaction of different factors including the presence of osmoprotectants that regulate osmotic adjustment (Singh *et al.* 2015). Soluble carbohydrates are significant osmotic-active compounds and fructans stand out because they are reserve carbohydrates, protect membranes and proteins and remove reactive forms of oxygen (Peshev *et al.* 2013), which are features that contribute for plant preservation during environmental constraints.

Soluble carbohydrates, predominantly as inulin-type fructans (Fig. 3), are present in 5 to 33% of the dry mass of the underground organs of *C. exsucca* (Fig. 2B, C). These carbohydrates are the main reserve compounds in Asteraceae (Hendry 1993). Carbohydrate storage occurs when photoassimilate production exceeds the demand for growth and metabolism maintenance (Pollock 1986), and this varies according to phenological phases and shifts in environmental factors. Rainfall is one of the major drivers for phenological changes in tropical South American seasonal environments, such as the Cerrado (Chambers *et al.* 2013). Phenological shifts modify source-sink relationships in fructan accumulators. In high demanding energy phases, such as regrowth and flowering, higher oligosaccharide levels are expected to occur, while in phases with intense sugar translocation for storage organs, such as the senescence of aerial organs, polysaccharide contents are higher. This was demonstrated in *C. obovata* (Carvalho & Dietrich 1993; Portes & Carvalho 2006), *Cichorium intybus* (Van Den Ende & Van Laere 1996), *A. discolor* (Itaya *et al.*, 1999), *Taraxacum officinale* (Wilson *et al.* 2001) and *I. terminalis* (Almeida *et al.* 2017).

Fructan variations in *C. exsucca* were similar to other Asteraceae species concerning the phenological phases. Higher oligosaccharide levels occurred in the beginning of flowering and in

fruiting (Fig. 2B). The chromatograms in these phases confirm this observation (Fig. 3). However, in resprouting, vegetative growth and flowering II, glucose, fructose and low DP sugar peaks were higher, as occurred in *A. discolor*, in which oligosaccharides up to DP4 predominate in sprouting and flowering (Itaya *et al.* 1999). The distribution of fructan molecules with varied DP is the result of the activity of fructan metabolizing enzymes. Higher free fructose peaks suggest intense 1-FEH activity or a side 1-FFT activity transferring free fructose to water (Van den Ende *et al.* 1996; De Roover *et al.* 1999). Generally, 1-FEH has low activity, but it can be stimulated by defoliation, sprouting, flowering and environmental factors such as cold (De Roover *et al.* 1999; Vergauwen *et al.* 2000; Asega & Carvalho 2004 Asega *et al.* 2011). As field-grown plants without control of environmental conditions were studied here, these plants were submitted to a set of factors and phenological demands which resulted in the obtained fructan profiles. As in flowering I and fruiting monosaccharide peaks were not as high as in resprouting, vegetative growth and flowering II (Fig. 3), this indicates that photoassimilate production may have a greater contribution to support the energetic requirements in these phases, without the needing to intensify fructan hydrolysis in the underground organs, even at the beginning of the dry season.

During senescence of aerial organs, oligo:polysaccharides ratio was < 1 , which is the result of higher polysaccharide contents in this phase (Fig 2 C, D), supported by the chromatogram profile (Fig. 3). In all other phases, oligosaccharide levels were higher than polysaccharides, as expressed by oligo:polysaccharides ratio > 1 (Fig. 2 B, C, D), indicating the constant use of photoassimilates to sustain plant development, especially flowering in the dry season. In *Arabidopsis*, metabolite levels may indicate the activity in specific pathways, their levels and/or the relationship between them can be used as biomarkers for biomass potential and/or stress responses (Smith & Stitt 2007; Purdy *et al.* 2015). Thus, when oligo:polysaccharides ratio is > 1 may indicate higher sink activity in aerial organs, and when is

< 1 , the sink activity is higher for carbon storage in underground organs. In addition to phenology, environmental factors may also influence this ratio, as noticed in water stressed plants of *C. obovata*, which had an increase in oligo:polysaccharides ratio (Garcia *et al.* 2011, Garcia *et al.* 2015).

Another feature of *C. exsucca* is the presence of diffuse underground system, with numerous superficial parts with diagravitropic growth, which one individual can occupy a large area. Appezzato da Gloria *et al.* (2008) described a bud-forming diffuse underground system of radicular structure for *C. sphaerocephala*, another species of the genus. The aerial stems of a single individual in *C. sphaerocephala* can be 10 m far from each other. This feature seems to be similar in *C. exsucca*, however, anatomical studies are necessary to confirm if they have cauline or root origin. Diffuse systems develop spreading over a large area, this could enable the exploration of different soil areas, which could increase the possibility of obtaining water and minerals and distribute these resources among ramets. Evidences of physiological integration between ramets were observed in drought-stressed *Populus balsamifera* L., which shared water (Adonsou *et al.* 2016). Additionally, the development of these structures represents a strong sink, due to growth demands and also for reserve storage. Since diffuse systems bear buds (Appezzato-da-Glória *et al.* 2008), they contribute to clonal reproduction, which is an important feature in limited resource ecosystems and/or that experience strong climatic constraints (Couteron *et al.* 2014).

The morphological and physiological characteristics of *C. exsucca*, emphasizes that fructan storage supply the energetic demands for the development and maintenance of the complex structure of its underground organs, which is essential for the persistence of this species in the environment, and also to ensure reproduction in harsh conditions, such as drought.

5 REFERENCES

- Adonsou KE, DesRochers A, Tremblay F. 2016. Physiological integration of connected balsam poplar ramets. *Tree Physiology* 36: 797–806.
- Almeida LV, Ferri PH, Seraphin JC, Moraes MG. 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.
- Appezato-da-Glória B, Cury G, Soares MKM, Rocha R, Hayashi AH. 2008. Underground systems of Asteraceae species from the Brazilian Cerrado. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 135: 103–113.
- Asega AF, Carvalho MAM. Fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 42, p. 313-319. 2004.
- Asega AF, Nascimento JRO, Carvalho MAM. 2011. Increased expression of fructan 1-exohydrolase in rhizophores of *Vernonia herbacea* during sprouting and exposure to low temperature. *Journal of Plant Physiology* 168: 558–565.
- Batalha MA, Martins FR. 2004. Reproductive phenology of the cerrado plant community in Emas National Park (central Brazil). *Australian Journal of Botany* 52: 149–161.
- Carvalho MAM, Dietrich SMC. 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735–740.
- Carvalho MAM, Pinto MM, Figueiredo-Ribeiro RCL. 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21: 275-280.
- Chambers LE, Altwegg R, Barbraud C, Barnard P, Beaumont LJ, Crawford RJM, Durant JM, Hughes L, Keatley MR, Low M, Morellato PC, Poloczanska ES, Ruoppolo V, Vanstreels RET, Woehler EJ, Wolfaardt AC. Phenological changes in the southern hemisphere. *Plos one*, v. 8, p. 10-22. 2013.
- Couteron P, Anthelme F, Clerc M, Escaff D, Fernandez-Oto C, Tlidi M. 2014. Plant clonal morphologies and spatial patterns as self-organized responses to resource-limited environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 372: 20140102 doi:10.1098/rsta.2014.0102
- De Roover J, Van Laere A, Van den Ende W. 1999. Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 106: 158–163.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers P, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350–356.

Edelman J, Jefford T. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* 67: 517–531.

Franco AC, Rossatto DR, Silva LCR, Ferreira CS. 2014. Cerrado vegetation and global change: the role of functional types, resource availability and disturbance in regulating plant community responses to rising CO₂ levels and climate warming. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 26: 19–38.

Garcia PM, Asega AF, Silva EA, Carvalho MAM. 2011. Effect of drought and re-watering on fructan metabolism in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 664–670.

Garcia PMA, Hayashi AH, Silva EA, Figueiredo-Ribeiro RCL, Carvalho MAM. 2015. Structural and metabolic changes in rhizophores of the Cerrado species *Chrysoleaena obovata* (Less.) Dematt. as influenced by drought and re-watering. *Frontiers in Plant Science* 6: 721 doi: 10.3389/fpls.2015.00721

Hendry GAF. 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* 123: 3–14.

Hincha DK, Livingston DP, Premakumar R, Zuther E, Obel N, Cacela C, Heyer AG. 2007. Fructans from oat and rye: composition and effects on membrane stability during drying. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 1611–1619.

Isejima EM, Figueiredo-Ribeiro, RCL. 1993. Fructan variations in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae): the influence of phenology. *Plant and Cell Physiology* 34: 723–727.

Itaya NM, Figueiredo-Ribeiro RCL, Buckeridge MS. 1999. Synthesis of fructans by fructosyltransferase from the tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 435–442.

Jermyn M. 1956. A new method for determining ketohexoses in the presence of aldohexoses. *Nature* 177: 38–39.

Lenza E, Pinto JRR, Pinto AS, Maracahipes L, Bruziguessi EP. 2011. Comparação da vegetação arbustivo-arbórea de uma área de cerrado rupestre na Chapada dos Veadeiros, Goiás, e áreas de cerrado sentido restrito do Bioma Cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 34: 247–259.

Mantovani W, Martins FR. 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. *Acta Botanica Brasilica* 11: 101–112.

- MacLeish NF. 1985. Revision of *Chresta* and *Pycnocephalum* (Compositae: Vernonieae). *Systematic Botany* 10: 459-470.
- Moraes MG, Chatterton NJ, Harrison PA, Filgueiras TS, Figueiredo-Ribeiro RCL. 2013. Diversity of non-structural carbohydrates in grasses (Poaceae) from Brazil. *Grass and Forage Science* 68: 165–177.
- Moreira GL, Teles, AM. 2014. A tribo Vernonieae Cass. (Asteraceae) na Serra Dourada, Goiás, Brasil. *Iheringia Série Botânica* 69: 357–385.
- Munhoz CBR, Felfili JM. 2006. Floristics of the herbaceous and subshrub layer of a moist grassland in the Cerrado biosphere reserve (Alto Paraíso de Goiás), Brazil. *Edinburgh Journal of Botany* 63: 343–354.
- Oliveira VF, Silva EA, Zaidan LBP, Carvalho MAM. 2013. Effects of elevated CO₂ concentration and water deficit on fructan metabolism in *Viguiera discolor* Baker. *Plant Biology* 15: 471–482.
- Palhares D, Franco AC, Zaidan LBP. 2010. Respostas fotossintéticas de plantas do cerrado nas estações seca e chuvosa. *Revista Brasileira de Biociências* 8: 213-220.
- Peshev D, Vergauwen R, Moglia A, Hideg É, Van den Ende W. 2013. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *Journal of Experimental Botany* 64: 1025–1038.
- Pollock CJ. 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist* 104: 1–24.
- Portes MT, Carvalho MAM. 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.
- Purdy SJ, Maddison AL, Cunniff J, Donnison I, Clifton-Brown J. 2015. Non-structural carbohydrate profiles and ratios between soluble sugars and starch serve as indicators of productivity for a bioenergy grass. *AoB Plants* 7: plv032 doi: 10.1093/aobpla/plv032
- Raccuia SA, Melilli MG. 2010. Seasonal dynamics of biomass, inulin, and water-soluble sugars in roots of *Cynara cardunculus* L. *Field Crops Research* 116: 147–153.
- Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany* 80: 223–230.

- Rigui AP, Gaspar M, Oliveira VF, Purgatto E, Carvalho MAM. 2015. Endogenous hormone concentrations correlate with fructan metabolism throughout the phenological cycle in *Chrysolaena obovata*. *Annals of Botany* 115: 1163–1175.
- Rossatto D, Sternberg LSL, Franco AC. 2013. The partitioning of water uptake between growth forms in a Neotropical savanna: do herbs exploit a third water source niche? *Plant Biology* 15: 84–92.
- Silva FAM, Assad ED, Evangelista BA. 2008. Caracterização climática do Bioma Cerrado. In: Sano SM, Almeida SP, Ribeiro JF (eds.) *Cerrado Ecologia e Flora*. Planaltina:Embrapa. p. 69–88.
- Silva F, Cangussu L, Paula S, Melo G, Silva E. 2013. Seasonal changes in fructan accumulation in the underground organs of *Gomphrena marginata* Seub. (Amaranthaceae) under rock-field conditions. 25: 46–55.
- Silva TM, Vilhalva DA, Moraes MG, Figueiredo-Ribeiro RCL. 2015. Anatomy and fructan distribution in vegetative organs of *Dimerostemma vestitum* (Asteraceae) from the campos rupestres. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 87: 797–812.
- Singh M, Kumar J, Singh S, Singh VP, Prasad SM. 2015. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 14: 407–426.
- Smith AM, Stitt M. 2007. Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant, Cell & Environment* 30, 1126–1149.
- Tertuliano MF, Figueiredo-Ribeiro RCL. 1993. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. *New Phytologist* 123: 741–749.
- Van Den Ende W, Mintiens A, Speleers H, Onuoha Aa, Van Laere A. 1996. The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* during growth, storage and forcing. *New Phytologist* 132: 555–563.
- Van den Ende W, Van Laere A. 1996. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. *Journal of Plant Physiology* 149: 43–50.
- Vergauwen R, Van den Ende W, Van Laere A. 2000. The role of fructan in flowering of *Campanula rapunculoides*. *Journal of Experimental Botany* 51: 1261–1266.
- Vieira CCJ, Figueiredo-Ribeiro RCL. 1993. Fructose-containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil.(Amaranthaceae) at different phenological phases. *Plant, Cell & Environment* 16: 919–928.

Wilson RG, Kachman SD, Martin AR. 2001. Seasonal changes in glucose, fructose, sucrose, and fructans in the roots of dandelion. *Weed Science* 49: 150–155.

CAPÍTULO II

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE SACAROSE: SACAROSE
FRUTOSILTRANSFERASE (1-SST), FRUTANO EXOHIDROLASE (1-FEH) E
INVERTASE (INV) EM ÓRGÃOS SUBTERRÂNEOS DE *Chresta exsucca* E
VARIÇÕES FENOLÓGICAS DA 1-FEH**

RESUMO

Caracterização parcial de sacarose: sacarose frutossiltransferase (1-SST), frutano exohidrolase (1-FEH) e invertase (INV) em órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca* e variações fenológicas – As enzimas que permeiam os processos metabólicos dos frutanos são reguladas de forma acentuada mediante condições de estresse. O objetivo deste trabalho foi verificar as condições ótimas de atividade de 1-SST, 1-FEH, INV em órgãos subterrâneos de *C. exsucca* e verificar a atividade da 1-FEH nas fases fenológicas de: frutificação, senescência, brotação, crescimento vegetativo e floração. Após extração de proteínas, foram realizados ensaios de caracterização enzimática em diferentes condições de tempo, temperatura, pH e substrato. O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para verificar a interação entre as diferentes condições para a enzima 1-FEH. A maior atividade de 1-SST foi obtida em 3 h, em 35 °C e nos pHs 4,5 e 6,0. Para 1-FEH, a atividade máxima foi registrada em 0,08 h, 50 °C e pH 5,0. Em relação a invertase, a maior atividade enzimática foi registrada em 1 h e 40 °C. Os fatores tempo de reação e pH, tiveram efeito significativo sobre a atividade de 1-FEH em *C. exsucca*. A fase de brotação apresentou diferença significativa em relação às demais fases, com maior índice de atividade de 1-FEH nesse período. Além disso, verificou-se que 1-FEH apresenta faixa aproximada de 66kDa por meio da eletroforese. As análises qualitativas demonstraram que a atividade enzimática da espécie está bastante relacionada com a fenologia, visto que, no período de floração, observa-se altos picos de oligossacarídeos, mesmo em período desfavorável sazonalmente (seca). Durante a brotação, atividade de 1-FEH foi significativamente superior que as demais fases fenológicas. Esse fator indica importante ação da enzima 1-FEH na disponibilidade de oligossacarídeos, e consequente ação de proteção exercida pelos frutanos mediante estresse. As condições de atividades enzimáticas apresentaram valores similares em relação a outras espécies de Asteraceae.

Palavras-chave: 1-SST, 1-FEH, invertase, fenologia, *Chresta exsucca*, frutanos.

ABSTRACT

Sucrose fructosyltransferase (1-SST), fructan exohydrolase (1-FEH) and invertase (INV) in underground organs of *Chresta exsucca* and phenological variations - The enzymes that permeate the metabolic processes of fructans are regulated by stress conditions. The objective of this work was to verify the optimal conditions of 1-SST, 1-FEH, INV in underground organs of *C. exsucca* in the phenological phases of: fruiting, senescence, sprouting, vegetative growth and flowering. After protein extraction, enzymatic characterization tests were carried out under different conditions of time, temperature, pH and substrate. The central rotational compound design (DCCR) was used to see the interaction between the different conditions. The highest activity of 1-SST was obtained at 3 h, 35 ° C and pHs 4,5 and 6,0. For 1-FEH, the highest activity was recorded at 0.08 h, 50 °C and pH 5.0. About invertase, the highest enzymatic activity was recorded at 1 h and 40 ° C. According Pareto's Diagram, the factors of reaction time and pH had a significant effect on the activity of 1-FEH in *C. exsucca*. The sprouting phase presented a significant difference in relation to the other phases, with a higher activity index of 1-FEH in this period. Furthermore, 1-FEH has an approximate range of 66kDa by electrophoresis. The qualitative analysis showed that the enzymatic activity of this species is strongly influenced by phenology, since in the flowering period, high peaks of oligosaccharides are observed, even during a seasonally (dry) period. During sprouting, 1-FEH activity was significantly higher than other phenological phases. This factor indicates an important action of 1-FEH on the availability of oligosaccharides, and consequent protection action exerted by the fructans through stress. The conditions of enzymatic activities presented similar values in relation to other species of Asteraceae.

Keywords: 1-SST, 1-FEH, *Chresta exsucca*, invertase, phenology, fructans.

1 INTRODUÇÃO

O acúmulo de frutanos em espécies de Asteraceae é fundamental para sobrevivência desses indivíduos em condições de estresse (CARVALHO *et al.*, 2007; JOAQUIM *et al.*, 2014). A regulação do metabolismo de tais carboidratos é influenciada pela presença de sacarose, visto que, em altas concentrações de sacarose, os frutanos são sintetizados (RITSEMA & SMEEKENS, 2003) e, em períodos de alta demanda energética, ocorre a hidrólise desses compostos (VIEIRA & FIGUEIREIDO-RIBEIRO, 1993).

A etapa inicial da síntese de frutanos é viabilizada pela enzima sacarose: sacarose frutossiltransferase (1-SST), a qual catalisa a formação de 1-cestose (VAN LAERE & VAN DEN ENDE, 2002), ou seja, a atuação de 1-SST é importante para iniciar a síntese de inulina, um dos principais tipos de frutanos. A enzima frutano: frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT) catalisa a transferência de resíduos de frutose entre as moléculas de frutanos, sendo fundamental para regulação do grau de polimerização médio do carboidrato (CARVALHO *et al.*, 2007; LIVINGSTON *et al.*, 2009). A hidrólise de frutanos ocorre por meio da frutano exohidrolase (1-FEH), enzima que disponibiliza frutose para suprimento energético, sendo um recurso importante do ponto de vista evolutivo (HENDRY & WALLACE, 1993).

O aumento da frutose livre (VAN DEN ENDE *et al.*, 2001) e da concentração de frutanos com baixo grau de polimerização (VAN LAERE & VAN DEN ENDE, 2002) no meio intracelular, condiciona a redução do potencial osmótico (BIELESKI, 1993; VERGAUWEN *et al.*, 2000). Adicionalmente os oligossacarídeos atuam na estabilização das membranas celulares (HINCHA *et al.*, 2000), e assim, ocorre a proteção das estruturas celulares em decorrência dessas pressões ambientais. Nesse sentido, 1-FEH é fundamental para controle e metabolização dos oligossacarídeos oriundos das grandes moléculas de frutanos.

A regulação da produção e distribuição de frutanos nos vegetais direciona a atuação desses carboidratos principalmente em condições de frio e seca (RITSEMA & SMEEKENS, 2003). Além de estabilizar membrana plasmática e reduzir o potencial osmótico das células, os frutanos também atuam como antioxidantes (PESHEV *et al.*, 2013). O conjunto de tais fatores torna-se subsídio e fundamento para os estudos sobre o metabolismo de frutanos, e as respectivas enzimas que atuam nessa regulação; isso possibilita entendimento a respeito dos mecanismos que permeiam as adaptações de plantas em condições de Cerrado.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar parâmetros para atividade enzimática de 1-SST, 1-FEH e invertase em extratos obtidos dos órgãos subterrâneos de *C. exsucca*; bem como determinar a atividade da 1-FEH em diferentes fases fenológicas.

2 METODOLOGIA

As coletas foram realizadas em outubro e dezembro/15 e fevereiro, maio, julho e setembro/16 no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros (Anexo 1). Os indivíduos foram coletados de acordo com a fase fenológica predominante, conforme descrito no Capítulo 1.

Os sistemas subterrâneos de diferentes indivíduos de *Chresta exsucca* foram retirados e processados em campo. Os materiais foram separados em grupos de região proximal e mediana, para posterior extração de carboidratos e proteínas. A região proximal foi utilizada para análise de 1-FEH e invertase e a região mediana para análise de 1-SST. Foi considerada região proximal a região entre 2 e 10 cm a partir da base do caule aéreo, o restante do órgão subterrâneo considerou-se região mediana. Não foram coletadas as regiões distais, devido à dificuldade em obter os órgãos íntegros, pois atingem regiões profundas do solo. Os órgãos foram lavados em água destilada, cortados, pesados, embalados em papel alumínio, imediatamente congelados em nitrogênio líquido, no qual foram armazenados. Após chegada ao laboratório, o material coletado foi armazenado em freezer -80 °C até extração.

2.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram extraídas de acordo com a metodologia descrita por Asega & Carvalho (2004), com ajustes descritos a seguir. O extrato enzimático foi obtido com a maceração de 50 g do sistema subterrâneo, a 5 °C, e homogeneização em tampão McIlvaine (0,05 M), pH 5,5 (1:1 v/v), suplementado com os protetores ácido ascórbico (5 mM), EDTA (2 mM), β -mercaptoetanol (2mM) e PVPP (10%). Após repouso de 60 min a 5°C, a solução foi filtrada em tecido de nylon e seu volume medido. Em seguida foi acrescentado sulfato de amônio (20%), que foi dissolvido gradativamente e o extrato novamente colocado em repouso em 5 °C por 60 min. Em seguida, a solução foi centrifugada a 13.245 g durante 15 min (5 °C), o sobrenadante foi recolhido, o volume determinado e o precipitado descartado. Em continuidade, foi adicionado e dissolvido sulfato de amônio para alcançar 80% e o extrato foi armazenado *overnight* a 5 °C. Após o repouso, a solução foi centrifugada por 30 min em 13.245 g e, desta vez, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em tampão de extração até completar 1 mL.

O extrato foi dessalinizado em colunas de BioGel P6 DG, as quais após aplicação do extrato, foram centrifugadas a 438 g durante 15 min, a 5 °C, até recuperação do extrato aplicado. Os extratos foram dialisados em tampão de extração diluído 5 vezes (0,01 M), sem os protetores.

Foram realizadas trocas do tampão a cada 2 h, totalizando 3 trocas. Os extratos foram armazenados em freezer -80 °C até as análises. Todas as extrações foram realizadas em três repetições, cada repetição constituída por aproximadamente 50 g de raízes de três indivíduos.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Foram realizados microensaios com 10 µl do extrato mais 190 µl de reagente Bradford. A leitura foi realizada em leitora de microplacas a 595 nm.

2.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Para o ensaio enzimático padrão, cada enzima foi incubada com o substrato específico na proporção de 1:1, sendo as concentrações finais dos substratos: sacarose (0,2 M) para 1-SST; inulina (5%) para 1-FEH e sacarose (0,05 M) para invertase. Todos os substratos foram preparados em tampão McIlvaine (0,05 M). Ao final do tempo de incubação, uma alíquota da mistura de incubação foi fervida durante 5 minutos para a inativação das enzimas. Então, as alíquotas foram diluídas (20x) em água ultrapura (18 MΩ), centrifugadas a 11.200 g durante 3 minutos, filtradas em membranas de 0,45 µm e armazenadas em -20 °C até a análise.

A atividade das enzimas foi determinada pela quantificação de 1-cestose para 1-SST, frutose livre para 1-FEH e glicose para invertase. As quantificações foram realizadas por Cromatografia de troca aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD). A atividade foi expressa como atividade específica (produto formado/ tempo/ micrograma de proteína), subtraindo os valores do tempo 0.

2.3 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Foram feitos ensaios baseados nos ensaios descritos em Asega e Carvalho (2004) , com a variação isolada para a definição dos pontos centrais dos seguintes parâmetros: tempo de reação e pH. Para análise do tempo de reação, foram preparadas as incubações contendo extrato e substrato na proporção 1:1, em temperatura de 30 °C. Foram retiradas alíquotas de 50 µl em 0,08 h; 0,16 h; 0,25 h; 0,5 h; 1 h; 1,5 h; 2 h; 3 h; 6 h; 12 h e 24 h.

Para verificar o efeito do pH, foi realizada incubação com extrato, substrato e tampão McIlvaine (0,2 M), proporção 2:1:1, nos pHs 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0. Foram retiradas alíquotas no tempo zero e após 6 horas de reação a 30 °C.

Em todas as incubações foram preparados o branco, no qual substitui-se o substrato por tampão de extração e o controle, no qual substitui-se o extrato por tampão de extração.

O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para avaliar a interação entre temperatura, concentração de substrato, pH e tempo de reação em 5 níveis cada na atividade da enzima 1-FEH. O delineamento experimental foi realizado no software Statgraphics Centurion XVI, versão 16.1.18 e resultou em 28 tratamentos (Tabela 1). Para cada tratamento foi realizado um branco, no qual substitui-se o substrato por tampão de extração.

Para análise da variação sazonal dos frutanos, os procedimentos foram realizados conforme descrito no Capítulo I.

2.4 ANÁLISE POR HPAEC/PAD

Foi utilizada a coluna CarboPac PA100 acoplada em cromatógrafo ICS 5000 (Dionex). Para a determinação da atividade de 1-SST, 1-FEH e invertase, foi utilizado um gradiente de acetato de sódio (500 mM) em hidróxido de sódio (100 mM). Para 1-FEH, utilizou-se a seguinte programação: 0-10 min: 5 mM; 10.1-35min: 5-50 mM; 35.1-40 min: 50-375 mM; 40.1- 45min: 500 mM. Para a 1-SST e invertase a seguinte programação: 0-2 min: 5 mM; 2.1-8min: 5-50 mM; 8.1-11 min: 50-150 mM; 11.1-14 min: 250 mM; 14.1-20 min: 5 mM. O fluxo de eluição foi de 1 mL/min (SILVA *et al.*, 2015). A quantificação dos produtos foi realizada pelo método do padrão externo pelo software Chromeleon 6.8 (Dionex). Frutose foi o produto quantificado para determinar a atividade das enzimas 1-FEH e invertase e 1-cestose foi quantificada para avaliar a atividade da 1-SST.

2.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Foi realizada eletroforese dos extratos dos sistemas subterrâneos de *C. exsucca*. O procedimento foi executado segundo Laemmli (1970). As amostras dos extratos dos meses de fevereiro, maio e julho foram adicionadas em tampão (glicerol 10%, β -mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl pH 6,8 0,0625 M), fervidas por 3 minutos e aplicadas em gel. Os géis foram confeccionados e submetidos a uma corrente de 30 mA, com voltagem constante, em um sistema de mini-gel da Thermo Scientific®. Após corrida, os géis foram corados com corante azul de Coomassie e descorados com metanol (50%) e ácido acético (10%), conforme Oakley *et al.*, 1980.

Tabela 1 Delineamento composto central rotacional (DCCR) em fase de floração I, para determinação dos valores ótimos de tempo de reação, temperatura (T°C), pH e concentração de substrato para a enzima frutano exohidrolase de órgãos subterrâneos de *C. exsucca*.

Ensaio	T °C	[] Substrato %	pH	Tempo (min)
1	20	3	4	20
2	40	3	4	20
3	20	5	4	20
4	40	5	4	20
5	20	3	6	20
6	40	3	6	20
7	20	5	6	20
8	40	5	6	20
9	20	3	4	50
10	40	3	4	50
11	20	5	4	50
12	40	5	4	50
13	20	3	6	50
14	40	3	6	50
15	20	5	6	50
16	40	5	6	50
17	10	4	5	35
18	50	4	5	35
19	30	2	5	35
20	30	6	5	35
21	30	4	3	35
22	30	4	7	35
23	30	4	5	5
24	30	4	5	65
25	30	4	5	35
26	30	4	5	35
27	30	4	5	35
28	30	4	5	35

3 RESULTADOS

A atividade de 1-SST aumentou exponencialmente até 3 h de incubação. A maior atividade de 1-SST foi obtida em incubação a 35°C e nos pHs de 4,5 e 6,0 (Figura 1).

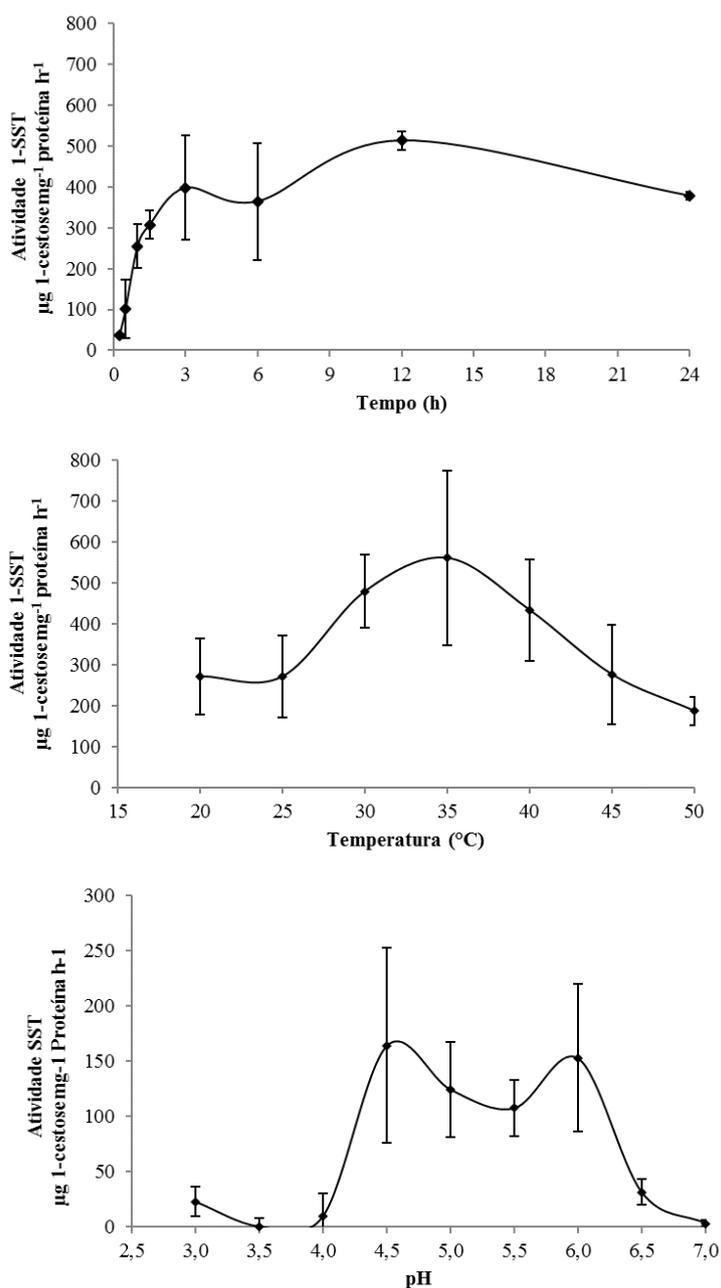


Figura 1 Atividade de sacarose: sacarose frutossiltransferase (1-SST) da região mediana em raízes de *Chresta exsucca* ocorrente no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros-GO, durante crescimento vegetativo (coleta fevereiro). Variações de tempo ($n = 2$), temperatura e pH ($n = 3$). As barras indicam erro padrão da média.

Os cromatogramas dos ensaios enzimáticos demonstram a variação na quantidade de 1-cestose (1-SST), bem como ausência de açúcares redutores no extrato branco (Figura 2). Observa-se maior produção de 1-cestose em 3 h e 12 h, produção de nistose a partir da 12^o hora de reação. Temperatura ótima de 35 °C e maior produção de 1-cestose nos pHs 4,5 e 6,0.

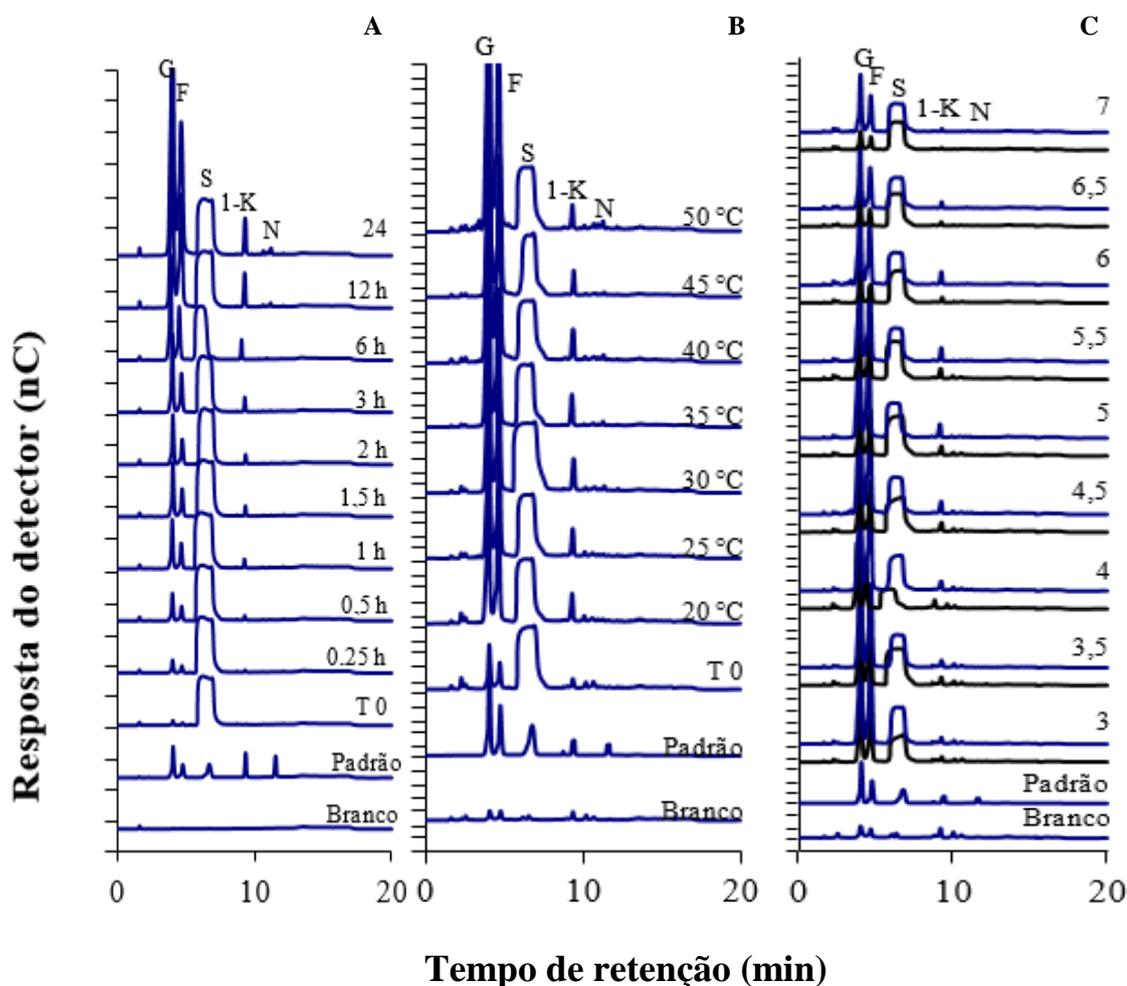


Figura 2 Cromatogramas analisados por HPAEC/PAD da região mediana de órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca* para 1-SST (coleta fevereiro). Análise de tempo (A), temperatura (B) e pH (C). Tempo 0 = linha preta e tempo 6 = linha azul. Extrato branco = ausência de substrato. G = glicose, F = frutose, S = sacarose, 1-K = 1-cestose e N = nistose.

Para as condições avaliadas para a enzima invertase, verificou-se maior atividade em 1 h de incubação e temperatura de 40 °C (Figura 3).

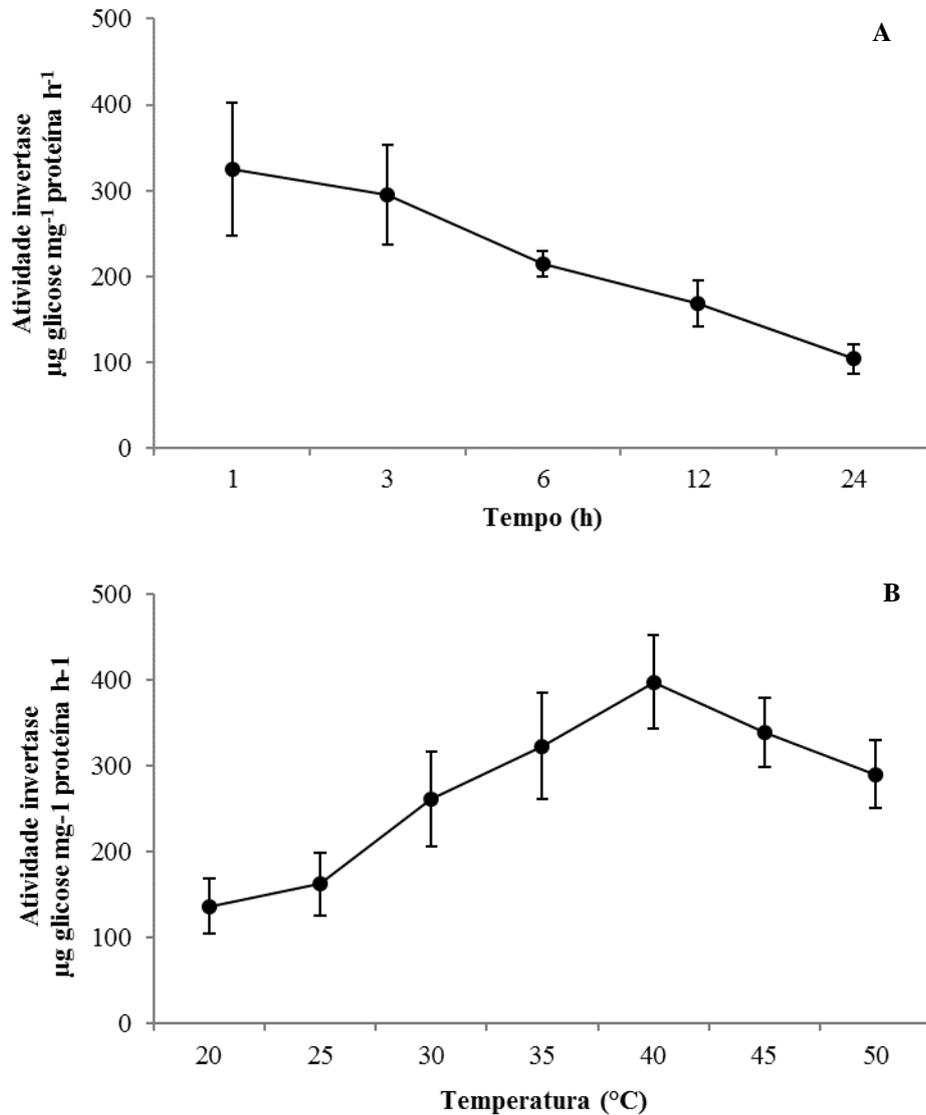


Figura 3 Atividade de invertase em diferentes condições de tempo e temperatura da região proximal em raízes de *Chresta exsucca* ocorrente no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros-GO, durante crescimento vegetativo (coleta fevereiro). Variações de tempo (A) e temperatura (B). As barras indicam erro padrão da média (n = 3).

Nos ensaios preliminares, a enzima 1-FEH apresentou máxima atividade em 5 minutos de reação e pH 5,0 (Figura 4).

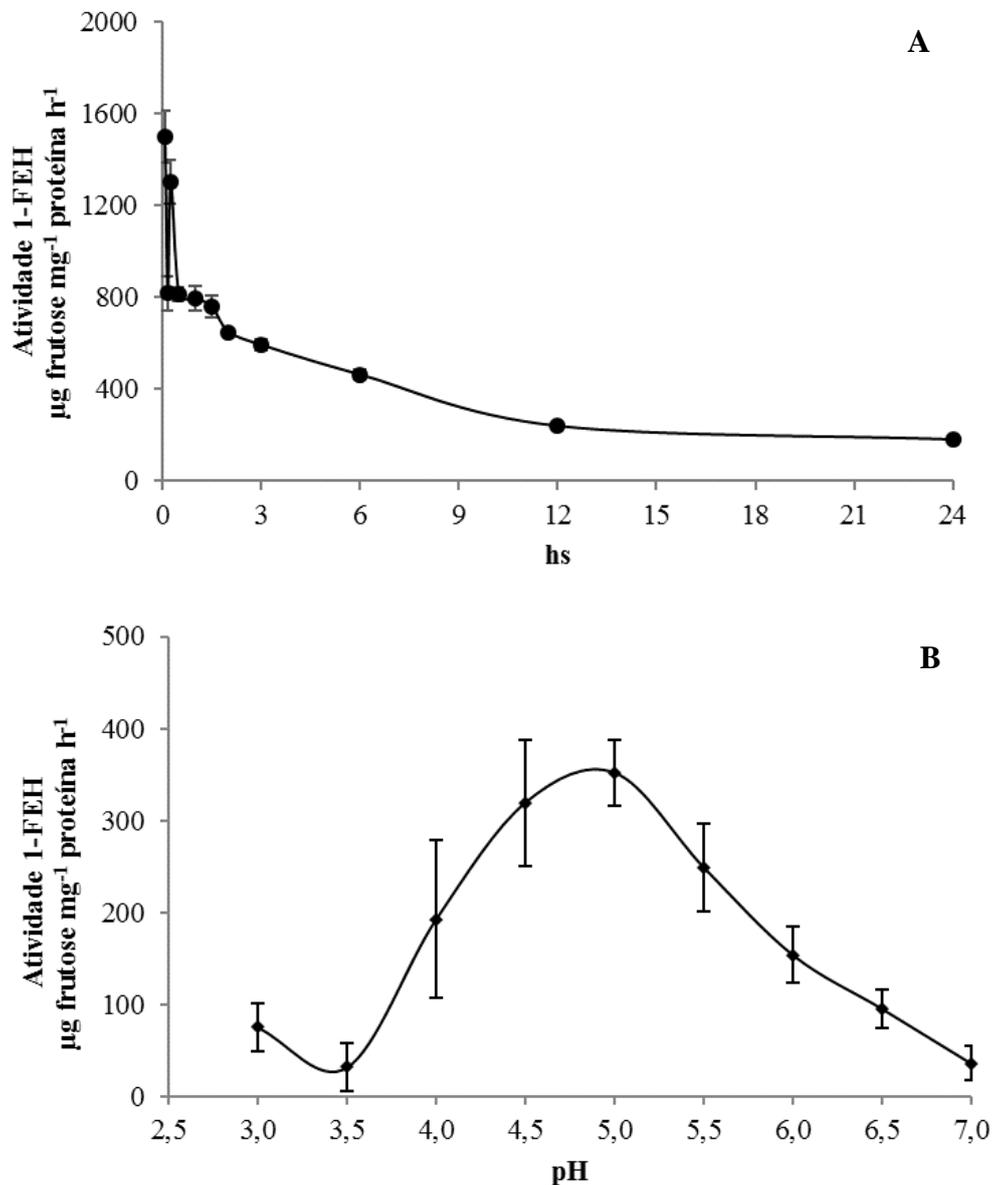


Figura 4 Atividade de 1-FEH em diferentes condições de tempo (A) e pH (B) da região proximal em ra\~{i}zes de *Chresta exsucca* ocorrente no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros-GO, as barras indicam erro padrão da m\~{e}dia (n = 3).

Os valores ótimos de atividade de 1-FEH, obtidos dos extratos de *Chresta exsucca*, foram: tempo de reação – 5 minutos; pH – 5,0 e concentração de substrato – 6 %. Com base nestes dados, verificou-se atividade, nessas condições, para as temperaturas de 35 °C e 50 °C (Figura 5), sendo registrada maior atividade em 50 °C. Para os extratos das diferentes fases fenológicas, baseadas nas quatro condições, a maior atividade de 1-FEH foi registrada na fase de brotação, em setembro (Figura 6). O menor índice foi registrado na fase de crescimento vegetativo, no mesmo período.

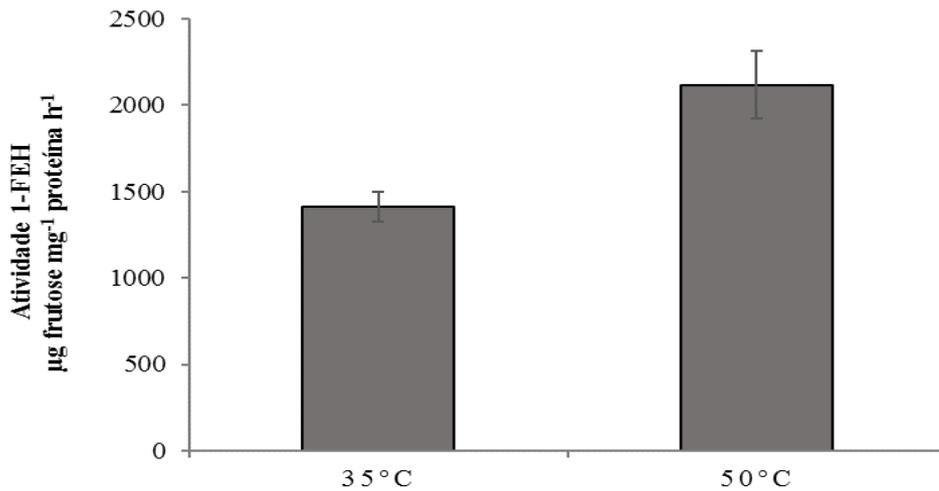


Figura 5 Atividade de 1-FEH da região proximal de órgãos subterrâneos de *C. exsucca*, na fase de floração I, em condições ótimas: tempo - 5 minutos; pH - 5,5 e concentração de substrato - 6%. As barras indicam erro padrão da média, n = 3.

A fase de brotação, em setembro, apresentou diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p = 0,00013$).

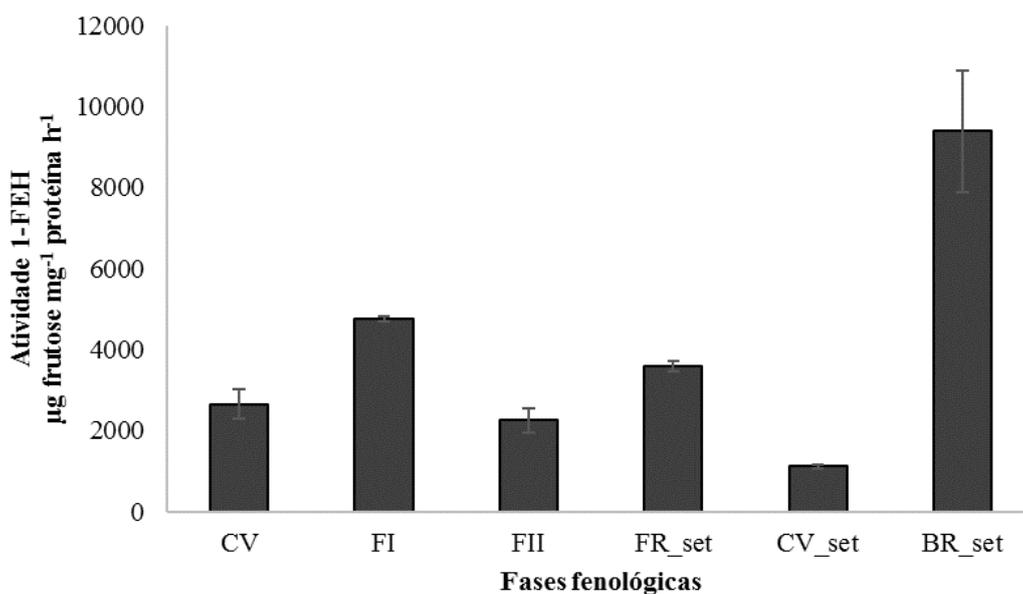


Figura 6 Variação da atividade de 1-FEH da região proximal de órgãos subterrâneos de *C. exsucca* em diferentes fases fenológicas. Condições ótimas: tempo - 5 minutos; temperatura 50°C; pH - 5,5 e concentração de substrato - 6%. As barras indicam erro padrão da média, n = 3. $P = 0,00013$.

3.1 EFEITO DOS DIFERENTES FATORES NA ATIVIDADE DA 1-FEH

O tempo de reação (D) e pH (C) tiveram efeito significativo sobre a atividade de 1-FEH, visto que estes fatores estão além da linha de significância. Apresentaram uma correlação negativa, indicando que, à medida que o tempo e pH aumentam, a atividade da 1-FEH decresce.

A temperatura apresentou uma correlação positiva com a atividade de 1-FEH. A concentração de substrato foi o fator que apresentou menor índice de influência sobre a atividade (Figura 7). Isso demonstra que a enzima apresenta taxas de atividades próximas em diferentes concentrações de substrato.

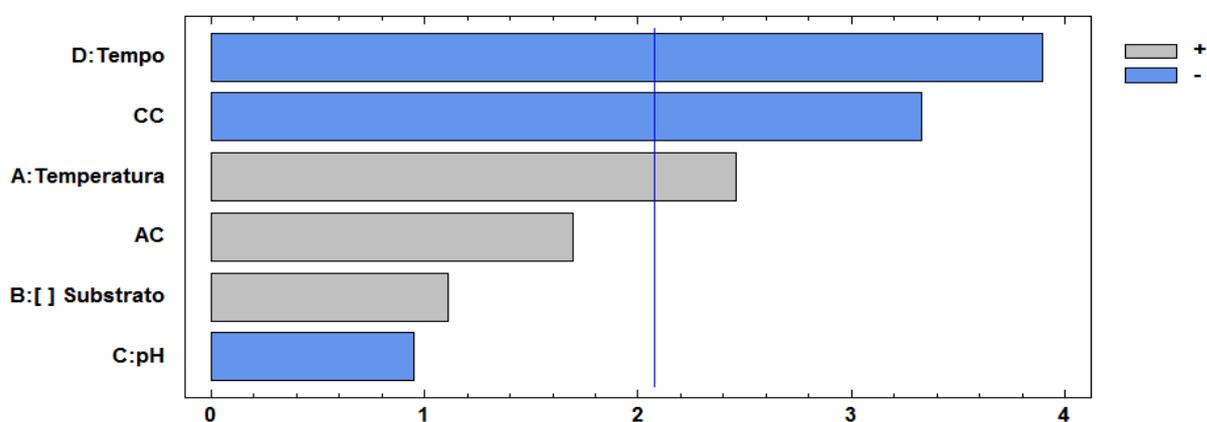


Figura 7 Efeito de diferentes fatores na atividade da 1-FEH em *Chresta exsucca*. A = fator temperatura; B = fator concentração de substrato; C = fator pH e D = fator tempo. Correlação negativa (azul) e correlação positiva (cinza).

A correlação entre temperatura e tempo (A) e pH e tempo (B) é observada na figura (8). Observa-se a maior produção de frutose na faixa de 5 minutos, 45 °C e no pH 5,0 (Figura 8A, 8B).

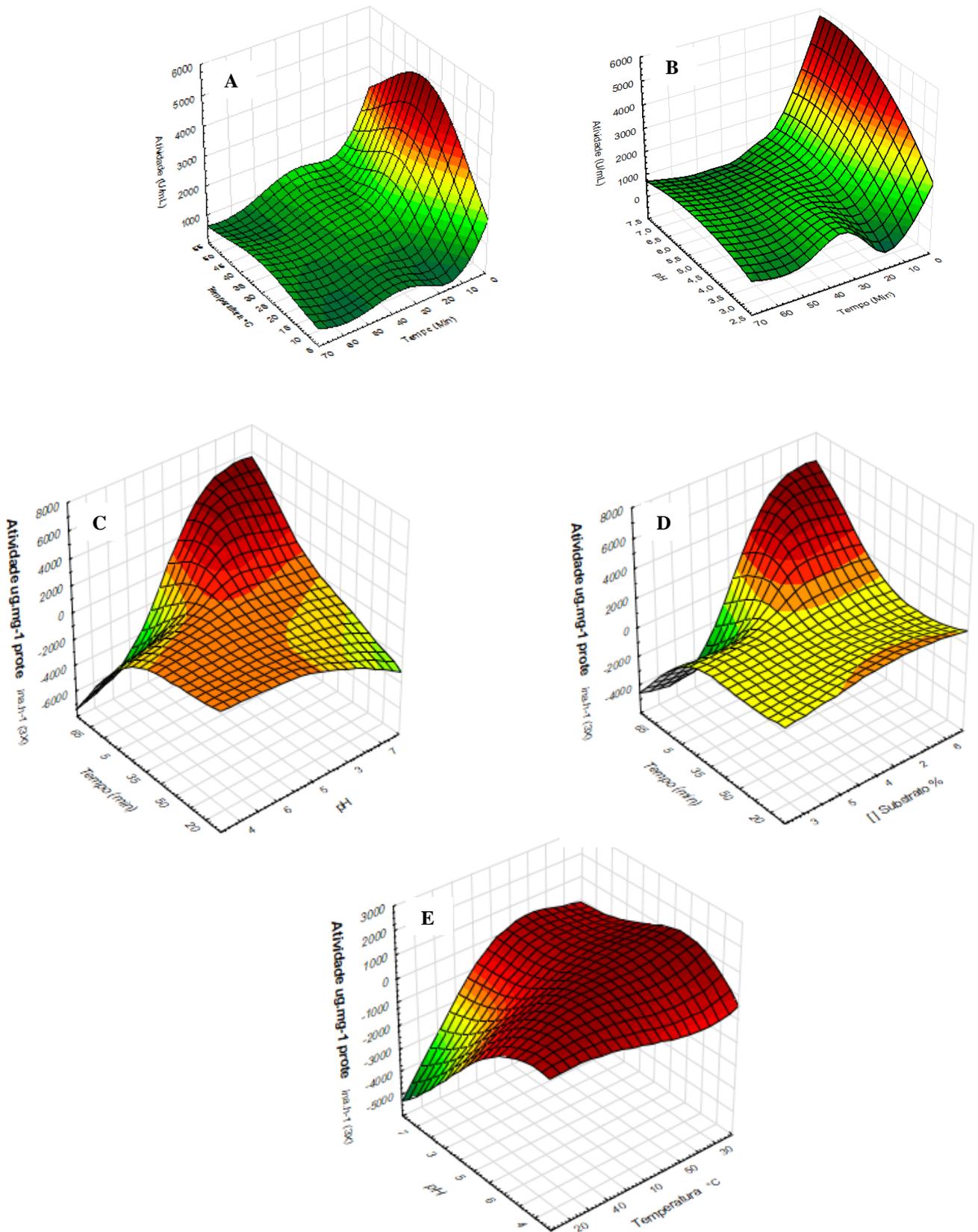


Figura 8 Gráficos de superfície para atividade de 1-FEH da região proximal de órgãos subterrâneos de *C. exsucca*. Relação dos fatores: temperatura-tempo (A) e pH-tempo (B). Atividade em U/mL. Relação dos fatores: tempo-pH (C), tempo-substrato (D) e pH-temperatura (E). Atividade em $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

3.2 PERFIL DE PROTEÍNAS

Verificou-se que os extratos das coletas nas fases de crescimento vegetativo, floração I e floração II, respectivamente, apresentam proteínas na faixa aproximada de 66 kDa (Figura 9), semelhante à FEH de outras espécies.

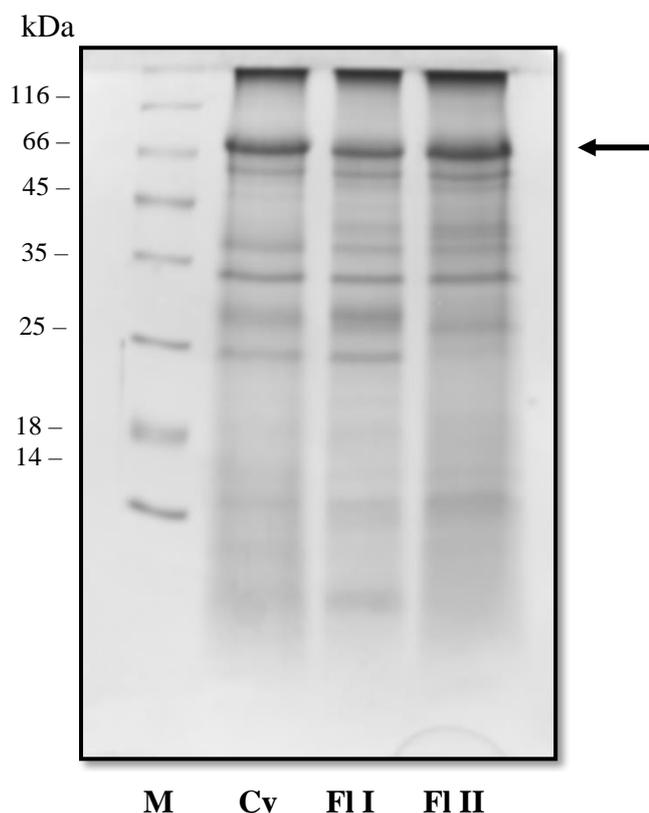


Figura 9 Perfil proteico da região proximal dos órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca*, coletados em fevereiro (Cv), maio (FI I) e julho (FI II). M = marcador molecular (kDa). A seta indica provável unidade de 1-FEH.

Observou-se a produção de frutose nos ensaios: 2 e 4; 5 e 8; 21 e 23; 22 e 28 do delineamento. As variações na produção de frutose foram observadas em padrões de variações para substrato (Figura 10A); temperatura e pH (Figura 10B); pH e tempo (Figura 10C) e apenas pH (Figura 10D).

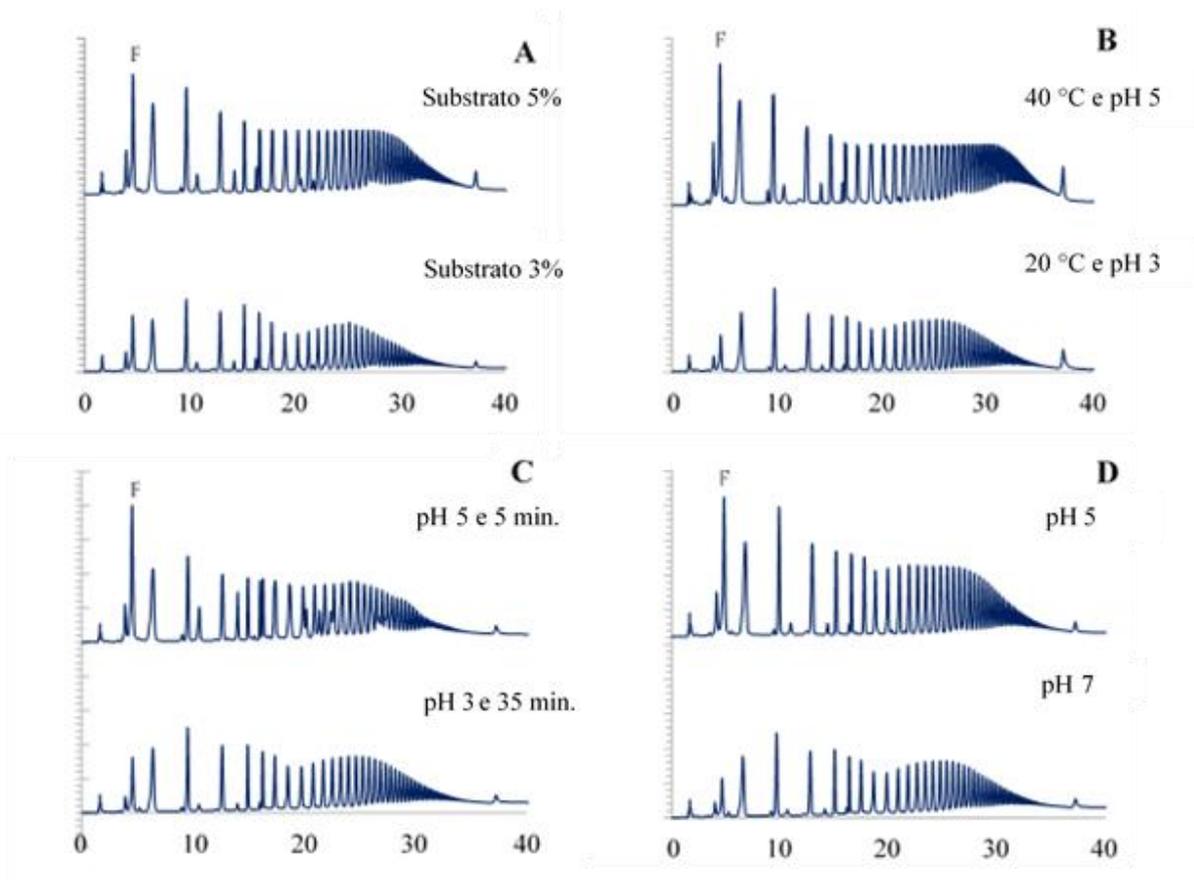


Figura 10 Produção de frutose nas diferentes condições dos ensaios: 2 e 4 (A); 5 e 8 (B); 21 e 23 (C) e 22 e 28 (D). F = frutose.

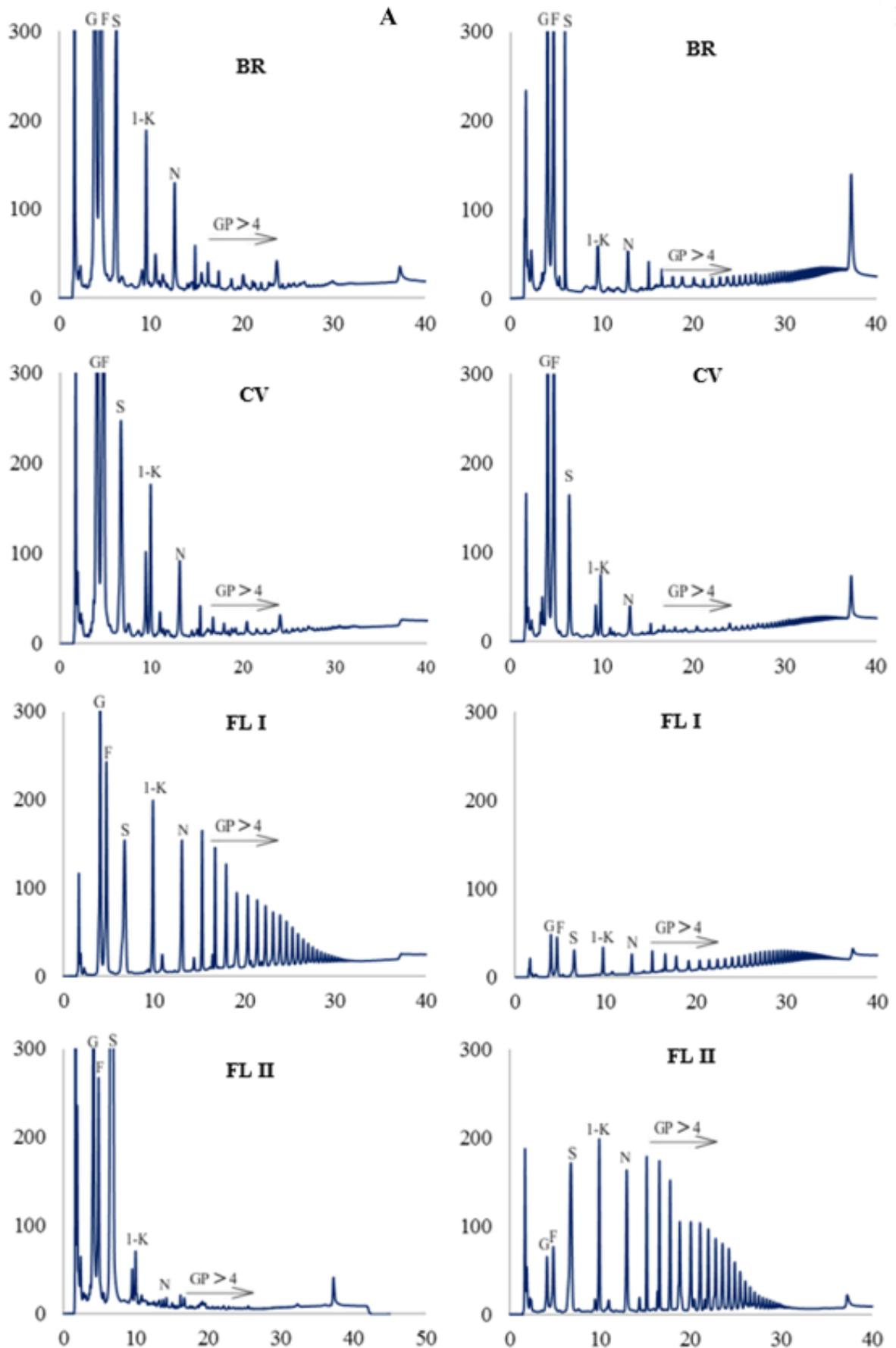
3.3 VARIAÇÃO SAZONAL DE FRUTANOS EM *C. EXSUCCA*

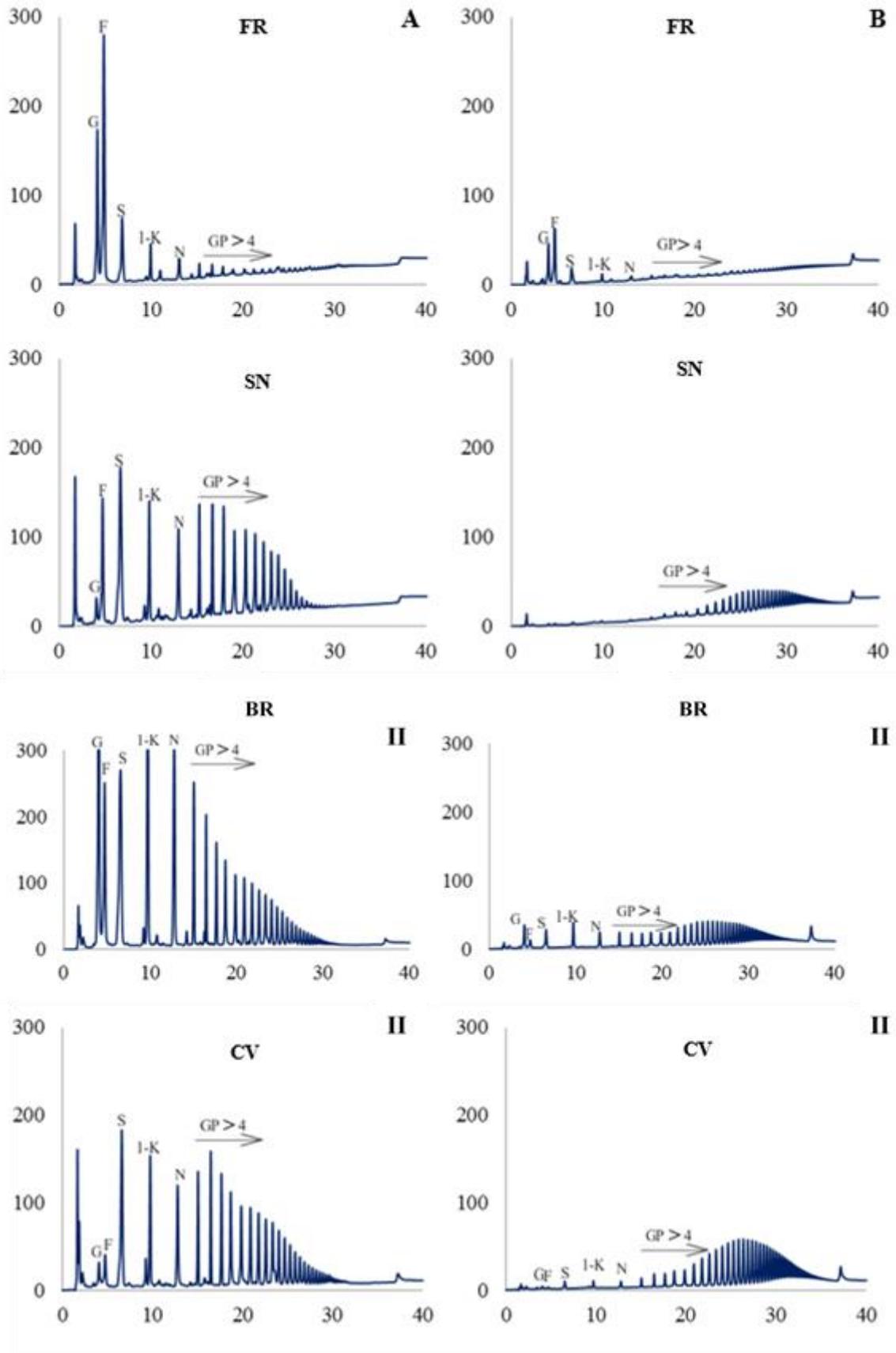
Em todas as fases analisadas, foram detectados picos de glicose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose (Figura 11). Nas fases de brotação e crescimento vegetativo, em fevereiro, foram observados os maiores picos de glicose e frutose livres em ambas as frações, além de picos de polissacarídeos. Em floração II, os picos de glicose e frutose também apresentaram altos índices, todavia, sem picos de polissacarídeos, indicando completa despolimerização dos frutanos.

As amostras analisadas no mesmo mês de coleta, porém em fases distintas, apresentaram altos índices de polissacarídeos, indicando efetivo armazenamento de frutanos para fases subsequentes. O GP foi superior a 50 na fase de crescimento vegetativo em setembro (Figura 11).

Ao comparar as mesmas fases fenológicas verifica-se que apenas para a fase de brotação há similaridade na análise qualitativa. Para as demais fases fenológicas observa-se que houve uma diferenciação no padrão de distribuição dos picos de oligo e polissacarídeos. Esse fator

indica que a sazonalidade também exerce importante influência para a determinação dos níveis de frutanos em *C. exsucca*, além da fenologia.





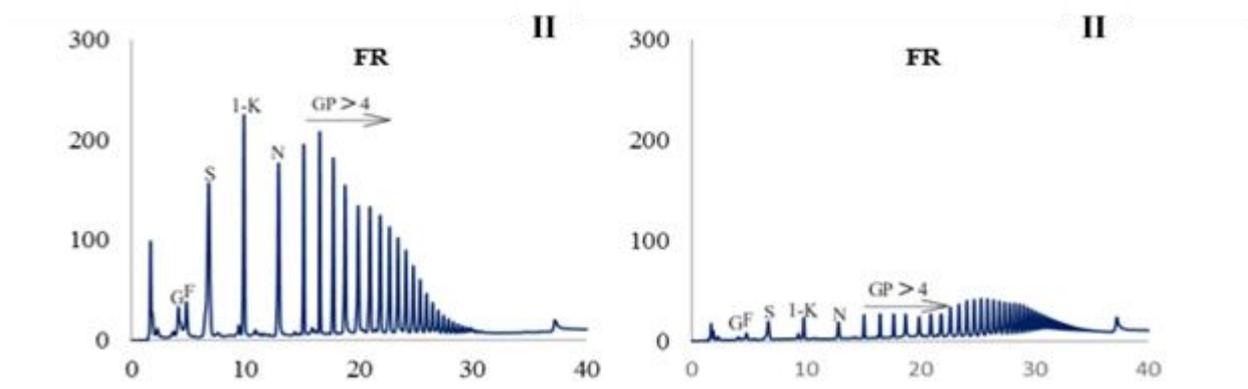


Figura 11 Cromatogramas analisados por HPAEC/PAD da região proximal de órgãos subterrâneos de *Chresta exsucca* para 1-FEH. Oligossacarídeos (A) e polissacarídeos (B). G = glicose, F = frutose, S = sacarose, 1-K = 1-cestose e N = nistose. BR = brotação, CV = crescimento vegetativo, FL I = floração I, FL II = floração II; FR = frutificação, SN = senescência. II = coleta em setembro.

4 DISCUSSÃO

O acúmulo de carboidratos em órgãos subterrâneos é recurso importante para crescimento e desenvolvimento das plantas e tornou-se característica típica dos grupos de vegetais que crescem em condições de Cerrado (JOAQUIM *et al.*, 2014). O armazenamento ocorre mediante altas concentrações de sacarose (RITSEMA & SMEEKENS, 2003) e a despolimerização de frutanos ocorre em períodos com alta demanda energética, como a brotação e crescimento (VIEIRA & FIGUEIREIDO-RIBEIRO, 1993). Os monossacarídeos e oligossacarídeos resultantes da despolimerização de frutanos em períodos de alta demanda energética ou estresse, não só fornecem suprimento energético, como atuam em diferentes mecanismos de proteção; auxiliam na redução do potencial osmótico (BIELESKI, 1993; VERGAUWEN *et al.*, 2000) e contribuem para a tolerância a seca e ao frio por meio da estabilização de membranas (HINCHA *et al.*, 2000; VEREYKEN *et al.*, 2001; HINCHA *et al.*, 2002).

Para a análise da atividade enzimática em diferentes fases fenológicas, a determinação das melhores condições para ensaios enzimáticos, constitui etapa importante. *C. exsucca* apresentou valores ótimos de atividade de 1-STT e invertase semelhantes aos valores de outras espécies da mesma família (Tabela 2); diferindo-se, moderadamente, quanto a 1-FEH. Isso indica que as vias metabólicas das espécies citadas seguem padrões similares para cada enzima do metabolismo de frutanos.

Em *C. exsucca*, no período de senescência da parte aérea, verifica-se aumento do pico de 1-cestose e de nistose, bem como presença de polissacarídeos. Essas características sugerem atuação de 1-SST e 1-FFT, indicando, também, que a enzima 1-FEH estava em menor atividade nessa fase fenológica. Em *Aldama discolor* a atividade de 1-SST é influenciada pela fenologia, pois a enzima apresenta aumento da atividade no início da dormência de raízes (ITAYA *et al.*, 1999). Em *Cichorium intybus* a atividade de 1-SST está relacionada ao crescimento da raiz, assim que o crescimento da raiz é estabilizado, a atividade de 1-SST também diminui gradativamente (VAN DEN ENDE & VAN LAERE, 1996).

Durante a brotação e o crescimento vegetativo, altos picos de glicose e frutose são observados em *C. exsucca*, além de picos de oligossacarídeos e polissacarídeos, sinalizando ação de 1-FEH e invertase. Além de atuarem conjunto com fitormônios na regulação de vários processos metabólicos, as invertases são relacionadas a regulação de ferimentos em tubérculos e ápices de raízes, além da correlação entre aumento na atividade de invertases e a incidência de patógenos em vegetais (MATSUSHITA & URITANI, 1974; STURM & CHRISPEELS, 1990).

Entre floração I e II, observa-se uma transição de acúmulo de polissacarídeos para altos picos de oligossacarídeos e elevados picos de frutose, evidenciando acentuada atividade de 1-FEH. A atividade enzimática de 1-FEH foi detectada em rizóforos de *Chrysolaena obovata* na fase de brotação e mediante estímulos de estresse como desfolha e baixas temperaturas (ASEGA & CARVALHO, 2004; PORTES & CARVALHO, 2006; ASEGA *et al.*, 2008). Esse fator indica que 1-FEH é fundamental para despolimerização de frutanos em fases de alta demanda energética e/ou situações de estresse.

Tabela 2 Condições ótimas de atividade de 1-SST, 1-FEH e invertase em *C. exsucca* e diferentes espécies.

1-SST					
Espécie	Tempo	Temperatura	pH	Artigo	
<i>Chresta exsucca</i>	3 h	35 °C	4,5/ 6,0	-	
<i>Cichorium intybus</i>	1 h	30 °C	5,2	KUSCH <i>et al.</i> , 2009	
<i>Chrysolaena obovata</i>	6 h	30 °C	-	ASEGA & CARVALHO, 2004	
<i>Helianthus tuberosus</i>	-	34 °C	5,4	PRAZNIK <i>et al.</i> , 1990	
<i>Hordeum vulgare</i>	-	30 °C	-	SIMMEN <i>et al.</i> , 1993	
1-FEH					
Espécie	Tempo	Temperatura	pH	Substrato	Artigo
<i>Chresta exsucca</i>	0,08 h	50 °C	5,5	6%	-
<i>Cichorium intybus</i>	1 h	30 °C	5,5	-	KUSCH <i>et al.</i> , 2009
<i>Chrysolaena obovata</i>	2 h	40 °C	5,5	5%	ASEGA & CARVALHO, 2004
<i>Helianthus tuberosus</i>	1 h	40 °C	5,2	3%	MARX <i>et al.</i> , 1997
<i>Triticum aestivum</i>	1 h	30 °C	-	3%	VAN DEN ENDE <i>et al.</i> , 2003 ^a

INV				
Espécie	Tempo	Temperatura	pH	Artigo
<i>Chresta exsucca</i>	1 h	40 °C	-	-
<i>Cichorium intybus</i>	1 h	30 °C	5,5	KUSCH <i>et al.</i> , 2009
<i>Chrysolaena obovata</i>	4 h	30 °C	5,5	ASEGA & CARVALHO, 2004
<i>Helianthus tuberosus</i>	-	25 °C	5,2	ASEGA & CARVALHO, 2004
<i>Hordeum vulgare</i>	3 h	-	-	SIMMEN <i>et al.</i> , 1993

C. exsucca apresenta proteínas com aproximadamente 66 kDa, valor aproximado ao verificado para a 1-FEH em *Cichorium intybus*, de 68kDa (CLAESSENS *et al.*, 1990) e de 1-FEHII em 64kDa (ROOVER *et al.*, 1999). Em *Helianthus tuberosus*, 1-FEH apresenta massa molecular de 75 kDa (MARX *et al.*, 1997).

O metabolismo da inulina em *C. exsucca*, evidencia a capacidade adaptativa da espécie em ambiente de Cerrado, possibilitando o ideal desenvolvimento e reprodução da espécie, mesmo durante a seca e estresse.

5 CONCLUSÃO

A atividade enzimática de *C. exsucca* apresenta diferenciações nos parâmetros de análise, principalmente quanto a 1-FEH. Apesar desses valores serem relativamente tênues, tais diferenças podem determinar e possibilitar mecanismos importantes para a espécie. *C. exsucca* apresenta sucesso reprodutivo peculiar se comparada a demais espécies de Asteraceae. A elevada e significativa produção de frutose na fase de brotação, em setembro, permitiu constatar importante atividade enzimática de 1-FEH para disponibilização de recursos energéticos e demais mecanismos de resistência da planta.

Apesar de não terem sido realizados ensaios em diferentes fases fenológicas para 1-SST e invertase, os ensaios prévios demonstraram que, em *C. exsucca*, tais enzimas atuam em fases previstas de metabolização. Durante a frutificação em setembro, por exemplo, observam-se altos picos de 1-cestose (1-SST). No período de crescimento vegetativo, altos picos de glicose e

frutose são observados, além de picos menores de oligossacarídeos e polissacarídeos, sinalizando ação de 1-FEH e invertase.

Portanto, a minuciosa atuação dos frutanos nos processos metabólicos de *C. exsucca* e em demais espécies do Cerrado são permeados por diversos fatores e estímulos. Tais condições conferem caráter de resistência e adaptação fundamentais para os vegetais nesses biomas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em *Chresta exsucca* as fases fenológicas ocorrem em épocas distintas de outras espécies herbáceas de Asteraceae do Cerrado. Nesta espécie, a fenologia parece influenciar fortemente nas variações dos frutanos nos órgãos subterrâneos. As alterações no perfil de frutanos possuem padrão semelhante ao de outras Asteraceae, com predominância de oligossacarídeos nas fases com maior demanda de carboidratos e de polissacarídeos quando a senescência da parte aérea é intensa. Isso comprova que os frutanos são importantes para a adaptação das espécies de Asteraceae ao Cerrado, pois possibilitam o pleno desenvolvimento das plantas, mesmo sob condições ambientais desfavoráveis, como a seca.

Este estudo demonstra a importância da fenologia no acúmulo de frutanos e na atividade de enzimas relacionadas a esse metabolismo. Verifica-se que, em *C. exsucca*, a enzima 1-FEH atua em alta temperatura se comparada a outras espécies relatadas. Diante disso, o aumento da temperatura global, frente às mudanças climáticas, pode proporcionar um efeito positivo quanto ao metabolismo de frutanos na espécie.

Por outro lado, é importante ressaltar que essas alterações enzimáticas em decorrência de elevações de temperaturas, em conjunto com fatores de redução do regime de chuvas, por exemplo, podem gerar efeitos negativos para a produção de carboidratos. A redução na disponibilidade de fotoassimilados poderia induzir senescência precoce em período de floração, com intuito de regular o gasto energético em condições de estresse.

Por conseguinte, informações e estudos a respeito de diferentes espécies que vivem em condições do Cerrado, pode elucidar distintos caminhos metabólicos sobre a importância e o funcionamento do metabolismo de frutanos.

7 REFERÊNCIAS

- ASEGA, A. F.; CARVALHO, M. A. M. Fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 313-319. 2004.
- ASEGA, A. F. *et al.* Cloning, characterization and functional analysis of 1-FEHcDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. **Plant Cell Physiology**, v. 49, p. 1185-1195. 2008.
- BIELESKI, R. Fructan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower. **Plant Physiology**, v. 103, p. 213-219. 1993.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, p. 248-254. 1976.
- CARVALHO, M. A. M.; ASEGA, A. F.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructans in Asteraceae from Brazilian Cerrado, p. 69-91. In **Recent advances in fructooligosaccharides research**. Edited by N. Shiomi, N. Benkeblia, and O. Shuichi. Research Signpost, Kerala. 2007.
- CLAESSENS, G.; VAN LAERE, A.; DE PROFT, M. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 136, p. 35-39. 1990.
- HENDRY, G. A. F.; WALLACE, R. K. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: Suzuki M. & Chatterton, J. N. (eds.) **Science and Technology of fructan**. Boca Raton: CRC Press. 1993.
- HINCHA, D. K. *et al.* Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 535-540. 2000.
- HINCHA, D. K. *et al.* Specific effects of fructo and glucooligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. **Glycobiology**, v. 12, p. 103-110. 2002.
- ITAYA, N. M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; BUCKERIDGE, M. S. Synthesis of fructans by fructosyltransferase from the tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 435-442. 1999.
- JOAQUIM, E. O. *et al.* Inulin contents and tissue distribution in underground storage organs of Asteraceae species from the Brazilian rocky fields. **Botany**, v. 92, p. 827-836. 2014.
- KUSCH, U. *et al.* Inhibitors of plant invertases do not affect the structurally related enzymes of fructan metabolism. **New Phytologist**, v. 181, p. 601-612. 2009.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685. 1970.
- LIVINGSTON, D. P.; HINCHA, D. K.; HEYER, A. G. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. Review. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 2007-2023. 2009.

MARX, S. P.; NOSBERGER, J.; FREHNER, M. Seasonal variation of fructan-beta-fructosidase (FEH) activity and characterization of a beta (2,1) linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). **New Phytologist**, v. 135, p. 267-277. 1997.

MATSUSHITA, K.; URITANI, I. Change in invertase activity of sweet potato in response to wounding and purification and properties of its invertases. **Plant Physiology**, v. 54, p. 60-66. 1974.

OAKLEY, B. R.; KIRSCH, D. R & MORRIS, N. R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 105, p. 361-363.

PESHEV, D. *et al.* Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 1025-1038. 2013.

PORTES, M. T.; CARVALHO, M. A. M. Spatial distribution of fructans and fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby in different developmental phases. **Plant Science**, v. 170, p. 624-633. 2006.

PRAZNIK, W.; BECK, R. H. F.; SPIES, T. Isolation and characterization of sucrose:sucrose 1-beta-D-fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus* L. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54, p. 2429-2431. 1990.

RITSEMA, T.; SMEEKENS, S. Fructans: beneficial for plants and humans. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 223-230. 2003.

ROOVER, J. DE. *et al.* Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus* L. **Physiology Plant**, v. 106, p. 28-34. 1999.

SILVA, T. M. *et al.* Anatomy and fructan distribution in vegetative organs of *Dimerostemma vestitum* (Asteraceae) from the campos rupestres. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 03-09. 2015.

SIMMEN, U. *et al.* Fructan synthesis in excised barley leaves. Identification of two sucrose-sucrose fructosyltransferases induced by light and their separation from constitutive invertases. **Plant Physiology**, v. 101, p. 459-468. 1993.

STURM, A.; CHRISPEELS, M. J. cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. **Plant Cell**, v. 2, p. 1107-1119. 1990.

VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE, A. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during growth, storage and forcing. **Plant Physiology**, v. 149, p. 43-50. 1996.

VAN DEN ENDE, W. *et al.* Defoliation induces 1-FEHII (fructan 1-exohydrolase II) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEHIIa e 1-FEHIIb). Mass fingerprint of the 1-FEHII enzymes. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1186-1195. 2001.

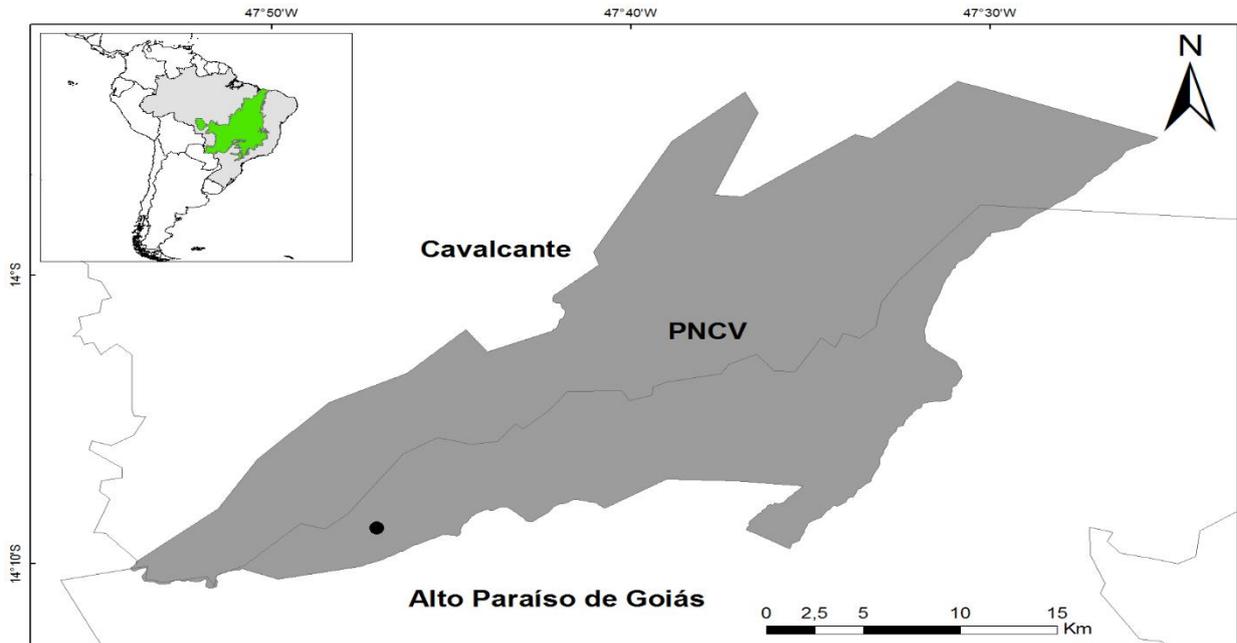
VAN DEN ENDE, W. *et al.* Fructan 1- exohydrolases: β (2,1) trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. **Plant Physiology**, v. 131, p. 621-631. 2003a.

VAN LAERE, A.; VAN DEN ENDE, W. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 803-813. 2002.

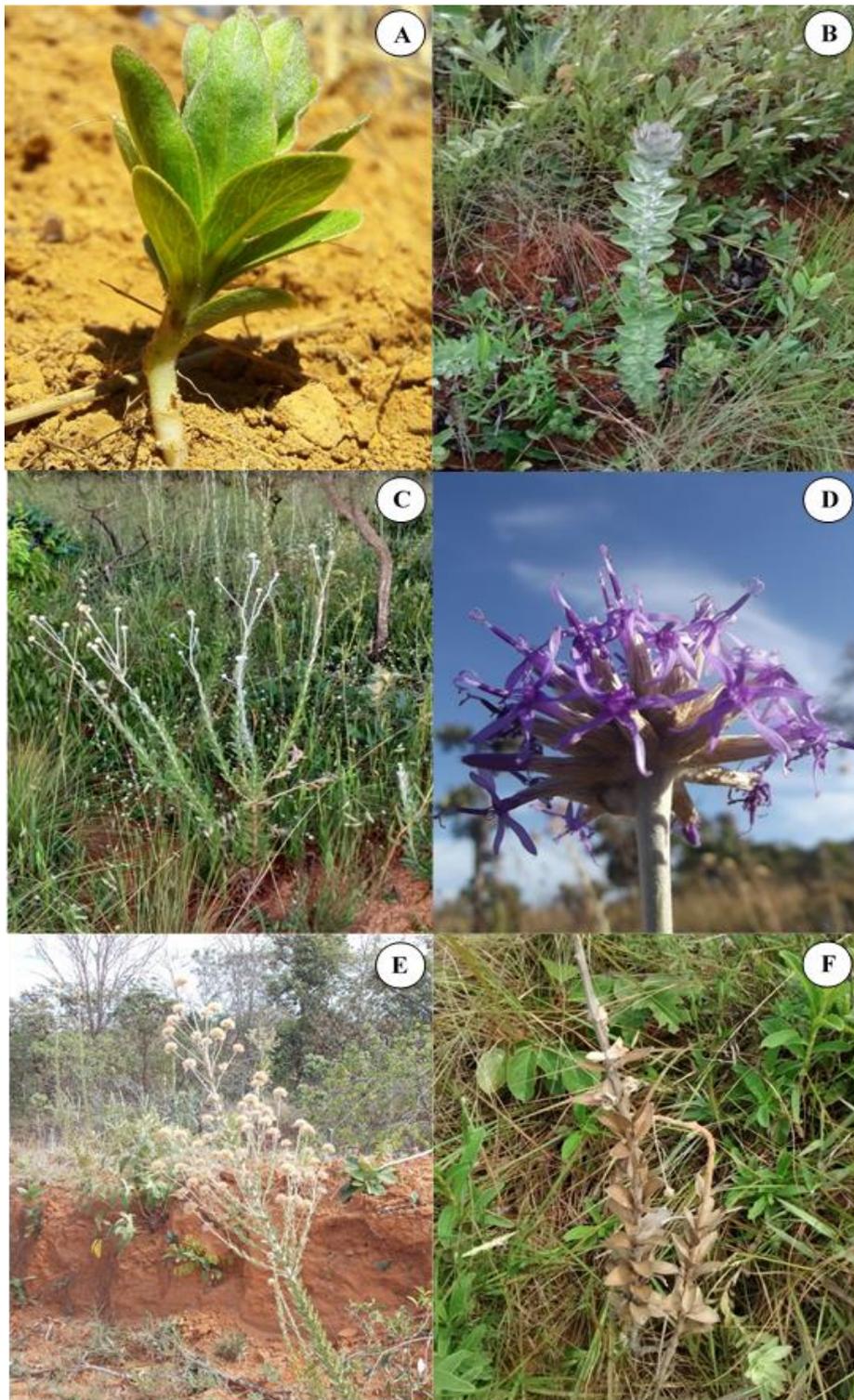
VEREYKEN, I. J. *et al.* Fructans insert between the headgroups of phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1510, p. 307-320. 2001.

VERGAUWEN, R.; VAN DEN ENDE, W.; VAN LAERE, A. The role of fructan in flowering of *Campanula rapunculoides*. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1261-1266. 2000.

VIEIRA, C. C. J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Fructose-containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae) at different phenological phases. **Plant, Cell and Environment**, v. 16, p. 919-928. 1993.

8 ANEXOS

Anexo 1 Mapa do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros entre os municípios de Alto Paraíso e Cavalcante (GO). Área de abrangência do bioma Cerrado no Brasil. Mapa desenvolvido no programa ArcGIS v.10,5@



Anexo 2 *Chresta exsucca* em Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros-GO. Coletas: outubro/15 a julho/16. Ciclo fenológico: brotação (A), crescimento vegetativo (B), floração I (C), floração II (D), frutificação (E), senescência (F).