SECRETARIA
DE
PÓS GRADUAÇÃO

MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

Este exemplar corresponde à redação final da tese de Doutorado defendida pela candidata Maria Angela Machado de Carvalho e aprovada pela Comissão Julgadora.

Campinas, 08 de julho de 1991

Sonia M. C. Dietrich

Variações no conteúdo e na composição de frutanos em rizóforos de **Vernonia herbacea** (Vell.) Rusby

01/216/16

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dra. Sonia Machado de Campos Dietrich

CAMPINAS

1991

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ninguém pode prever o futuro, mas uma coisa se sabe: o próximo quarto de século será o momento dos biólogos, que estarão no centro de atividades que governam aspectos primordiais da vida. Entre estes alguns dos mais desafiantes problemas intelectuais, tais como os mecanismos da memória e da aprendizagem, a base molecular do desenvolvimento embrionário e as regras que ajudam a prever o comportamento do meio ambiente. A Biologia encontra-se também no centro de problemas sociais que deverão ser enfrentados pela raça humana na próxima década, tais como o cuidadoso manejo do meio ambiente e uma solução eficaz para o crescimento populacional. É portanto, de vital importância que os povos compreendam a contribuição que as ciências biológicas tem oferecido e continuarão a oferecer para o bem-estar dos seres humanos.

A minha mãe,

ao Mauro e

aos queridos Natália e Pedro,

pelos momentos de alegria.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Sonia Machado de Campos Dietrich, pela orientação valiosa e apoio dedicado durante a realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. Ladaslav Sodek, Dra. Maria de Fátima A. Pereira e Dra. Rita de Cássia L. Figueiredo-Ribeiro, pela revisão crítica do texto e pelas sugestões oferecidas.

A Dra. Lilian Beatriz Penteado Zaidan, pelas sugestões durante a elaboração e interpretação da análise de crescimento.

Ao Mauro Carvalho, pelo auxílio na editoração gráfica e confecção das figuras e, principalmente, pela incansável amizade, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos colegas da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela amizade constante e pelos momentos de alegria compatilhados.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, pelas facilidades oferecidas, aos funcionários das Seções de Publicações e de Ilustração Botânica e do Setor de Fotografia, que contribuiram para a forma final da tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio recebido.

ABREVIATURAS

KD - kilodaltons

GP - grau de polimerização

PM - peso molecular

SST - sacarose:sacarose 1-F frutosiltransferase

FFT - frutano:frutano frutosiltransferase

FEH - frutanoexohidrolase

TAL - taxa de assimilação líquida

RAF - razão de área foliar

INDICE

Página

I. INTRODUÇÃO

1. Presença de frutanos em vegetais superiores 1

1.1. Ocorrência e distribuição 5

1.2. Estrutura 8

1.3. Propriedades gerais 13

2. Biossíntese e despolimerização de frutanos 14

2.1. Sacarose:sacarose: frutosiltransferase 14

2.2. Frutano:frutano frutosiltransferase 16

2.3. Despolimerização 18

2.4. Localização celular das enzimas do metabolismo de frutanos 19

3. Variações no conteúdo de frutanos 20

3.1. Dicotiledôneas 20

3.2. Monocotiledôneas (Gramineae) 23

4. Importância do metabolismo de frutanos 24

4.1. Proteção contra o frio e a seca 25

4.2. Frutanos e Amido 27

5. Importância econômica dos frutanos 28

II. OBJETIVOS 30

III. MATERIAL E MÉTODOS 31

1. Material 31

1.1. Material vegetal 31

1.2. Substâncias químicas 31

1.3. Equipamentos 33

2. Métodos 33
2.1. Obtenção e plantio de fragmentos de rizóforos . 33
2.2. Obtenção de amostras 34
2.3. Análise do crescimento 35
2.3.1. Estimativa da área foliar 36
2.3.2. Determinação dos pesos da matéria fresca e seca 36
2.4. Análise dos carboidratos 38
2.4.1. Extração de oligofrutanos 38
2.4.2. Extração de polifrutanos 39
2.4.3. Extração de amido 42
2.4.4. Resíduo 42
2.4.5. Análise quantitativa dos açúcares 43
2.4.6. Análise qualitativa dos açúcares 44
2.5. Análise estatística 45

IV. RESULTADOS 47
1. Estudo da variação dos carboidratos e da brotação em rizóforos de V. herbacea em diferentes estádios fenológicos 47
1.1. Caracterização dos estádios fenológicos 47
1.2. Análises quantitativas 47
1.2.1. Matéria seca 47
1.2.2. Oligofrutanos e açúcares redutores 49
1.2.3. Polifrutanos 49
1.2.4. Amido 51
1.3. Análises qualitativas 52
1.3.1. Oligofrutanos 52

1.3.2. Polifrutanos 54
1.4. Brotação de fragmentos de rizóforos 54
2. Estudo do desenvolvimento da planta e dos frutanos em rizóforos de V. herbacea 58
2.1. Crescimento das plantas a partir de fragmentos do rizóforo 58
2.2. Conteúdo e composição dos frutanos durante o crescimento da planta 71
2.2.1. Análises quantitativas 71
2.2.2. Análises qualitativas 78
2.2.2.1. Oligofrutanos 78
2.2.2.2. Polifrutanos 78

V. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES 82
1. Variação dos frutanos em rizóforos de plantas coletadas no cerrado, em diferentes estádios fenológicos 82
2. Brotação de fragmentos de rizóforos retirados de plantas em diferentes estádios fenológicos 90
3. Variação dos frutanos durante o crescimento de novas plantas 91

VI. RESUMO 100

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 103

I. INTRODUÇÃO

A existência de diversas espécies nos cerrados do Brasil meridional que apresentam sistemas subterrâneos espessados foi citada por RAWITSCHER et al. (1943). Segundo MANTOVANI (1983), cerca de 50% da vegetação herbácea e subarbustiva do cerrado apresenta órgãos subterrâneos espessados, fato este que sugere a importância ecológica dessas estruturas.

Tais órgãos poderiam garantir às espécies que os possuem, sobrevivência nos períodos desfavoráveis (RAWITSCHER et al. 1943) possibilitando ainda a recuperação da parte aérea morta durante uma seca prolongada (FERRI, 1944) ou pela ação do fogo, uma vez que as gemas presentes nesses órgãos ficam protegidas no interior do solo (RACHID-EDWARDS, 1956).

Outros autores sugeriram a importância dos órgãos subterrâneos espessados como estrutura de propagação vegetativa (LABOURIAU, 1966; RIZZINI & HERINGER, 1966) ou de armazenamento de água (RIZZINI & HERINGER, 1961).

A propagação vegetativa através desses órgãos é de grande importância na natureza, visto que muitas das espécies que os possuem não produzem sementes ou as produzem em pequenas quantidades. Além desta, existe a vantagem de quando empregada como técnica de reprodução vegetativa pelo homem, possibilitar a obtenção de material geneticamente uniforme (JANICK, 1968).

A maioria das espécies de cerrado, que possuem órgaos subterrâneos espessados, apresentam crescimento estacional, passando por um período de dormência, que coincide com a estação

seca de inverno, seguido de intensa e rápida brotação, acompanhada de floração, nas estações chuvosas da primavera e verão, perdendo gradualmente suas folhas ou toda a parte aérea no outono (RACHID, 1947).

DE VUONO et al.(1986) realizaram um estudo sobre os dados climatológicos da região de cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú e verificaram que no período de maio a agosto há, naquela região, uma diminuição da pluviosidade e consequente diminuição na quantidade de água no solo, embora não ocorra deficiência hídrica todos os anos. Aquele período coincide com a queda da média de temperatura e com a diminuição do comprimento do dia e da umidade relativa do ar.

Segundo MANTOVANI (1983), os fatores abióticos mencionados, juntamente com os fatores bióticos, estão relacionados com a fenologia das plantas no cerrado. Este autor verificou que a maioria das espécies herbáceo-arbustivas do cerrado mantêm um comportamento fenológico vegetativo relacionado às adaptações reprodutivas. Desta forma, os ramos aéreos das espécies geófitas e hemicriptófitas morrem após a floração e frutificação, reduzindo a planta, na maioria das vezes, ao seu sistema subterrâneo.

Na maioria dessas espécies, o desenvolvimento vegetativo parece propiciar o acúmulo de carboidratos que eventualmente são utilizados pela planta durante a floração e a frutificação, conforme observou TENÓRIO (1969) para Gramineae. Após verificar que a frequência de floração de espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú é maior nos períodos após a brotação, na primavera, MANTOVANI (1988) inferiu que espécies hemicriptófitas

e geófitas necessitam de um acúmulo de carboidratos antes da floração. Isso ressalta a importância que tem a propagação vegetativa no cerrado e a manutenção do espaço ocupado pelos indivíduos, já que, aparentemente, as reservas contidas nos órgãos subterrâneos das espécies hemicriptófitas e geófitas são utilizadas em grande parte para a brotação, de acordo com o que foi sugerido por MANTOVANI (1988).

A família Asteraceae encontra-se amplamente distribuida no cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú, e apresenta o maior número de espécies quando comparada com outras famílias ali representadas, contribuindo com 89 espécies , o que corresponde a 16,95% das espécies encontradas nessa região (MANTOVANI, 1983).

As Asteraceae apresentam uma grande variedade de hábitos de crescimento, desde árvores até ervas perenes e anuais diminutas, além de formas intermediárias, como arbustos e plantas trepadeiras (STEBBINS, 1977). Possuem grande importância econômica por apresentarem diversas espécies largamente cultivadas com propósitos alimentícios, industriais e ornamentais (LEITÃO FQ., 1972)

A família Asteraceae foi dividida por HOFFMANN (1894 in SAJO, 1982) em duas subfamílias: Tubiflorae ou Asteroidae, que reune doze tribos, e Liguliflorae ou Cichorioideae, com uma só tribo. O gênero **Vernonia** Screb. pertence à tribo Vernoniae Less., que agrupa 1456 espécies em 70 gêneros dentro da subfamília Tubiflorae.

O gênero **Vernonia** é o maior da tribo (JONES, 1977) e compreende desde plantas arbóreas, arbustivas e subarbustivas até herbáceas. É de ampla ocorrência no cerrado da Reserva Biológica

de Moji-Guaçú (MANTOVANI, 1983), onde encontra-se representado por 22 espécies, todas do estrato herbáceo-subarbustivo.

Estudos morfológicos e anatômicos de órgãos subterrâneos de plantas do cerrado foram extensivos e revelaram estruturas de natureza e formas variadas (DIETRICH & FIGUEIREDO-RIBEIRO, 1985 e referências ali contidas). No entanto, pouco se conhece sobre a bioquímica dos compostos de reserva desses órgãos e suas relações com o ciclo estacional e com o desenvolvimento das plantas, além dos trabalhos de FIGUEIREDO-RIBEIRO & DIETRICH (1981), DIETRICH & FIGUEIREDO-RIBEIRO (1985), FIGUEIREDO-RIBEIRO et al. (1986), CARVALHO (1986), ISEJIMA (1989) e VIEIRA (1991).

Vernonia herbacea é uma das 22 espécies herbáceas do gênero, encontrada em regiões de cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú. Apresenta um órgão subterrâneo espessado com estrutura caulinar (observações pessoais), através do qual a planta se reproduz vegetativamente.

Este órgão é bastante ramificado e apresenta crescimento geotrópico positivo. Possui muitas gemas laterais que podem dar origem a novas ramificações subterrâneas ou a ramos aéreos.

Apresenta muita semelhança com um tipo de sistema caulinar subterrâneo descrito por MENEZES et al. (1979) para duas espécies de **Vernonia** (**V. psilophylla** e **V. linearifolia**) encontradas em regiões de campos rupestres da Serra do Cipó (MG). A esse órgão subterrâneo os autores acima deram o nome de rizóforo.

SAJO (1986a,b) estudou a origem e a anatomia de rizóforos de 3 espécies de **Vernonia** dessa mesma região e confirmou a estrutura caulinar desse sistema também para essas espécies.

Em **V. herbacea**, o rizóforo se constitui na mais importante

unidade de reprodução da planta, uma vez que a maior parte dos aquênios de cada capítulo não transporta sementes no seu interior (observações pessoais).

Segundo STEBBINS (1977), rizomas subterrâneos em espécies herbáceas de Asteraceae são órgãos adaptados a climas sazonais com invernos rigorosos. Como mencionado anteriormente a região de cerrado onde **V. herbacea** é encontrada, sofre alterações pluviais que podem levar à deficiência hídrica na época do inverno.

Rizóforos de **Vernonia herbacea** atuam como órgãos de reserva para a planta, armazenando em seus tecidos, grandes quantidades de frutanos (FIGUEIREDO-RIBEIRO et al., 1986). Essa espécie apresenta crescimento estacional, passando por um período de dormência durante o inverno, quando os ramos aéreos desaparecem. A brotação ocorre em agosto/setembro, a partir das inúmeras gemas subterrâneas, sendo seguida pela floração.

1. Presença de frutanos em vegetais superiores

Alterações sucessivas do meio ambiente impõem muitas restrições ao crescimento e desenvolvimento de plantas vasculares (CORNER, 1964). Portanto, é importante que as plantas tenham a capacidade de estocar e translocar parte do carbono fixado na fotossíntese para suprir órgãos heterotróficos durante períodos em que não ocorre fixação de carbono.

Normalmente, essa necessidade é atendida pela síntese de amido como reserva e sacarose para transporte (PREISS & LEVI, 1980; GIAQUINTA, 1980). No entanto, os vegetais superiores empregam diferentes estratégias para explorar ambientes específicos, entre elas, variações nas formas de carbono fixado

para reserva e para translocação na planta. Algumas espécies, por exemplo, armazenam parte do carbono fixado na forma de sacarose e de polímeros de frutose, denominados frutanos, que são compostos relacionados tanto estruturalmente quanto metabolicamente à sacarose (POLLOCK & CHATTERTON, 1988).

1.1. Ocorrência e distribuição

Os frutanos encontram-se entre os carboidratos alternativos de reserva mais amplamente distribuidos no reino vegetal, ocorrendo em monocotiledôneas de clima temperado (Liliflorae e Glumiflorae) e em dicotiledôneas (Asterales, Campanulales e Lamiales) (MEIER & REID, 1982; LEWIS, 1984). São também encontrados em briófitas (MAAS & CRAIGIE, 1964; SULLIEMAN et al., 1979), fungos, bactérias e algas (LEWIS, 1984).

Nos vegetais superiores os frutanos são comumente encontrados em órgãos subterrâneos de reserva como raízes, rizomas, tubérculos e bulbos, não sendo contudo restritos a essas regiões. São encontrados também em menores quantidades, em caules, folhas, inflorescências, frutos e sementes (grãos imaturos) (MEIER & REID, 1982). Em algumas gramíneas as bases dos caules são ricas em frutanos (SMITH, 1973).

A presença de frutanos em vegetais superiores não apresenta correlação com a presença ou ausência de amido. Desta forma, em **Allium** (BELVAL, 1939 in MEIER & REID, 1982), **Agave vera cruz** (SRINIVASAN & BHATIA, 1953), **Iris pseudocorus** (CARLES, 1935 in MEIER & REID, 1982) e **Furcroea gigantea** (BHATIA & SRINIVASAN, 1953) os frutanos são os únicos carboidratos de reserva; em

outras plantas frutanos e amido podem ocorrer juntos num mesmo tecido, como em rizomas de **Iris foetidissima** (COLIN & AUGEN, 1927 in EDELMAN & JEFFORD, 1968), ou ocorrer em partes diferentes da mesma planta, como em **Helianthus tuberosus** e **Dahlia variabilis** (EDELMAN & JEFFORD, 1968) onde as folhas contêm amido e os tubérculos, frutanos.

Devido a limitações de técnicas de análise usadas no passado e à falta de um teste simples e específico para a detecção de frutanos em tecidos, equivalente ao teste de iodo para amido, torna-se difícil afirmar com precisão a distribuição de frutanos em plantas superiores (POLLOCK & CHATTERTON, 1988).

HENDRY (1987) estimou a presença de frutanos em 12% das espécies de vegetais superiores, sendo a maioria membros de 10 famílias pertencentes a 5 ordens: Cyperales, Liliales, Asterales, Campanulales e Lamiales (Tabela 1). Dessas, apenas Liliales não é considerada altamente evoluída (HENDRY, 1987).

TABELA 1. Ocorrência de frutanos em vegetais superiores*

	Principais famílias	Número estimado de espécies	Distribuição/ Clima
Monocot			
Cyperales	Gramineae (subfamília Pooideae)	1200	Temperado
Liliales	Haemodoraceae	6300	Tropical, temperado quente
	Liliaceae		Cosmopolita
	Iridaceae		Quente, temperado
	Agavaceae		Subtropical, árido
Dicot			
Asterales	Compositae	24000	Cosmopolita
Campanulales	Campanulaceae	2500	Temperado
	Stylidaceae		
	Goodeniaceae		
Lamiales	Boraginaceae	2000	Temperado, subtropical

* Adaptado de HENDRY, 1987

A distribuição geográfica das famílias que apresentam espécies portadoras de frutanos é tão diversa que traz dúvidas a respeito de sugestões prévias de que o metabolismo de frutanos ocorre principalmente em plantas de regiões temperadas (De CUGNAC, 1931 in HENDRY, 1987; OJIMA & ISAWA, 1968). Deve-se considerar ainda que mesmo em climas frios a maioria das espécies não acumula frutanos como polissacarídeos de reserva (POLLOCK & CHATTERTON, 1988). HENDRY (1987) sugeriu ser impossível encontrar as vantagens seletivas do metabolismo de frutanos apenas através da análise da distribuição geográfica das espécies.

Das espécies portadoras de frutanos apenas algumas já foram estudadas em detalhe, sendo os estudos centralizados basicamente em Gramineae e Asteraceae, além de alguns membros das Liliaceae e Agavaceae (POLLOCK & CHATTERTON, 1988). No entanto, a ocorrência de frutanos entre famílias altamente evoluídas, indica que a bioquímica de frutanos deve ter aparecido recentemente, possivelmente em resposta a uma ou mais pressões seletivas, não podendo portanto ser considerada como uma via secundária de pequeno significado evolutivo (LEWIS, 1984).

1.2. Estrutura

Os frutanos consistem de séries homólogas de oligo- e polissacarídeos não redutores, onde cada membro da série contém um resíduo a mais de frutose do que o membro anterior (EDELMAN & JEFFORD, 1968). Esses polímeros de D-frutose carregam um resíduo de D-glucose na extremidade da cadeia, unido por uma ligação do tipo α 1,2 como na sacarose (KANDLER & HOPF, 1980); sendo assim, o frutano mais simples é um monofrutosil sacarose, um

trissacarídeo.

Os diversos componentes da série homóloga aparecem, nos tecidos em que são encontrados, em concentrações relativas diferentes, dependendo da época do ano e da espécie estudada (DARBYSHIRE & HENRY, 1978). O peso molecular dos frutanos pode também variar dependendo da espécie estudada ou do tecido analisado, do estado fisiológico da planta e das condições ambientais, embora o tamanho máximo de cadeia que pode ser atingido seja um fator genético (POLLOCK & CHATTERTON, 1988).

Os frutanos mais extensivamente estudados são os encontrados nos tubérculos de **Helianthus tuberosus**. Estes apresentam um tamanho aproximado de 5,5 Kilodaltons (KD) (grau de polimerização GP=35) (EDELMAN & JEFFORD, 1968). Outras espécies acumulam frutanos com tamanho molecular médio de 1 a 2 KD (GP=5-10), como **Avena sativa** ou de 50 KD (GP=260), como **Phleum pratense** (GROTELUESCHEN & SMITH, 1968), enquanto que frutanos de bactérias podem atingir 3 Megadaltons (DEONDER, 1972).

Além das diferenças nos tamanhos das cadeias e na quantidade relativa dos componentes da série homóloga, os frutanos extraídos de fontes diversas também apresentam diferentes estruturas. Desta forma, três isômeros do trissacarídeo mencionado acima já foram isolados (Figura 1), os quais formam a base de 3 séries homólogas com padrões de ligações diferentes.

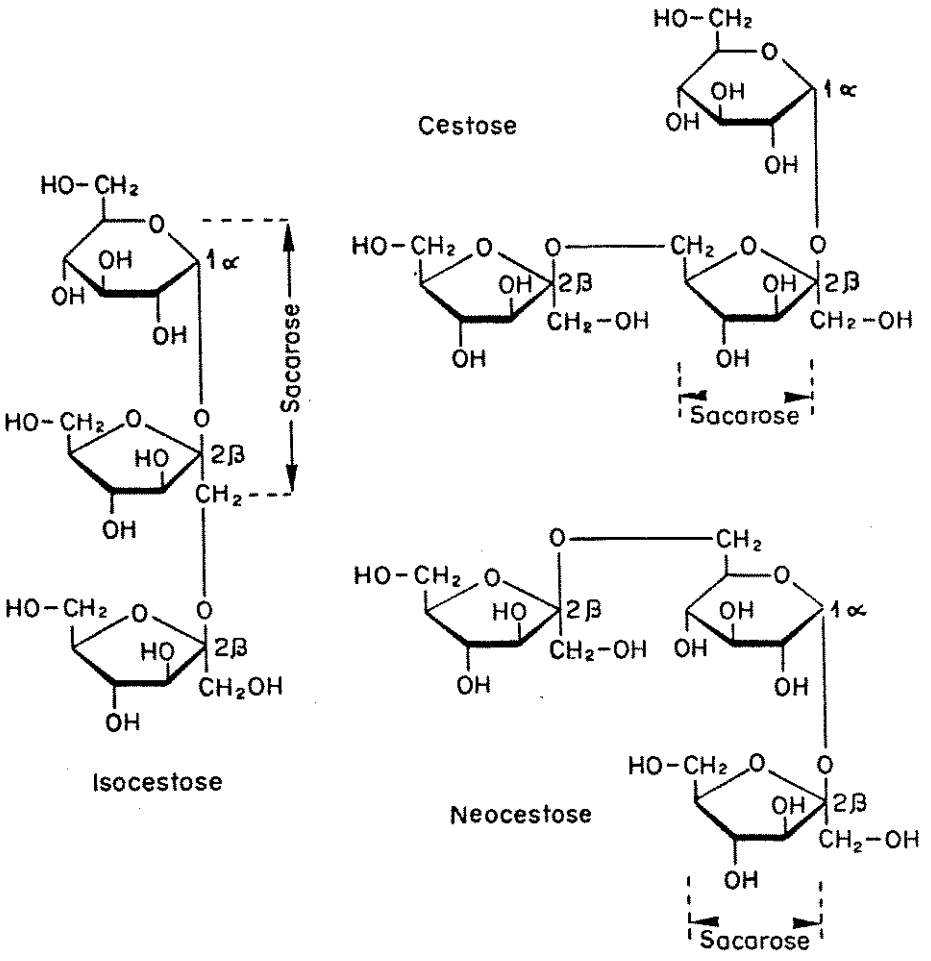


FIGURA 1 - Estruturas de monofrutosil-sacaroses extraídas de vegetais superiores.

A série de frutanos melhor caracterizada em vegetais superiores é aquela encontrada em tubérculos de **Helianthus tuberosus**. Baseia-se no trissacarídeo denominado isocestose, também conhecido por 1-F frutosilsacarose (BACON & BELL, 1953) e consiste de cadeias lineares não redutoras contendo ligações β 2,1 entre os resíduos de frutose (EDELMAN & JEFFORD, 1968), com fórmula geral

G-1,2-F-1,(2- F-1)n, 2-F (n max. ca 35)

onde G = glucose e F = frutose

Frutanos deste tipo são frequentemente chamados de inulina (Figura 2), em referência ao gênero **Inula** do qual foram originalmente extraídos (ROSE, 1804 in MEIER & REID, 1982). Inulinas já foram extraídas de diversas espécies de Asteraceae, Boraginaceae e Iridaceae (KANDLER & HOPF, 1980), e são usadas comercialmente para fins alimentares e medicinais.

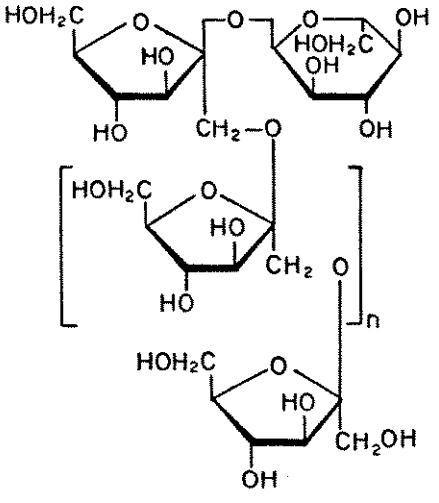


FIGURA 2 - Estrutura geral da inulina

Em outra série homóloga, a da cestose (6-cestose, 6F-frutosilsacarose), os resíduos de frutose apresentam-se unidos através de ligações do tipo β 2,6 (ALBON et al., 1953 in KANDLER & HOPF, 1980), sendo sua fórmula geral

G-1,2-F-6,(2-F-6)n,2-F (n max ca 250)

Frutanos com peso molecular elevado apresentando este tipo de ligação são comumente encontrados em gramíneas, sendo chamados de fleano (Figura 3), por associação com o gênero **Phleum**, do qual

foi inicialmente extraído, ou levano, por analogia com o frutano de bactérias (LAIDLAW & REID, 1951; BELL & PALMER, 1952; TOMASIC et al., 1978; POLLOCK et al.,1979).

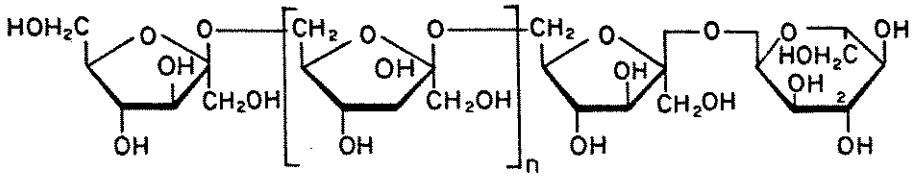


FIGURA 3 - Estrutura geral do fleano

Uma terceira série de frutanos é baseada no trissacarídeo neocestose (6-G frutosilsacarose), que difere dos outros dois isômeros por ter a glucose ligada a 2 frutoses através dos carbonos 1 e 6 (GROSS et al., 1954). O alongamento da cadeia, neste caso, pode se dar pelos 2 resíduos de frutose, resultando numa cadeia linear não redutora, contendo um resíduo de glucose no interior do polímero. A fórmula geral neste caso é a seguinte:

F-2, (1-F-2)m, 1-F-2,6-G-1,2-F-1,(2-F-1)n, 2-F

(m max., n máx. ca 8-10)

Frutanos deste tipo foram purificados a partir de **Asparagus officinalis** (SHIOMI, 1981a).

Além desses três tipos básicos de frutanos, foram encontrados frutanos contendo ligações mistas na mesma cadeia e outros com estruturas ramificadas. Exemplos desses tipos de compostos são alguns frutanos de cadeias curtas encontrados em caules e grãos de cereais (MEDCALF & CHEUNG, 1971) e em **Agave**

vera cruz (ASPINALL & DAS GUPTA, 1959). Frutanos ramificados podem apresentar o esqueleto principal baseado na série da cestose (p.e. trigo) ou da isocestose (cevada) (MEIER & REID, 1982). Misturas de frutanos com diferentes estruturas podem também ocorrer numa mesma espécie. **Asparagus officinalis** (SHIOMI, 1981a) e **Leucojum sp** (HAMMER, 1970) contém oligossacarídeos baseados em isocestose e neocestose. Outras espécies de Liliaceae e Gramineae contêm isocestose, cestose e neocestose (BACON, 1959; DARBYSHIRE & HENRY, 1978).

1.3. Propriedades gerais

Os frutanos são levorrotatórios, amorfos ou microcristalinos, de solubilidade variável em água fria, altamente solúveis em água quente e insolúveis em etanol, quando apresentam cadeias longas. Esses compostos não apresentam caráter redutor, são fracamente hidrolizáveis por invertase microbiana, resistentes à ação da amilase mas suscetíveis à hidrólise ácida (ARCHBOLD, 1940 in PONTIS & del CAMPILLO, 1985). Não reagem colorimetricamente com iodo, mas reagem com vapores de ácido clorídrico, produzindo cor púrpura, o que os distingue dos polissacarídeos que não contêm frutose (COLIN & De CUGNAC, 1926, in PONTIS & del CAMPILLO, 1985).

Uma característica importante dos frutanos é que os análogos estruturais da frutose são compostos de anéis furanosídicos e na série inulínica nenhuma ligação desse anel furanosídico faz parte do esqueleto macromolecular (MARCHESSAULT et al., 1980 in PONTIS, 1990). Os autores ressaltam que essas duas características estruturais conferem grande flexibilidade à cadeia em oposição à

configuração piranosídica da maioria dos carboidratos de reserva, e conferem aos frutanos, alta solubilidade em água.

2. Biossíntese e despolimerização de frutanos

O conhecimento existente sobre a biossíntese e degradação de frutanos origina-se principalmente dos trabalhos de Edelman e colaboradores (DICKERSON & EDELMAN, 1966; EDELMAN & DICKERSON, 1966; EDELMAN & JEFFORD, 1964, 1968; SCOTT, 1968) realizados com polímeros do tipo inulina existentes em tubérculos de **Helianthus tuberosus**. O conhecimento desses mecanismos em frutanos do tipo fleano é mais escasso e estudos visando esses aspectos são bem mais recentes.

Fortes evidências sugerem que os frutanos não são sintetizados a partir de nucleotídeos intermediários, sendo formados a partir da sacarose através da ação conjunta de transferases (EDELMAN & JEFFORD, 1968; SHIOMI et al., 1979b; HENRY & DARBYSHIRE, 1980; MEIER & REID, 1982; POLLOCK, 1986). Sacarose é, na realidade, a precursora de diferentes séries de oligossacarídeos (KANDLER & HOPF, 1984).

2.1. Sacarose:sacarose: frutosiltransferase

A primeira enzima envolvida na síntese de frutanos cataliza a formação de isocestose a partir de duas moléculas de sacarose, liberando uma molécula de glucose que após fosforilação é utilizada na síntese de sacarose. A reação catalizada por esta

enzima é a seguinte:

$$\text{G-1,2-F (sacarose)} + \text{G-1,2-F (sacarose)} \xrightarrow{\text{SST}} \text{G-1,2-F-1,2-F (isocestose)} + \text{G (glucose)}$$

Esta enzima que apresenta alta especificidade pela sacarose é chamada sacarose:sacarose 1-F frutosiltransferase (SST, EC 2.4.1.99) (SCOTT, 1968), tendo sido isolada e caracterizada a partir de diversas fontes vegetais como tubérculos de Helianthus tuberosus (SCOTT et al., 1966), bulbos de Allium cepa (SCOTT, 1968), raízes de Cichorium intybus (GUPTA et al., 1985), folhas de Hordeum vulgare (WAGNER et al., 1983), raízes de Asparagus officinalis (SHIOMI & IZAWA, 1980), etc..

Atividade de SST foi detectada também em espécies com frutanos de estrutura diferente da isocestose (HENRY & DARBYSHIRE, 1980; SHIOMI & IZAWA, 1980). A reação catalizada pela SST é irreversível (EDELMAN & JEFFORD, 1968) uma vez que esta enzima é inativa quando o doador de resíduos de frutose é a isocestose e o aceptor é a glucose. (A reação reversa foi obtida com a enzima de Asparagus officinalis mas apenas em presença de concentrações elevadas de isocestose e glucose (SHIOMI & IZAWA, 1980)).

A K_m da SST é elevada (SHIOMI & IZAWA, 1980) quando comparada com a de enzimas de síntese de polissacarídeos dependentes de nucleotídeos de açúcar (POLLOCK & PREISS, 1980). Isto indica que o fluxo de carbono no sentido da síntese de frutano é relacionado diretamente à concentração de sacarose livre no local de atuação da enzima. A necessidade de um limiar de concentração de sacarose para que a síntese tenha início foi

verificada em **Festuca arundinacea** (LABHART et al., 1983).

2.2. Frutano:frutano frutosiltransferase

O alongamento da cadeia de frutano é efetuado por outra transferase que foi caracterizada e purificada a partir de diversos tecidos de espécies vegetais, entre estes tubérculos de **Helianthus tuberosus**, sendo chamada de frutano:frutano frutosiltransferase (FFT, EC 2.4.1.100) (EDELMAN & DICKERSON, 1966). Esta enzima cataliza a transferência reversível de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora, segundo a reação abaixo:

$$G\text{-}F\text{-}(F)n \; + \; G\text{-}F\text{-}(F)m \overset{FFT}{\rightleftharpoons} G\text{-}F\text{-}\;(F)n\text{-}1 \; + \; G\text{-}F\text{-}(F)m\text{+}1$$, onde

n representa o número de resíduos de frutose extra-sacarose da molécula doadora e pode ser qualquer número de 1 (trissacarídeo) a cerca de 35 e m, o número desses resíduos da molécula receptora que pode ser qualquer número de zero (0) (sacarose) a cerca de 35.

Desta forma, nesta reação, a sacarose atua apenas como receptora de resíduos de frutose enquanto a menor molécula doadora desses resíduos é a isocestose. Esta, por sua vez, juntamente com as moléculas maiores atuam tanto como doadores, quanto como receptores de resíduos de frutose, embora a sacarose e a inulina (frutanos com grau de polimerização > 30) sejam os receptores mais ávidos. Em extratos preparados a partir de tubérculos de **H. tuberosus**, a incubação da FFT com oligossacarídeos de GP uniforme, produziu oligo- e

polissacarídeos com uma distribuição de GP semelhante à encontrada nos frutanos de tubérculos em crescimento (EDELMAN & DICKERSON, 1966).

EDELMAN & JEFFORD (1968), verificaram nessa mesma espécie que a transferência de resíduos de frutose pela FFT ocorre na ausência de síntese líquida de frutano, levando a um equilíbrio dinâmico entre as moléculas de diferentes tamanhos (EDELMAN & JEFFORD, 1968). Segundo esses autores, a síntese líquida de frutanos com GP elevado exige o suprimento contínuo de isocestose (como produto da ação da SST), que é estimulado pela reutilização da sacarose produzida após a transferência de resíduos de frutose da isocestose para receptores com GP mais elevados.

Duas enzimas FFT distintas foram isoladas a partir de raízes de Asparagus officinalis (SHIOMI, 1981b; 1982). A primeira, chamada de 1-F frutosiltransferase é análoga à FFT de H. tuberosus; no entanto, neste caso a neocestose e os polímeros baseados neste trissacarídeo atuam como receptores enquanto isocestose e inulina não. A segunda enzima é a 6-G frutosiltransferase que cataliza a transferência de resíduos terminais unidos por ligações β 1,2, para o grupo OH-6 da glucose de um frutano receptor. Resumindo, esta enzima cataliza a formação de neocestose a partir de isocestose e sacarose, como segue:

$$\underset{\text{isocestose}}{\text{G-1,2-F-1,2-F}} + \underset{\substack{\text{sacarose}\\\text{marcada}}}{\text{G*-1,2-F*}} \overset{\text{FFT}}{\rightleftharpoons} \underset{\text{sacarose}}{\text{G-1,2-F}} + \underset{\substack{\text{neocestose}\\\text{marcada}}}{\text{F-2,6-G*-1,2-F*}}$$

Homólogos maiores da série neocestose podem ser produzidos na presença de oligossacarídeos maiores da série isocestose como

receptores. Neste caso esses últimos atuariam como receptores na reação catalizada pela 1-F-frutosiltransferase, mencionada acima.

2.3. Despolimerização

No processo de despolimerização dos frutanos, além da participação da FFT, através da sua atividade de transferência de resíduos de frutose, a hidrólise de frutanos se dá pela remoção sequencial de resíduos terminais de frutose através de reação catalisada por uma β-frutofuranosidase (frutanoexohidrolase-FEH). EDELMAN & JEFFORD (1964) e RUTHERFORD & DEACON (1972), isolaram de tubérculos de H. tuberosus e de raízes de Taraxacum officinale, respectivamente, duas formas dessa enzima, que apresentam diferentes mobilidades em colunas de DEAE-celulose. A reação que catalizam é a seguinte:

$$G\text{-}F\text{-}(F)n + H_2O \xrightarrow{FEH} G\text{-}F\text{-}(F)n\text{-}1 + F$$

Através dessa reação o polímero é convertido de maneira irreversível a uma mistura de frutose e sacarose, uma vez que esta enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose. Como os açúcares na planta são translocados sob a forma de sacarose, parte da frutose liberada através desta reação deve ser convertida a glucose, possibilitando a formação de sacarose que então sairá da célula. As duas hidrolases são fortemente inibidas pela sacarose (EDELMAN & JEFFORD, 1964).

Atividade hidrolítica sobre frutanos foi detectada em uma série de tecidos de diversas espécies de plantas superiores (POLLOCK, 1986 e referências alí contidas).

2.4. Localização celular das enzimas do metabolismo de frutanos

Desde os primeiros estudos sobre a ocorrência de frutanos em diferentes tecidos de plantas superiores (MOLISCH, 1921; SACHS, 1964 in MEIER & REID, 1982) houve a indicação de que o vacúolo seria o local de acúmulo de frutanos. Esta possibilidade foi reforçada pelo fato de se encontrarem quantidades bastante elevadas de frutanos em determinados órgãos (70% do peso seco ou mais) (EDELMAN & JEFFORD, 1968; DARBYSHIRE & HENRY, 1978) e pela falta de outro compartimento celular que comportasse tão grandes quantidades de compostos.

EDELMAN & JEFFORD (1968), sugeriram um modelo hipotético de compartimentação do metabolismo da inulina dentro das células. Segundo este modelo, a FFT estaria localizada no vacúolo ou no tonoplasto, sendo o vacúolo o local de síntese e decomposição dos frutanos, enquanto a SST agiria no citoplasma. Este modelo tem servido de base para todos os trabalhos posteriores. Mais recentemente, no entanto, os trabalhos realizados com células isoladas e fragmentadas de folhas de **Hordeum vulgare** (WAGNER et al., 1983; WAGNER & WIEMKEN, 1986) e de tubérculos de **H. tuberosus** (FREHNER et al., 1984), mostraram que as enzimas relacionadas com a síntese e a degradação dos frutanos, bem como todo frutano existente e grande parte da sacarose (porém não toda) estão localizados dentro do tonoplasto. O pH ótimo de atividade dessas enzimas oscila, em geral, entre 5 e 6 (WAGNER & WIEMKEN, 1989), o que reforça a hipótese de sua localização subcelular. Essas observações levam à conclusão que os principais

eventos relacionados com o metabolismo de frutanos ocorrem internamente à parede do vacúolo ou no próprio tonoplasto e não no citoplasma e vacúolo, como proposto por EDELMAN & JEFFORD (1968).

3. Variações no conteúdo de frutanos

Espécies acumuladoras de frutanos diferem entre si quanto ao tipo e órgão de estocagem. Desta forma pode-se distinguir a estocagem duradoura destes compostos, que ocorre geralmente em órgãos subterrâneos de reserva (EDELMAN & JEFFORD, 1968; MEIER & REID, 1982) ou em caules e sementes de gramíneas durante períodos de desenvolvimento reprodutivo (ARCHBOLD, 1940 in PONTIS & del CAMPILLO, 1985), da estocagem temporária, que geralmente ocorre em folhas.

Os frutanos presentes tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas apresentam variações no seu conteúdo durante o desenvolvimento das plantas. Essas alterações são simultaneamente associadas com modificações de temperatura ou mesmo com as variações sazonais de temperatura (RUTHERFORD & WESTON, 1968; PONTIS & del CAMPILLO, 1985).

As variações nos níveis de frutanos que serão mencionadas a seguir referem-se principalmente à estocagem de longa duração.

3.1. Dicotiledôneas

Dentre as dicotiledôneas a espécie mais extensivamente estudada com relação ao acúmulo e metabolismo de frutanos é **H. tuberosus**, motivo pelo qual será utilizada como modelo para a descrição que segue.

Tubérculos de **H. tuberosus** apresentam um período de vida de um ano e constituem os órgãos de reprodução vegetativa nesta espécie. Após a sua iniciação, na planta, há um período de crescimento rápido no final do verão com um aumento significativo no conteúdo de frutanos (EDELMAN & POPOV, 1962; DICKERSON & EDELMAN, 1966).

As variações sazonais apresentadas pelos frutanos nestes órgãos foram inicialmente estudadas por BACON & LOXLEY (1952). Estes autores fizeram medidas da rotação óptica de extratos aquosos, mostrando que extratos de final de verão e outono apresentavam a rotação óptica mais negativa, indicando a presença de grandes quantidades de polímeros com GP elevado. Extratos feitos no inverno e na primavera apresentaram rotação óptica positiva, indicando, por sua vez, a presença predominante de oligossacarídeos. Quando esses tubérculos foram mantidos a 5 °C ocorreu diminuição do tamanho médio das cadeias de frutanos sem haver contudo diminuição no conteúdo total de carboidratos (JEFFORD & EDELMAN, 1963). Isto é o que ocorre naturalmente no inverno, durante a dormência, quando as hidrolases liberam resíduos de frutose que, em parte se transformam em glucose para haver produção de sacarose. A sacarose atuará desta forma como receptor de novos resíduos de frutose.

Durante os períodos de desenvolvimento do tubérculo e armazenamento de frutanos, no final do verão e outono, as enzimas SST e FFT apresentam atividade elevada mas quando o tubérculo atinge a maturidade, a atividade da SST diminui e a das hidrolases aumenta, não ocorrendo mais síntese líquida de frutano. FFT apresenta atividade praticamente durante o ano todo.

Durante a brotação do tubérculo, na primavera, os produtos de hidrólise são utilizados no crescimento da planta causando uma diminuição no conteúdo total de carboidrato (EDELMAN & JEFFORD, 1968). Portanto, sacarose é formada tanto no inverno como na primavera, mas no primeiro caso ela é utilizada como receptora do grupo frutosil e no segundo ela é exportada para os ramos aéreos em crescimento, como mostrado na figura 4 (FREHNER et al., 1984).

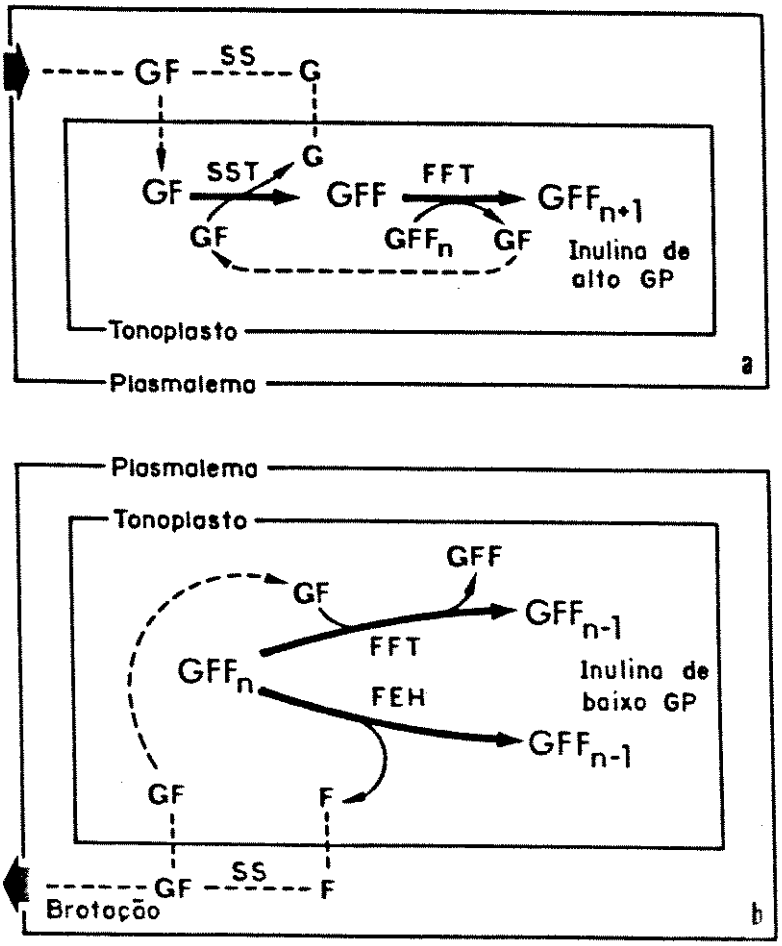


FIGURA 4 - Modelo proposto da compartimentação do metabolismo de frutanos em tubérculos de **Helianthus tuberosus** em desenvolvimento (a) e nos estádios de dormência e brotação (b). Adaptado de Frehner et al., 1984.

3.2. Monocotiledôneas (Gramineae)

O padrão de distribuição dos frutanos em gramíneas mostra uma variação sazonal pronunciada. Espécies forrageiras de clima temperado apresentam 2 picos de acúmulo - durante a floração, na primavera e início de verão e durante o crescimento vegetativo, no outono e inverno (POLLOCK & JONES, 1979).

Em 1967, SMITH mostrou que nas bases dos caules de **Phleum pratense** e **Bromus inermis** o conteúdo de frutanos diminui na primavera (entre abril e maio), aumentando novamente no verão. Em **Bromus**, o GP médio é baixo, permanecendo constante durante o crescimento enquanto em **Phleum** o GP médio é alto no início da estação de crescimento e diminui durante períodos de crescimento ativo, vindo a aumentar novamente no verão.

Já em **Festuca pratensis** e **Dactylis glomerata**, WAITE & BOYD (1953) verificaram dois picos de acumulação de frutanos: o primeiro no final da primavera (maio) durante a transição entre desenvolvimento vegetativo e reprodutivo e o segundo no verão (julho/agosto), coincidindo com o desenvolvimento das sementes. O acúmulo maior ocorre nos internós do caule alongado e principalmente nos internós basais. Em seguida, a porcentagem de frutanos decresce a medida em que há translocação de carboidratos para o armazenamento de amido nos grãos em desenvolvimento e em espécies perenes parte dos frutanos é utilizada para suportar o crescimento inicial dos perfilhos.

São poucas as informações a respeito do armazenamento de frutanos em sementes. A maior parte dos trabalhos dizem respeito a espécies de gramíneas, onde apenas 1% a 2% do peso seco dos

grãos corresponde a frutanos (Mac LEOD & McCORQUADALE, 1958). No entanto, durante o desenvolvimento inicial dos grãos o conteúdo de frutanos é bem maior (ESCALADA & MOSS, 1976).

HOUSLEY et al (1985) mostraram que as atividades da SST e FFT em grãos de **Triticum aestivum** em desenvolvimento são mais elevadas imediatamente após a ântese e que o tamanho das cadeias de frutanos cai progressivamente nas semanas seguintes. Isto sugere que no início do desenvolvimento do grão o metabolismo de frutanos é ativo, coincidindo com o período em que as características de região de utilização no grão estão sendo implantadas. THORNE & GIAQUINTA (1984) propõem que a rápida síntese de frutanos durante este período é necessária para estabelecer uma diminuição na concentração de sacarose que permita o esvaziamento do floema nos tecidos destino. No momento em que o endosperma se torna capaz de sintetizar amido o fluxo de carbono se direciona para a síntese deste composto que então atinge quantidades que superam a de frutano.

4. Importância do metabolismo de frutanos

De acordo com POLLOCK (1986), o papel dos frutanos como carboidratos de reserva é indiscutível. No entanto a ocorrência restrita de plantas que acumulam estes compostos e a predominância de amido em vegetais superiores sugere que outros fatores devam contribuir para a biossíntese de frutanos, sob determinadas condições.

Não é fácil identificar características do metabolismo de frutanos que confiram vantagens evolutivas exclusivas, uma vez que plantas acumuladoras e plantas não acumuladoras destes

compostos compartilham o mesmo nicho ecológico (POLLOCK & CHATTERTON, 1988). Da mesma forma, espécies que contêm frutanos são bem variadas taxonomicamente, ocupando habitats também variados (HENDRY, 1967).

Algumas propostas sobre a vantagem do metabolismo de frutanos, baseadas na correlação entre as características fisiológicas e bioquímicas desses compostos, distribuição geográfica e capacidade de resistência das espécies são apresentadas a seguir.

4.1. Proteção contra o frio e a seca

O acúmulo de carboidratos solúveis afeta o equilíbrio osmótico das células. Segundo LEVITT (1980), este acúmulo geralmente ocorre em consequência do resfriamento e frequentemente ao mesmo tempo em que os tecidos vegetais se tornam mais tolerantes ao congelamento.

Estudos realizados por EAGLES (1967) com dois ecótipos de **Dactylis glomerata** apontaram para a relação entre conteúdo de frutano e temperatura, mostrando que nas populações de regiões mais frias o acúmulo de frutano é maior do que nas populações do Mediterrâneo e que esta característica está associada à maior resistência ao frio apresentada pelas populações do norte.

De fato, muitas das espécies que armazenam frutanos atravessam períodos de frio ou seca intensos durante uma fase do seu ciclo de vida quando então a atividade osmótica dos frutanos pode aumentar a resistência da planta ao congelamento ou dessecação (EAGLES, 1967). Isto deve ocorrer devido às

características do metabolismo de frutanos que permitem alterações rápidas no tamanho e número de cadeias destes compostos e, consequentemente, mudanças rápidas no potencial osmótico (EDELMAN & JEFFORD, 1968).

SCHNYDER & NELSON (1987), trabalhando com células em crescimento de **Festuca arundinacea**, mostraram que frutanos com baixo GP podem contribuir para o aumento do potencial osmótico tanto quanto hexoses e sacarose combinadas.

Considerando que os frutanos ocorrem apenas nos vacúolos, qualquer função proposta para esses compostos deve levar em conta suas características de soluto que contribuem para uma diminuição no ponto de congelamento ou redução da taxa de desidratação (LEVITT, 1980).

HENDRY (1987) mostrou que a diminuição no ponto de congelamento devido à presença de frutanos está na faixa de 0,2 - 0,5 °C, sendo as medidas do conteúdo de frutanos realizadas no inverno no caule recém-brotado e não no órgão subterrâneo de reserva. No entanto, apenas uma das espécies analisadas, **Allium vineale**, que acumula quantidades de frutanos excepcionalmente elevadas no vacúolo de células do caule no início do inverno, apresentou diminuição superior a 1% no ponto de congelamento.

Ao mesmo tempo, Pollock e colaboradores (in POLLOCK & CHATTERTON, 1988) verificaram que a tolerância ao frio aumentou (de -6,6 a -13,4 °C) em **Lolium perenne** quando plantas foram mantidas, anteriormente, por 2 semanas a 2 °C. Isto ocorreu simultaneamente a um aumento no conteúdo de carboidratos solúveis, equivalente a uma diminuição de 0,5 °C no ponto de congelamento do suco vacuolar, segundo cálculos baseados em

HENDRY (1987). Os autores concluíram que mesmo que todo o frutano fosse hidrolizado a monossacarídeos a diminuição no ponto de congelamento ainda seria insuficiente para causar o aumento à tolerância ao frio verificado nessas plantas.

Desta forma, embora existam fortes evidências de que os frutanos desempenham papel osmorregulador nas plantas em que são armazenados, este papel ainda não está completamente esclarecido, uma vez que espécies que não armazenam frutanos em seus tecidos também sobrevivem e toleram fatores climáticos adversos como baixas temperaturas e suprimento hídrico reduzido.

4.2. Frutanos e Amido

Para explicar porque os frutanos mais do que o amido podem conferir às plantas maior resistência a condições ambientais adversas deve-se comparar as propriedades desses dois tipos de polímeros.

Como já mencionado anteriormente os frutanos são compostos solúveis, cujo metabolismo permite ajustes rápidos no tamanho e número de cadeias, causando alterações no potencial osmótico da célula (EDELMAN & JEFFORD, 1968).

O amido, por outro lado, encontra-se na forma insolúvel na célula, sendo armazenado em organelas celulares especializadas, o que dificulta sua acessibilidade.

Além disso, segundo POLLOCK (1986) o acúmulo de amido em folhas de diversas plantas resistentes ao frio é muito mais sensível a temperaturas baixas do que o acúmulo de sacarose e frutano. Este autor, trabalhando com folhas de **Lolium temulentum**,

verificou que nesse sistema as enzimas envolvidas na síntese de amido nos cloroplastos são mais sensíveis a baixas temperaturas do que as enzimas de síntese de sacarose e frutanos.

Outra possível vantagem que o acúmulo de frutanos traz às plantas em relação ao amido se deve ao fato dos primeiros serem armazenados nos vacúolos celulares em quantidades bastante elevadas.

5. Importância econômica

Embora a sacarose seja o adoçante natural mais comum no uso doméstico e industrial, sua utilização ampla e irrestrita causa uma inquietação por parte de profissionais da área da saúde (KOSARIC et al., 1984).

Desta forma, a procura de adoçantes alternativos vem recebendo cada vez mais atenção, sendo a frutose um dos adoçantes naturais mais indicados atualmente. Em comparação com a sacarose, a frutose é menos cariogênica, 1,3 vezes mais doce, possui maior solubilidade em água e baixa viscosidade. Além disso, níveis baixos de frutosee podem ser metabolizados sem a necessidade de insulina, o que a torna um adoçante alternativo em dietas para diabéticos (KOSARIC et al., 1984).

Atualmente os xaropes contendo frutose que são utilizados na indústria são produzidos principalmente a partir de amido de milho hidrolizado e isomerizado enzimaticamente, resultando numa mistura rica em frutose. A aplicação de frutanos para obtenção de xaropes ricos em frutose pode trazer vantagens em relação ao uso de amido, uma vez que alguns passos do processo de preparação do xarope seriam eliminados (FLEMING & GROOTWASSINK, 1979; KOSARIC

et al., 1984).

Mais recentemente, PONTIS (1990) salientou que o cultivo de H. tuberosus tem suscitado bastante interesse, pois devido ao seu elevado teor de inulina, pode ser utilizado na produção de frutose, xaropes, etanol, além de outros solventes orgânicos.

II. OBJETIVOS

Em vista do pouco conhecimento existente sobre a bioquímica dos compostos de reserva em órgãos subterrâneos de plantas de clima tropical e da importância que os frutanos desempenham como compostos de reserva em vegetais superiores, os objetivos do presente trabalho foram os seguintes:

- Analisar as variações no conteúdo e no grau de polimerização das cadeias de frutanos presentes nos rizóforos de plantas de **Vernonia herbacea** coletadas no cerrado em diferentes épocas do ano e, portanto, em diferentes estádios fenológicos.

- Determinar a época do ano mais favorável à propagação vegetativa desta espécie, relacionando-a com o conteúdo de frutanos no órgão subterrâneo de propagação.

- Analisar as variações no conteúdo e na composição dos frutanos em rizóforos, durante a formação e o desenvolvimento de novas plantas de **V. herbacea**, correlacionando-as com o crescimento da parte aérea.

- Comparar as variações encontradas no conteúdo e na composição desses compostos em plantas crescendo naturalmente no cerrado com aquelas observadas em plantas cultivadas, obtidas através de propagação vegetativa.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1. Material Vegetal

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados órgãos subterrâneos obtidos de plantas adultas de **Vernonia herbacea** (Vell.) Rusby (SP 169567) (Figura 5) coletadas periodicamente no cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçú (22° 18' S e 47° 11' W), SP.

As coletas para o estudo da variação sazonal dos frutanos foram feitas em seis épocas diferentes, obtendo-se dessa forma, plantas em diferentes fases de desenvolvimento, correspondentes a cinco estádios fenológicos: brotação (B) (setembro/1986), floração (F) (novembro/1986), vegetativo (V) (março/1987), início de dormência (ID) (maio/1987), dormência (D) (julho/1987) e novamente brotação (B) (setembro/1987), para fechamento do ciclo.

Para a análise dos compostos de reserva durante a brotação e o crescimento, cerca de 400 plantas foram obtidas a partir de fragmentos de órgãos subterrâneos retirados de 15 plantas adultas em início de dormência (maio/1987), coletadas na mesma região de cerrado.

1.2. Substâncias Químicas

Os reagentes e solventes empregados neste trabalho foram de pureza analítica (P.A.). Os padrões utilizados foram de procedência da Merck (Alemanha) ou Sigma Chemical Co. (E.U.A.).

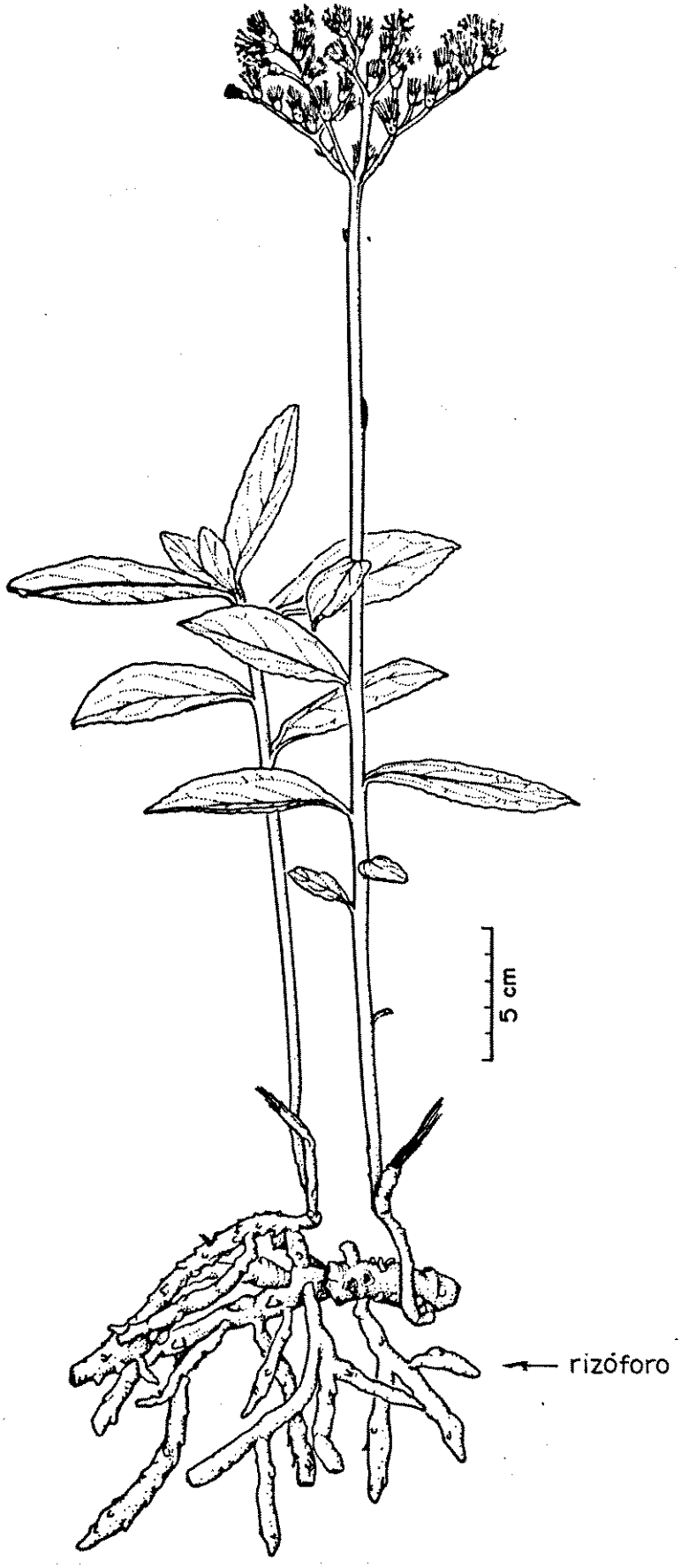


FIGURA 5 - **Vernonia herbacea** (Vell.) Rusby, em floração.

1.3. Equipamentos

Foram utilizados os seguintes aparelhos: Homogeneizador do tipo liquidificador, da Waring, E.U.A.; homogeneizador Vir-Tis - S "45", da Vir-Tis Research Equipment Co., E.U.A.; centrífuga refrigerada mod. PR - 2, da International Equipment Co., E.U.A.; centrífuga refrigerada RC - 5 Sorwall, da Du Pont Instruments, E.U.A.; espectrofotômetro Mod. 35, da Perkin - Elmer Coleman Instruments, E.U.A.; balança analítica tipo H - 15, da Mettler, Suiça; balança de precisão da Sartorius-Werbe, GM BH, Alemanha; evaporador rotatório da Buchler Instruments Co., E.U.A.; estufa com temperatura regulável mod. Stabil Therm, da Blue M. Electric Co., E.U.A.; banho-maria com temperatura regulável, da Ética Equipamento Científicos Ltda., Brasil; máquina de gelo Scotsman, da King - Seeley KST Thermos Co., E.U.A.; agitador de tubos super mixer, da Lab-line Instruments, Inc., E.U.A.; coletor de frações L K B 7000 A UltroRac, da LKB - Produkter Ab, Suécia.

2. Métodos

2.1. Obtenção e plantio de fragmentos de rizóforos

Para o estudo da propagação vegetativa em diferentes estádios fenológicos, fragmentos de rizóforos, medindo aproximadamente 3cm de comprimento, foram retirados de plantas coletadas no cerrado em diferentes épocas do ano, coincidindo com diferentes estádios fenológicos já descritos no ítem 1.1.. Para cada época obtiveram-se quatro amostras com 40 fragmentos cada, as quais foram retiradas de quatro plantas separadamente. Os fragmentos foram plantados horizontalmente em caixas de madeira

contendo terra de canteiro, regados periodicamente e mantidos em casa de vegetação. As observações quanto à porcentagem de brotação foram tomadas a cada quinze dias a partir do plantio.

Para o estudo dos frutanos durante a brotação e o crescimento, quinze plantas foram coletadas no cerrado de Moji-Guaçú em início de dormência (maio/1987) e trazidas para o laboratório, sendo seus órgãos subterrâneos lavados e fragmentados em segmentos de aproximadamente 3cm de comprimento. Esses fragmentos, denominados rizóforos iniciais foram plantados em caixas de madeira contendo terra como descrito acima. Após a brotação, as plantas foram transferidas para sacos plásticos individuais e mantidas próximas aos canteiros, sob condições ambientais naturais, durante todo o período experimental (26 meses).

2.2. Obtenção de amostras

Para o estudo da variação sazonal dos carboidratos foram coletadas 4 plantas em cada época (item 1.1.), retirando-se de cada uma delas uma amostra de 20g de peso fresco dos rizóforos para extração dos frutanos.

Para o estudo dos compostos de reserva durante a brotação e o crescimento de novas plantas, amostras de 20 plantas foram coletadas periodicamente desde o plantio, a cada 45 dias nos três primeiros meses e em seguida a cada três meses, aproximadamente, durante 26 meses consecutivos. As variáveis de crescimento foram registradas para as 20 plantas, representando cada uma delas uma repetição. As amostras dos rizóforos para extração de frutanos

foram retiradas dos rizóforos iniciais e de suas ramificações separadamente a partir do "pool" formado pelos órgãos subterrâneos das 20 plantas constituintes de cada amostra.

Os tamanhos das amostras utilizadas para as análises bioquímicas variaram de 4 a 20 g de peso fresco, em função da menor disponibilidade de material nas fases iniciais de desenvolvimento. No entanto manteve-se constante a relação entre o peso fresco do tecido e o volume do solvente de extração.

Todos os extratos foram feitos com quatro repetições.

2.3. Análise do crescimento

A análise quantitativa de crescimento foi feita utilizando-se amostras de 20 plantas como mencionado no item anterior. Os parâmetros de crescimento utilizados para a parte áerea foram altura do maior ramo de cada planta, pesos fresco e seco, número total de folhas e área foliar total por planta e, para a parte subterrânea, pesos fresco e seco do fragmento inicial de rizóforo e das ramificações subterrâneas originadas desse rizóforo, a partir do sexto mês do experimento.

Foram calculadas a taxa de assimilação líquida (TAL),que relaciona a taxa de crescimento relativo com a área foliar e a razão de área foliar (RAF), que reflete a dimensão do sistema assimilador envolvido na produção de matéria seca, em relação ao peso seco da planta. A taxa de assimilação líquida foi calculada segundo fórmula proposta por WILLIAMS (1946):

$$TAL = \frac{\ln A2 - \ln A1}{A2 - A1} \times \frac{P2 - P1}{t2 - t1} \; g.cm^{-2}.dia^{-1}, \text{onde}$$

P2 = peso seco atual, P1 = peso seco inicial, A2 = área foliar

atual, A1 = área foliar inicial, t2 - t1 = intervalo de tempo entre duas coletas. A razão de área foliar foi obtida pela relação entre a área foliar (A) e o peso seco total (P) da planta:

$$RAF = A \cdot P^{-1}\ cm^{-2}\ .g^{-1}$$

2.3.1. Estimativa da área foliar

A estimativa da área foliar foi feita pelo cálculo da curva de regressão linear obtida da seguinte maneira: uma amostra de folhas de diversos tamanhos foi coletada, prensada e seca. Em seguida, de cada folha, tomaram-se as medidas de comprimento e largura e retiraram-se discos de área conhecida (1,13 cm^2). Com os pesos das folhas secas e dos respectivos discos, obteve-se a área foliar de cada folha por correlação direta. A curva da regressão linear (Figura 6) foi obtida entre as medidas de comprimento multiplicadas pelas respectivas larguras, e a área determinada de cada uma das folhas da amostra (MAGALHÃES, 1979). O coeficiente de correlação (r) obtido permitiu utilizar a equação da regressão linear para estimar a área foliar ao longo do experimento. A área foliar total de cada planta foi obtida pela soma das áreas de suas folhas.

2.3.2. Determinação dos pesos da matéria fresca e seca

O peso fresco foi determinado logo após a separação da parte aérea da parte subterrânea. O peso seco da parte aérea foi determinado após secagem em estufa à temperatura de 80 °C, e pesagem em balança analítica até peso constante. Para a determinação do peso seco dos rizóforos, as condições de secagem

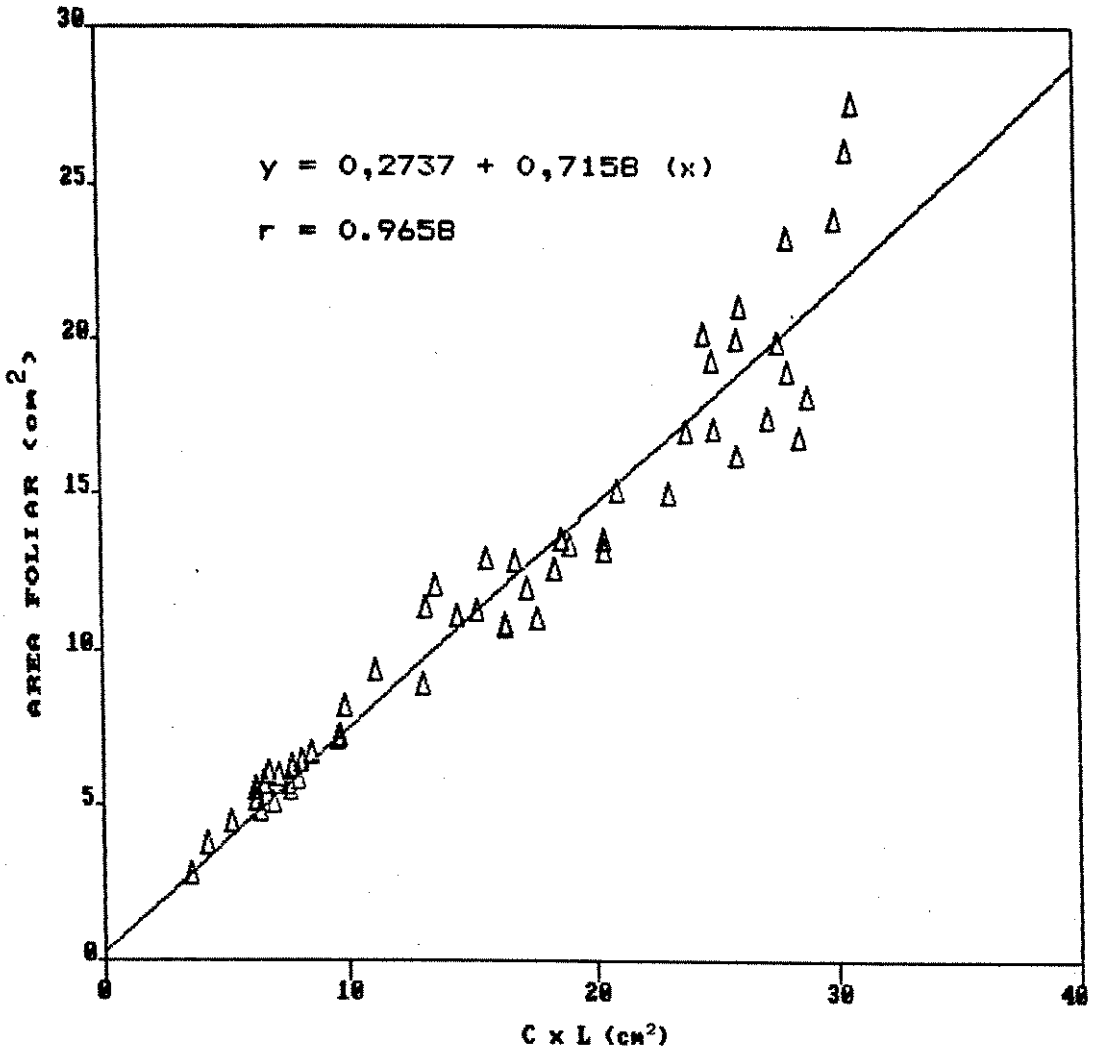


FIGURA 6 - Correlação entre área foliar e medidas de comprimento x largura (C x L) de folhas de Vernonia herbacea. Indicados a equação da regressão linear e o coeficiente de correlação (r).

e pesagem foram as mesmas, utilizando-se, no entanto, quatro amostras de 3g de tecido fresco dos rizóforos iniciais e de suas ramificações separadamente, ao invés de toda a porção subterrânea, extrapolando-se o valor para o peso total do rizóforo de cada planta. O teor de água presente nas amostras foi calculado pela diferença entre o peso da matéria fresca e o peso da matéria seca e transformado em porcentagem (%) do peso fresco.

2.4. Análise dos carboidratos

2.4.1. Extração de oligofrutanos

Os oligofrutanos, frutanos com GP aproximadamente menor do que 16, foram extraídos segundo o fluxograma apresentado na figura 7. Monossacarídeos do tipo frutose e glucose, bem como sacarose, presentes em concentrações consideráveis nos tecidos analisados também são extraídos nessas condições. Amostras de material fresco de rizóforos foram fragmentadas e imediatamente submersas em etanol 80% (v/v) em ebulição por 3 minutos para inativação das enzimas, e homogeneizadas em liquidificador por 1,5 minutos. Em seguida foram colocadas em banho-maria a 80°C por 15 minutos, com agitação ocasional, e centrifugadas a 1.000g por 15 minutos à temperatura ambiente. Os resíduos foram reextraídos em etanol 80% (v/v), em banho-maria a 80° C por 5 minutos e novamente centrifugados nas condições já mencionadas. Os sobrenadantes das duas extrações foram juntados, constituindo a fração etanólica de oligofrutanos e os resíduos utilizados para a extração de polissacarídeos descrita a seguir.

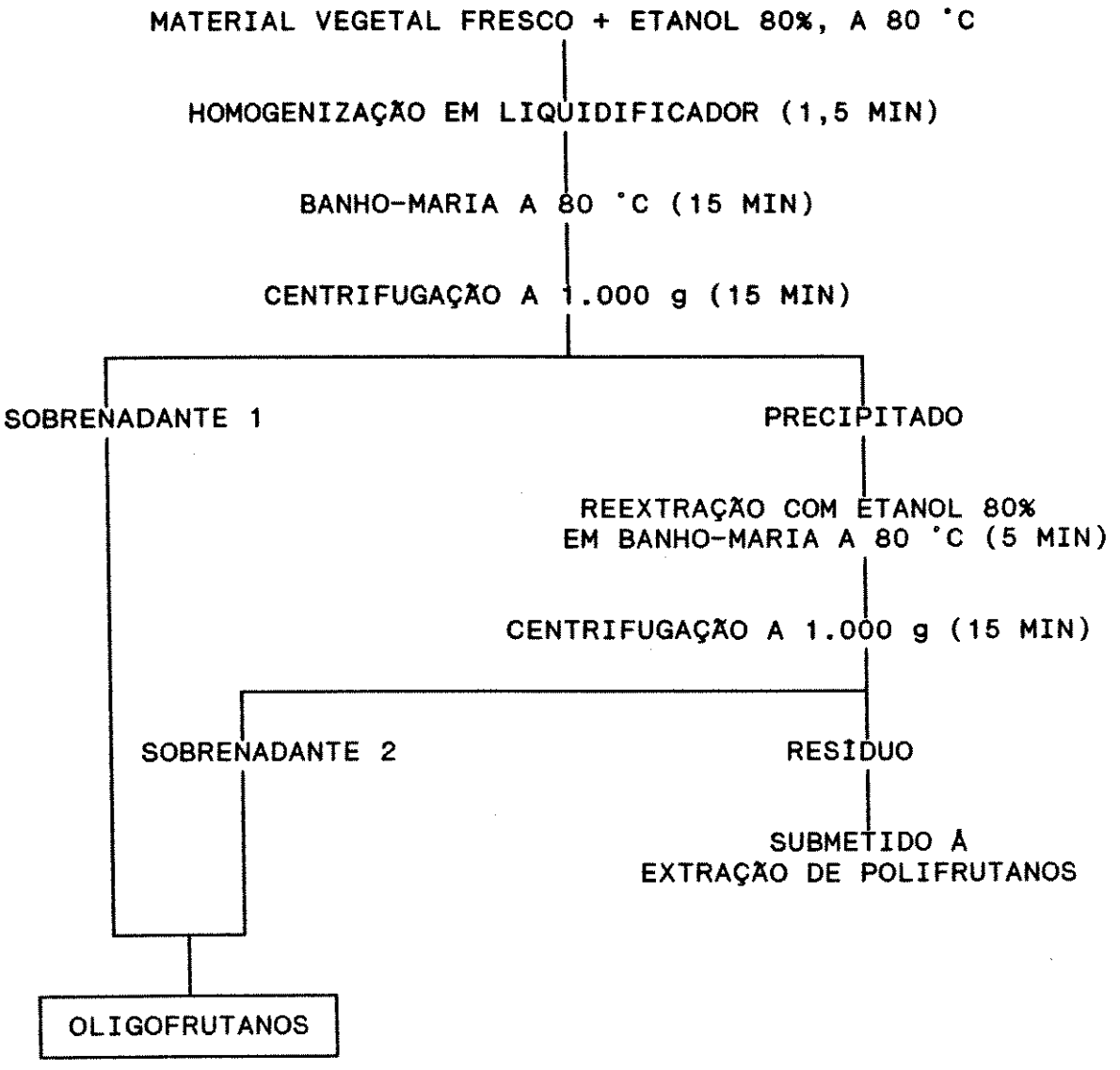


FIGURA 7 - Fluxograma da extração de oligofrutanos

2.4.2. Extração de polifrutanos

Os frutanos com GP aproximadamente maior do que 16, aqui denominados polifrutanos, foram extraídos segundo o método utilizado por HONEYMAN (1962), específico para inulina (Fig. 8), cujo procedimento é descrito a seguir: ao resíduo da extração etanólica, adicionou-se água (10ml por grama de material fresco

original), ajustou-se o pH da mistura para 8,0 com $Ca(OH)_2$, mantendo-se em banho-maria a 70-80 °C por 1 hora. Após este período o material foi filtrado a vácuo em tecido de algodão. O resíduo da filtragem foi submetido à reextração em água como descrito acima, sendo os dois filtrados juntados e o pH ajustado para 7,0. Os extratos assim obtidos foram submetidos à clarificação com carvão ativado na concentração de 1,5% (w/v), em banho-maria a 70°C. Após 10 minutos a mistura foi filtrada a vácuo em papel de filtro analítico. Uma alíquota de cada extrato foi separada para fins de análise quantitativa dos açúcares. Em seguida, os extratos clarificados foram concentrados em evaporador rotatório e congelados para facilitar a cristalização do polissacarídeo. Após cristalizado, o polissacarídeo foi lavado por centrifugação 2 vezes com etanol e 2 vezes com acetona, sendo finalmente seco em dessecador, sob pressão reduzida, para posterior análise.

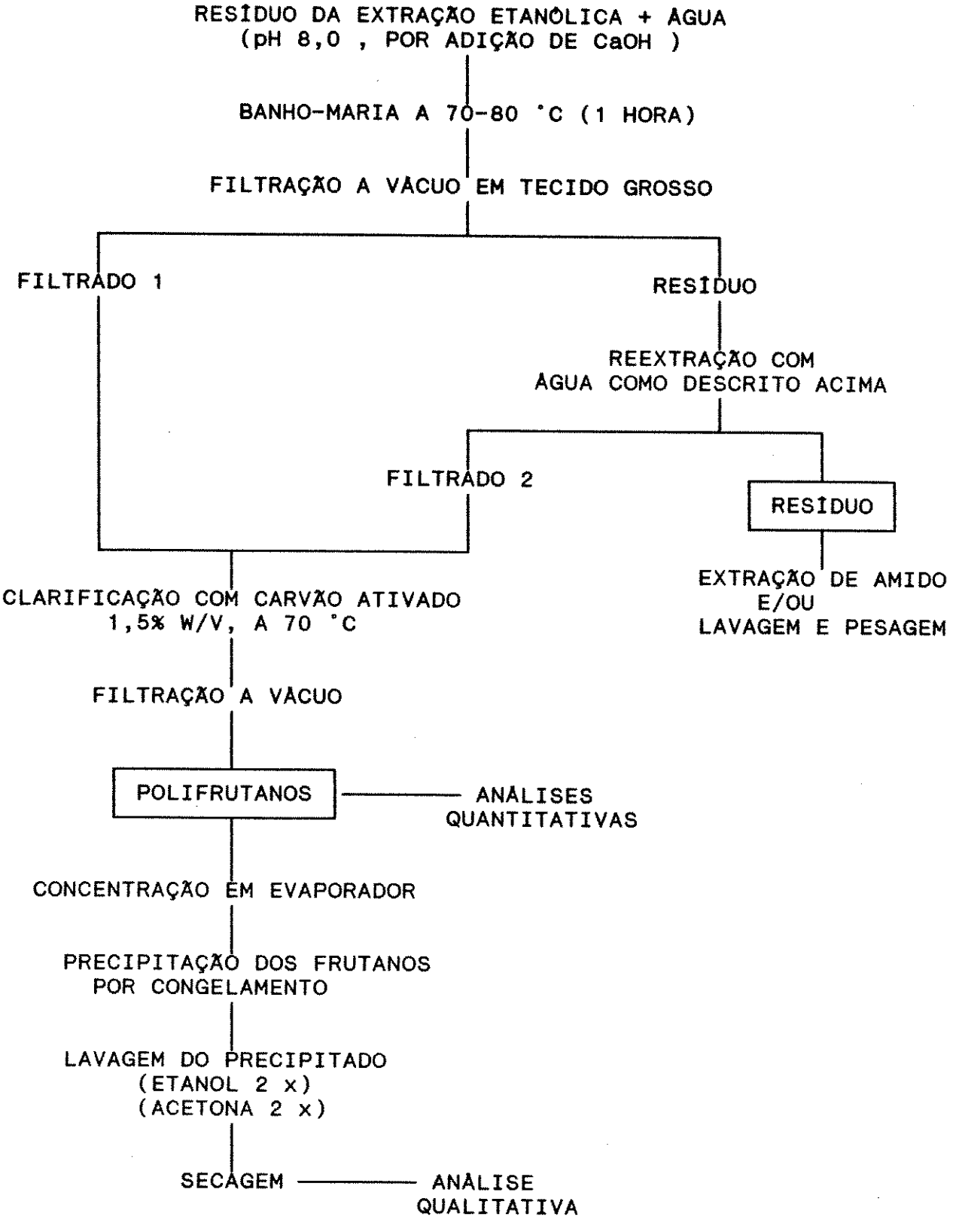


FIGURA 8 - Fluxograma da extração de polifrutanos

2.4.3. Extração de amido

As extrações de amido foram feitas para o estudo da variação dos carboidratos nos diferentes estádios fenológicos. Os resíduos da extração aquosa de frutanos foram submetidos à extração em ácido perclórico 52% segundo McCREADY et al. (1950), a frio, com agitação por 15 minutos (Fig. 9). A mistura foi centrifugada por 15 minutos a 1.500g, a 5°C sendo o precipitado reextraído nas mesmas condições já descritas. Os sobrenadantes de ambas extrações foram juntados, constituindo a fração amido.

2.4.4. Resíduo

Os resíduos obtidos após a última extração foram lavados por filtração a vácuo em funil de Buchner com água destilada (1x), etanol 95% (2x) e acetona (1x), sendo em seguida transferidos para dessecador e pesados após secagem.

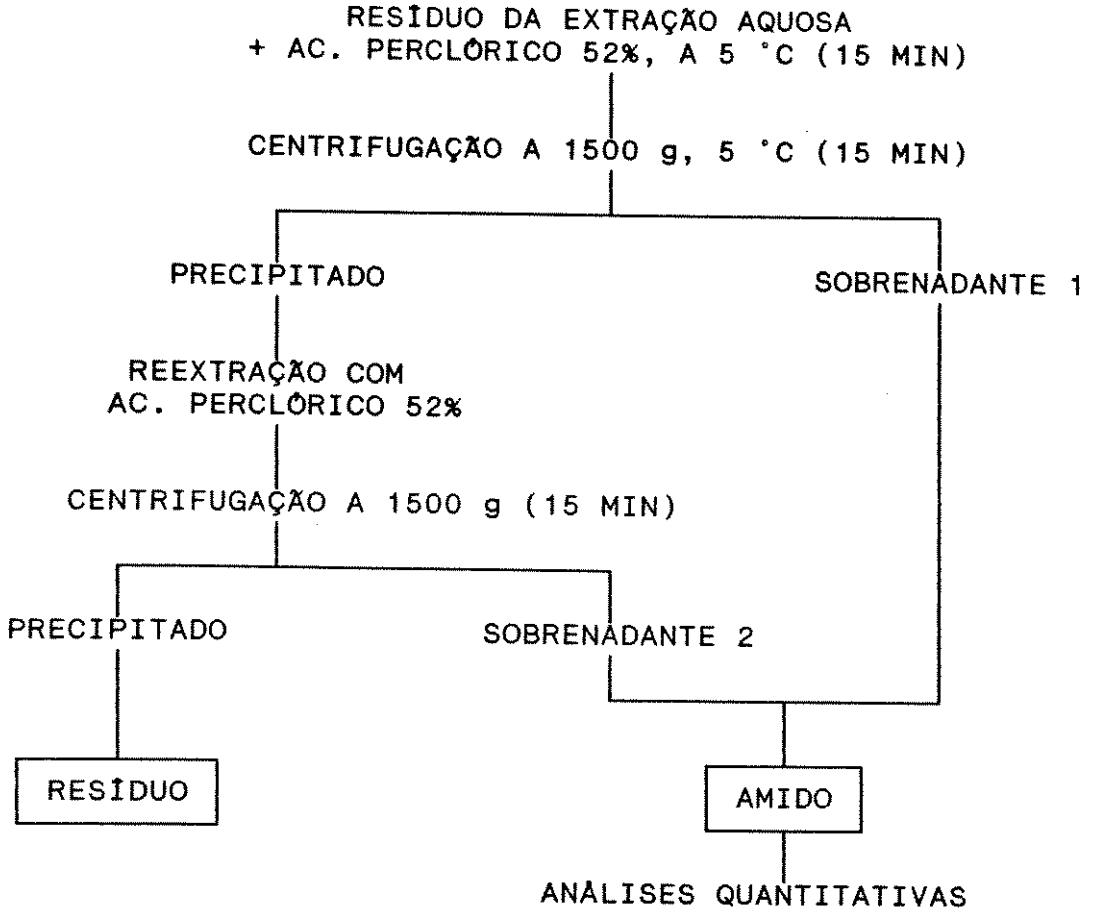


FIGURA 9 - Fluxograma da extração de amido

2.4.5. Análise quantitativa dos açúcares

As determinações quantitativas dos açúcares foram feitas através de métodos colorimétricos, sendo cada amostra analisada em triplicata. Os açúcares totais foram quantificados pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e os açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945), usando-se frutose como padrão.

A quantidade de frutose livre e ligada foi determinada segundo o método aplicado por McRARY & SLATTERY (1945), ou da antrona, modificado (JERMYN, 1956), utilizando-se em ambos os

casos, frutose como padrão.

O conteúdo de amido foi também determinado segundo o método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al.,1956), usando-se glucose como padrão, uma vez que frutose não foi detectada nessa fração, por método específico. O valor obtido em equivalentes de glucose foi multiplicado pelo fator de correção 0,9, conforme McCREADY et al.(1950), para estimativa da quantidade de amido presente.

2.4.6. Análise qualitativa dos açúcares

Cromatografia em camada delgada - amostras dos extratos etanólicos contendo os oligofrutanos foram concentradas em evaporador rotatório até pequeno volume, congeladas, descongeladas e centrifugadas a 13.000 g por 10 minutos a 5 °C. Amostras de aproximadamente 1ml do sobrenadante, contendo cerca de 20mg de açúcar foram submetidas á purificação em colunas de troca iônica (5x1cm), contendo resinas nas formas catiônica (Dowex 50x8 - 200) e aniônica (Dowex 1x8 - 200). Após eluição das amostras com 10ml de água destilada, os eluatos foram concentrados e quantidades desses extratos equivalentes a 100ug de frutose foram cromatografadas em placas de silica gel de alta resolução (TLC Ready-foil-F 1500, da Schleicher & Schuell), com desenvolvimento duplo em n-butanol: 2-propanol:água (3:12:4 v/v), conforme KANAYA et al. (1978). A revelação das manchas de frutose livre e ligada foi feita por aspersão com solução de uréia-ácido fosfórico (WISE et al., 1955). Utilizou-se como padrão uma mistura de oligofrutanos extraídos de tubérculos de **Helianthus tuberosus** que haviam sido armazenados a 5 °C, durante 3 meses,

conforme CAIRNS & POLLOCK (1988). As placas foram fotografadas imediatamente após a revelação. Através desse método foi possível a separação de componentes da série homóloga de frutanos com cadeias de até 13 resíduos de frutose.

Determinação do peso molecular - O peso molecular dos frutanos extraídos na fração aquosa foi determinado para os diferentes estádios fenológicos bem como para as diferentes fases de crescimento da planta, através de cromatografia por exclusão. Para tanto, amostras dessas frações foram ressolubilizadas em água, submetidas à diálise em água corrente por uma noite e centrifugadas por 5 minutos a 1.000g. Alíquotas de 1ml, contendo aproximadamente 5mg de carboidrato foram aplicadas em coluna (2x36cm) de gel de poliacrilamida (Bio-gel P-10), com fluxo de 0,3 ml.min , com limite de exclusão de 10.000 daltons. A coluna foi previamente calibrada com uma série de dextranos lineares de pesos moleculares conhecidos, o que permitiu a determinação do grau de polimerização aparente das amostras (ANDREWS, 1965). Frações de 2,4ml foram coletadas por eluição com tampão bicarbonato de amônio 10mM, contendo 0,002% (w/v) de azida sódica. O conteúdo de frutose foi determinado nas frações pelo método de antrona (JERMYN, 1956).

2.5. Análise estatística

Os dados bioquímicos obtidos para os diferentes pontos de amostragem foram submetidos ao cálculo do erro padrão da média.

Para a análise do crescimento utilizaram-se para cada parâmetro, as médias das 20 plantas utilizadas em cada ponto de

amostragem, seguidas do limite de confiança, a 5% de probabilidade.

Para o cálculo do tempo médio de brotação (t), adotou-se a expressão apresentada por Labouriau (1967) para germinação.

$$t = \frac{\sum_{i=0}^{i=g} P_i \cdot t_i}{G}$$

onde:

t_i = tempo de brotação;

t_g = tempo máximo de brotação;

t_0 = tempo mínimo de brotação;

P_i = porcentagem de brotação no tempo t_i;

G = capacidade de brotação (máxima porcentagem de brotação atingida).

IV. RESULTADOS

1. Estudo da variação dos carboidratos e da brotação em rizóforos de V. herbacea em diferentes estádios fenológicos

1.1. Caracterização dos estádios fenológicos

Durante o ciclo anual de crescimento e desenvolvimento, plantas de V. herbacea passam por um período de dormência que coincide com a estação seca do inverno, quando os ramos aéreos desaparecem. A brotação de novos ramos ocorre no final do inverno até o início da primavera, entre os meses de agosto e setembro, precedendo a floração , nos meses de setembro a novembro. Durante o verão verifica-se crescimento vegetativo intenso que diminui a partir de maio, no outono, quando as folhas passam a apresentar pequenas manchas avermelhadas, que são os primeiros sinais aparentes da senescência.

1.2. Análises quantitativas

1.2.1. Matéria seca

O conteúdo de matéria seca encontrado nos rizóforos de V. herbacea variou nas amostras obtidas em diferentes épocas do ano (Tabela 2), sendo os menores valores observados nas fases de floração e início de dormência (17,83 e 19,68%, respectivamente) e o maior valor, no final do verão (27,03%), quando a planta se encontrava no estádio vegetativo. O conteúdo de água também variou significativamente em algumas das fases estudadas.

A tabela 2 apresenta ainda dados referentes aos conteúdos de

açúcares totais, representados pela soma dos açúcares totais encontrados nas frações etanólica (oligofrutanos), aquosa (polifrutanos) e em ácido perclórico (açúcares insolúveis - amido). Observa-se que nos estádios fenológicos estudados, pelo menos 42% da matéria seca está representada por açúcares totais, como é o caso da floração. A maior participação dos açúcares na matéria seca foi observada na fase de brotação (setembro/86), com uma contribuição de 93% no peso da matéria seca dos rizóforos. Nesta fase, a porcentagem de resíduo após as extrações foi de 6,79, a menor encontrada, em oposição a 13,13%, observada na fase de floração.

O material residual compreende os componentes das paredes celulares, principalmente celulose e hemiceluloses, que são carboidratos insolúveis nos solventes utilizados para as extrações efetuadas.

TABELA 2. Conteúdo de matéria seca, açucar total e resíduo em rizóforos de Vernonia herbacea em diferentes estádios fenológicos. Os valores representam as médias ± erro padrão.

	ESTÁDIOS FENOLÓGICOS					
parâmetros analisados	Brotação Set	Floração Nov	Vegetativo Mar	I. Dorm. Mai	Dormência Jul	Brotação Set
matéria seca (% peso fresco)	26,04 ± 0,6	17,83 ± 1,7	27,03 ± 1,2	19,68 ± 2,6	25,35 ± 1,7	23,82 ± 0,8
açúcar total (mg.gp seco^{-1})	930,18 ± 59,4	425,09 ± 77,9	660,10 ± 15,3	473,88 ± 78,4	786,57 ± 49,1	722,44 ± 48,9
resíduo (mg.gp seco^{-1})	67,91 ± 2,3	131,28 ± 8,4	120,69 ± 9,2	120,95 ± 6,8	73,86 ± 5,6	103,20 ± 1,2

A variação nos açúcares totais foi analisada mais pormenorizadamente nas duas principais frações de carboidratos.

Em vista da variação no conteúdo de matéria seca, os resultados das análises dos açúcares foram expressos, na figura 10, em função do peso fresco.

1.2.2. Oligofrutanos e açúcares redutores

O conteúdo de monossacarídeos, sacarose e de oligofrutanos nos rizóforos foi estimado na fração etanólica, através de determinações de açúcar total e frutose total (Figura 10A). Como pode ser visto , os teores de açúcar total e de frutose total seguiram o mesmo padrão de variação, acompanhando as variações nos conteúdos de matéria seca encontradas (Tabela 2). Desta forma, as menores quantidades foram observadas nas fases de floração e início de dormência, alternando-se conteúdos mais elevados nas demais fases estudadas.

Os açúcares redutores representaram pequena parcela dos açúcares solúveis totais (Figura 10A), situando-se ao redor de 2 $mg.gpf^{-1}$. Entretanto, esses níveis aumentaram significativamente na fase de floração e no estádio vegetativo, ao final do verão, atingindo valores de 9,11 e 7,04 $mg.gpf^{-1}$, respectivamente.

1.2.3. Polifrutanos

Na fração de polissacarídeos (Figura 10B) ocorreu diminuição significativa no conteúdo desses compostos na época da floração (novembro) e no início de dormência (maio).

Os baixos conteúdos de polifrutanos encontrados nessas fases alternaram-se com conteúdos mais elevados desses compostos em

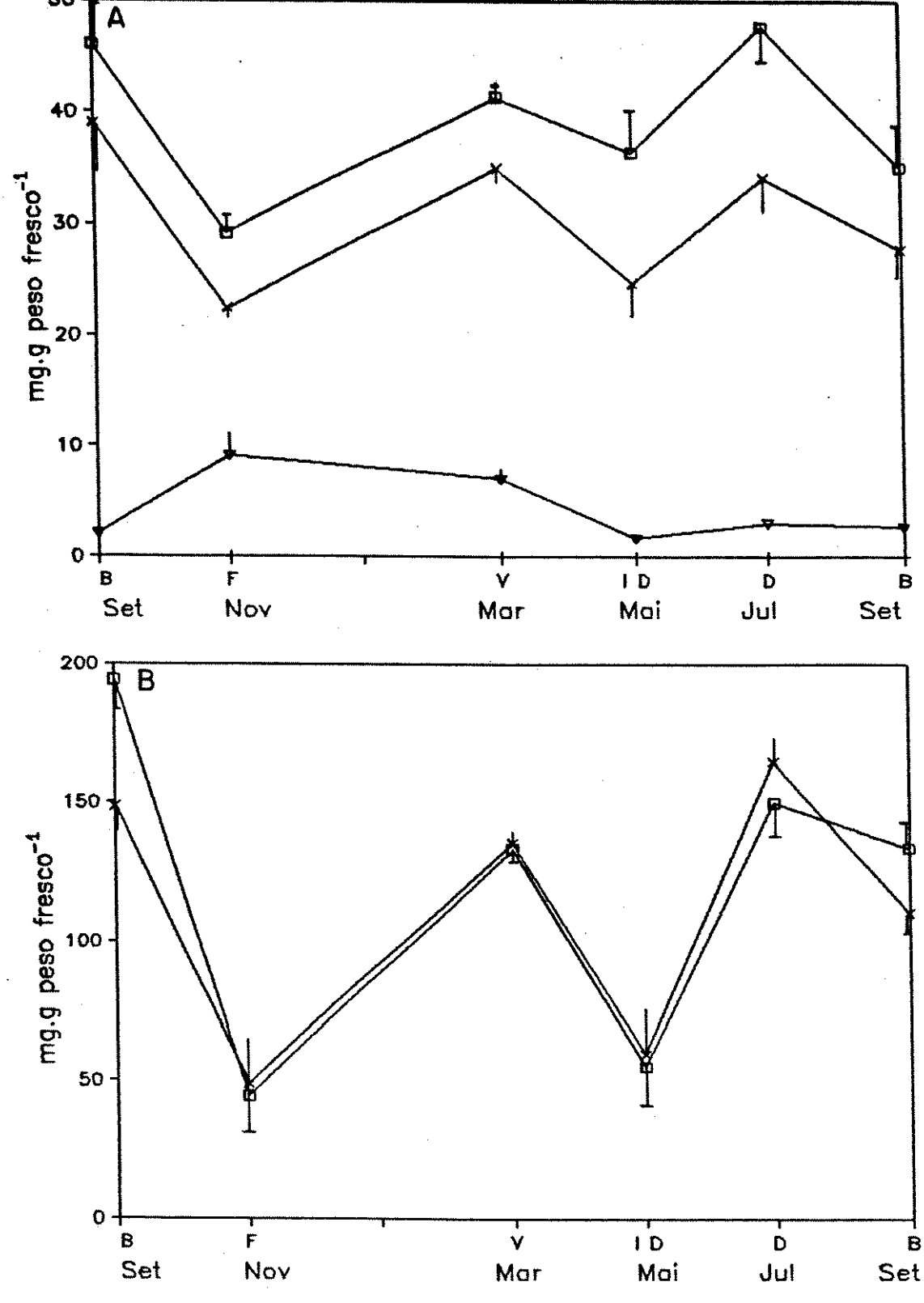


FIGURA 10 - Conteúdo de açúcar total (□), frutose total (x) e açúcar redutor (▽) nas frações de oligofrutanos (A) e polifrutanos (B), de rizóforos de **Vernonia herbacea** em diferentes estádios fenológicos. B-brotação, F-floração, V-vegetativo, ID-início de dormência, D-dormência. Barras verticais representam o erro padrão.

plantas na fase de brotação (setembro/86), analisada anteriormente à floração, no estado vegetativo (março) e em dormência (julho).

1.2.4. Amido

O conteúdo de amido encontrado nos rizóforos (Tabela 3) foi baixo em todas as fases estudadas, quando comparado com os níveis dos frutanos, sendo os valores máximos observados em plantas no estádio vegetativo (4,04 mg.gpf^{-1}) e na brotação - setembro/87 - (3,67 mg.gpf^{-1}). Frutose não foi detectada nesses extratos seja por método colorimétrico, seja por método de cromatografia em papel.

TABELA 3. Conteúdo de amido em rizóforos de Vernonia herbacea em diferentes estádios fenológicos. Os valores representam as médias ± erro padrão.

	ESTÁDIOS FENOLÓGICOS					
parâmetros analisados	Brotação Set	Floração Nov	Vegetativo Mar	I.Dormência Mai	Dormência Jul	Brotação Set
amido (mg.gp fresco^{-1})	2,28 ± 0,04	2,35 ± 0,11	4,04 ± 0,17	2,00 ± 0,09	2,29 ± 0,15	3,67 ± 0,20

1.3. Análises qualitativas

1.3.1. Oligofrutanos

A análise qualitativa da fração de oligofrutanos (Figura 11) revelou a presença de uma série homóloga de frutanos semelhante à encontrada em tubérculos de **Helianthus tuberosus** onde cada membro da série apresenta um resíduo de frutose a mais do que o membro anterior.

Através do método empregado foi possível a separação de componentes da série com até 13 resíduos de frutose (GP 14).

Observando-se a figura 11, verifica-se que o trissacarídeo presente nos rizóforos de V. **herbacea** e que dá origem à cadeia de frutanos nesta espécie apresenta migração cromatográfica idêntica à da isocestose.

Os mesmos componentes da série foram encontrados em cada estádio fenológico estudado, embora em proporções diferentes, o que pode ser concluído através da variação na intensidade das manchas nos cromatogramas. Desta forma, observou-se um aumento na proporção de frutose livre durante a floração, associado a uma diminuição na proporção de sacarose e de todos os demais componentes da série até GP 14, sugerindo despolimerização dessas cadeias nesse período. O aumento na frutose, detectado em TLC, coincidiu com o aumento no conteúdo de açúcar redutor na floração (Figura 10A). O mesmo pode também ser observado para as plantas no estádio vegetativo, embora com menor intensidade.

Nas fases de início de dormência, dormência e brotação ocorreu predominância de sacarose em relação à frutose livre, enquanto em floração e vegetativo ocorreu o inverso (Figura 11).

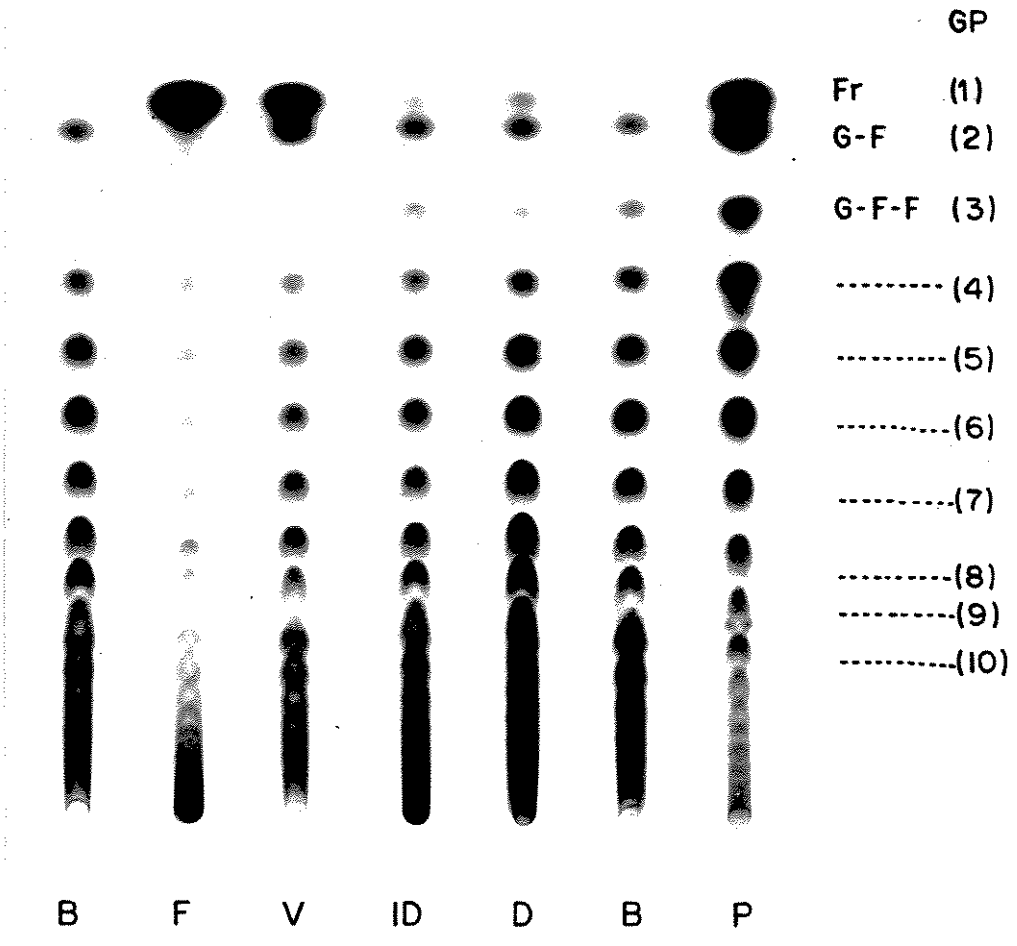


FIGURA 11 - Oligofrutanos presentes em rizóforos de **Vernonia herbacea** em diferentes estádios fenológicos. B-brotação, F-floração, V-vegetativo, ID-início de dormência, D-dormência, P-oligofrutanos de **Helianthus tuberosus**, Fr-frutose, G - F - sacarose, G - F - F - isocestose, GP - grau de polimerização.

Verificou-se ainda que nas fases de início de dormência e principalmente na dormência, os componentes da série com GP>3 estão presentes em proporções mais elevadas do que nas demais.

1.3.2. Polifrutanos

A figura 12 mostra os resultados obtidos quando os frutanos presentes na fração de polissacarídeos (GP>16) foram submetidos à cromatografia por exclusão em Bio-Gel P-10. A aplicação dessa técnica permitiu estimar o peso molecular (PM) médio e consequentemente o grau de polimerização das cadeias de frutanos nos estádios fenológicos estudados. Assim, verificou-se que o maior valor de PM médio (10.715 , GP 66) correspondeu à fase em que a planta encontrava-se em estado vegetativo, no final do verão. Nas demais fases analisadas os PM médios encontrados situaram-se ao redor de 7.000 (GP 43), exceto na fase de brotação (setembro/87) quando o PM médio encontrado foi de 8.376 (GP 52).

1.4. Brotação de fragmentos de rizóforos

A figura 13 mostra um fragmento de rizóforo com ramo aéreo, 45 dias após o plantio.

A brotação dos fragmentos retirados de plantas em diferentes estádios fenológicos está representada na figura 14, sendo os dados expressos em porcentagem de rizóforos brotados (Figura 14 A) e em tempo médio de brotação (Figura 14 B).

As porcentagens de brotação mais elevadas foram observadas nas 2 fases de brotação e na de floração (93%, 100% e 94%, respectivamente). Nessas fases a brotação foi mais rápida do que nas demais, sendo que 30 dias após o plantio mais de 74% dos

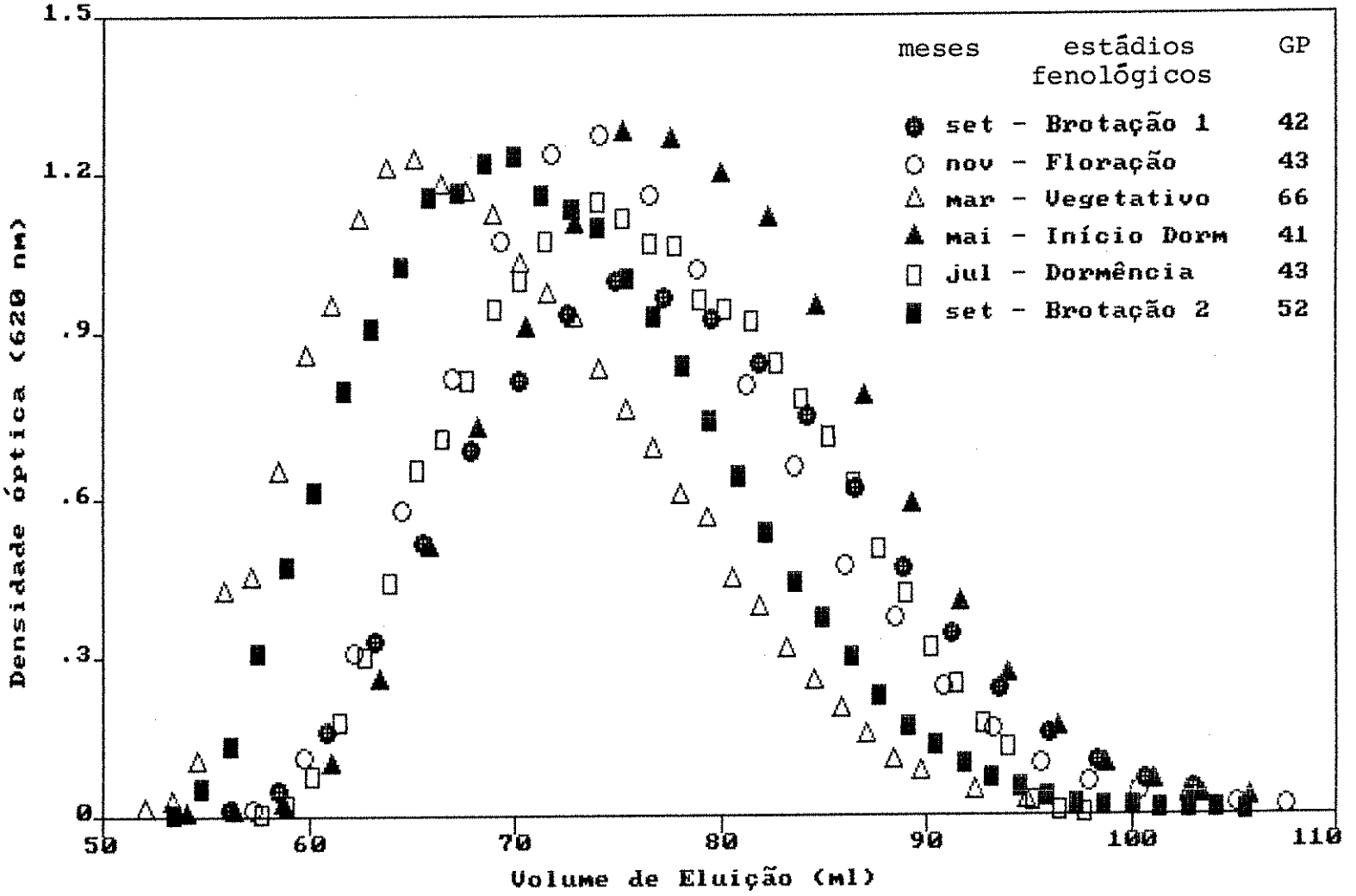


FIGURA 12 - Cromatografia por exclusão, em coluna de Bio-Gel P-10, dos polifrutanos de rizóforos de Vernonia herbacea em diferentes estádios fenológicos. GP - grau de polimerização.

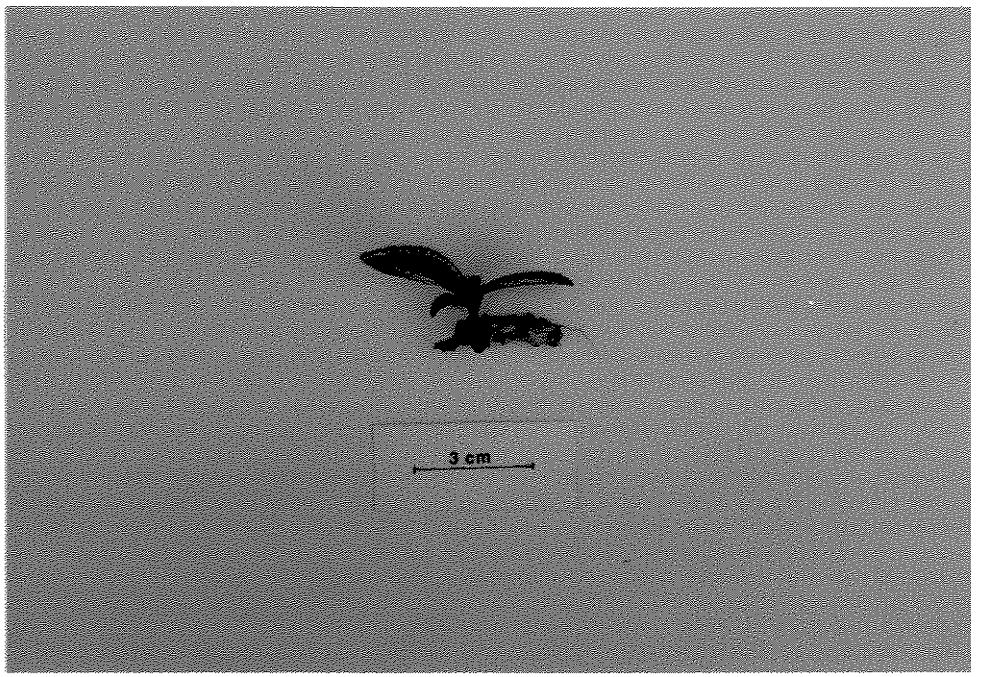
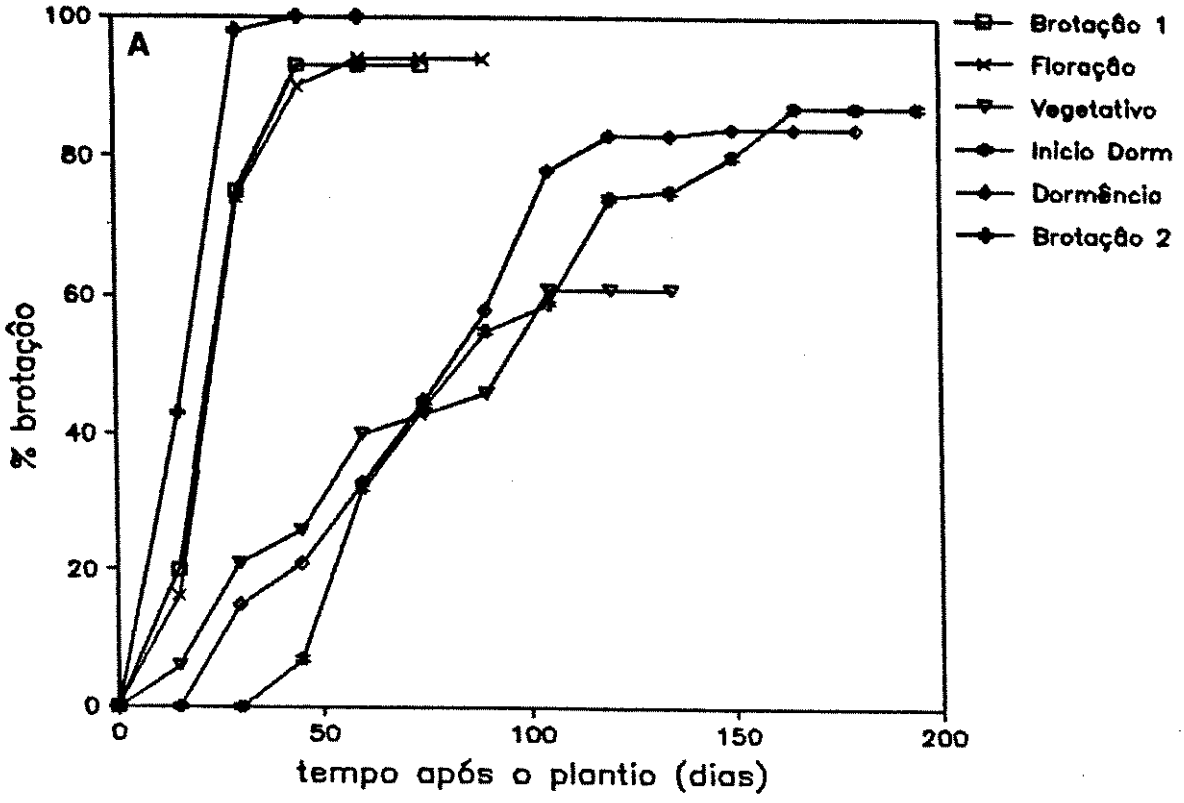


FIGURA 13 - Fragmento de rizóforo de Vernonia herbacea aos 45 dias de brotação.



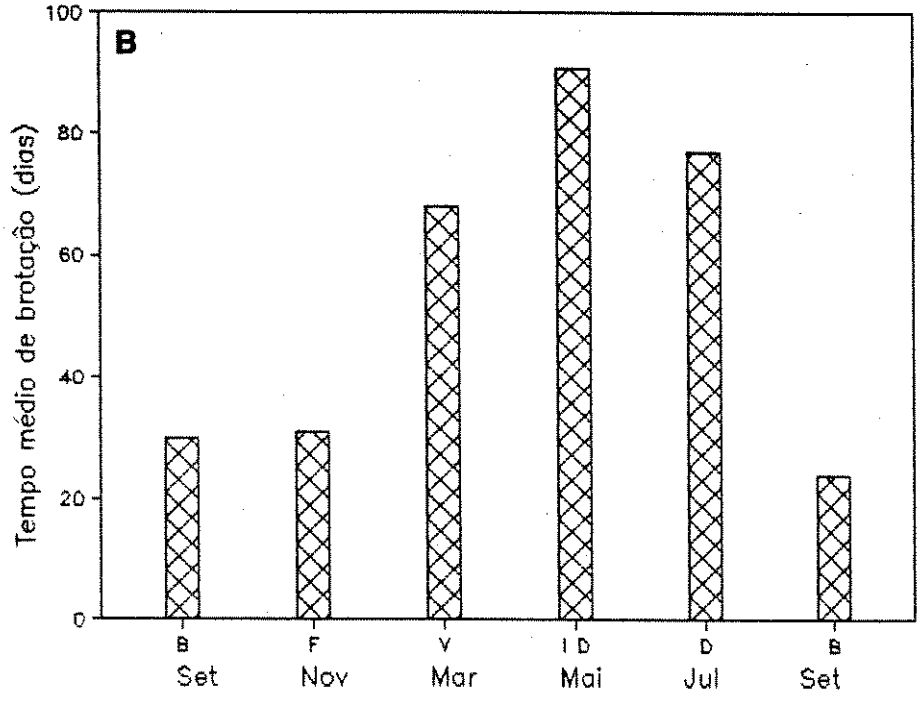


FIGURA 14 - Porcentagem (A) e tempo médio (B) de brotação de fragmentos de rizóforos retirados de plantas de Vernonia herbacea em diferentes estádios fenológicos.
B - Brotação, F - Floração, V - Vegetativo, ID - Início de Dormência, D - Dormência.

fragmentos já haviam brotado, enquanto os fragmentos retirados de plantas nos estádios vegetativo, início de dormência e dormência apresentavam respectivamente, 12%, 0% e 15% de brotação neste mesmo tempo.

A menor porcentagem final de brotação foi atingida por fragmentos de rizóforos retirados de plantas no estádio vegetativo (61%).

Embora os tempos médios de brotação tenham sido maiores e as porcentagens de brotação tenham sido menores nos fragmentos retirados de plantas nos estádios vegetativo, início de dormência e dormência , os ramos aéreos originados apresentaram crescimento uniforme em todas as fases estudadas (dados não apresentados).

Esses resultados mostram que, embora a brotação dos fragmentos de rizóforos seja mais eficiente durante a primavera, a propagação vegetativa de V. herbacea através desta técnica pode ser obtida durante o ano todo.

2. Estudo do desenvolvimento da planta e dos frutanos em rizóforos de V. herbacea

2.1. Crescimento de plantas a partir de fragmentos do rizóforo

A figura 15 representa diferentes etapas de crescimento e desenvolvimento de plantas de V. herbacea formadas a partir da brotação de fragmentos de rizóforos.

Na tabela 4 são apresentadas medidas de crescimento das partes aérea e subterrânea dessas plantas, obtidas ao longo de 26 meses consecutivos. Os valores representam a média de 20

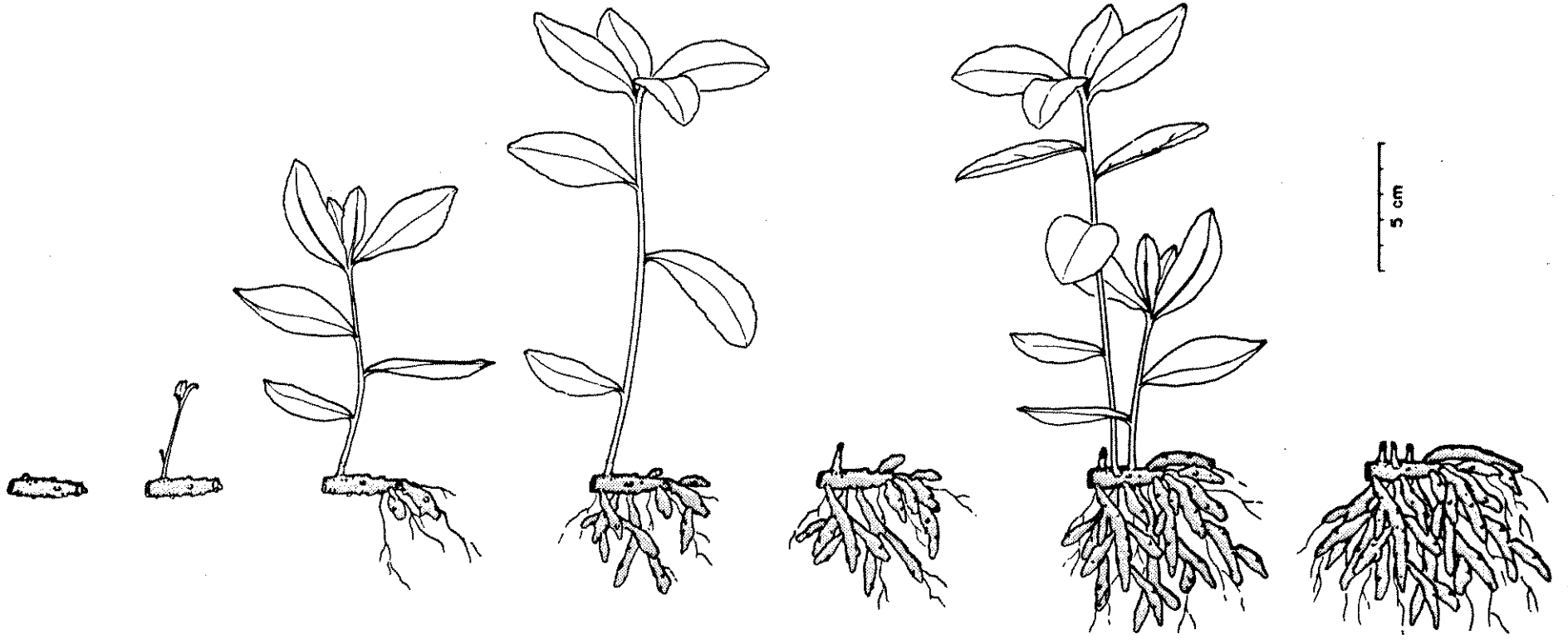


FIGURA 15. Representação esquemática de plantas de Vernonia herbacea durante o crescimento a partir de fragmentos de rizóforos

TABELA 4. Crescimento da parte aérea (A) e subterrânea (B) de plantas de Vernonia herbacea. Os valores representam as médias seguidas do limite de confiança (l.c.) a 5%.

A

meses após o plantio	PARTE AÉREA				
	altura (cm)	no.folhas	área foliar (cm2)	peso fresco (g)	peso seco (g)
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
3	2,17 ± 0,61	4 ± 0,41	2,22 ± 0,36	0,11 ± 0,02	0,02 ± 0,00
6	10,93 ± 2,38	7 ± 1,01	18,92 ± 3,98	1,03 ± 0,20	0,17 ± 0,03
9	16,88 ± 2,89	11 ± 1,03	109,18 ± 26,76	6,72 ± 1,59	0,88 ± 0,18
12	19,83 ± 3,73	10 ± 1,24	95,79 ± 15,90	5,94 ± 0,87	0,94 ± 0,12
15	0	0	0	0	0
18	13,00 ± 1,95	10 ± 1,32	76,85 ± 15,60	6,52 ± 1,34	0,95 ± 0,19
21	12,24 ± 2,66	19 ± 3,39	183,00 ± 36,88	14,54 ± 3,16	2,47 ± 0,57
24	14,12 ± 5,27	12 ± 4,45	99,43 ± 30,81	9,08 ± 3,04	1,57 ± 0,54
26	0	0	0	0	0

B

meses após o plantio	PARTE SUBTERRÂNEA		
	peso fresco (g)	peso seco (g)	peso seco total da planta (g)
0	1,09 ± 0,12	0,21 ± 0,02	0,22 ± 0,02
1	1,49 ± 0,22	0,28 ± 0,04	0,28 ± 0,04
3	1,51 ± 0,17	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,02
6	2,08 ± 0,27	0,34 ± 0,04	0,51 ± 0,06
9	5,80 ± 0,13	1,14 ± 0,28	2,03 ± 0,45
12	11,35 ± 0,16	2,65 ± 0,39	3,59 ± 0,48
15	8,60 ± 1,43	1,79 ± 0,31	1,79 ± 0,31
18	11,72 ± 2,06	2,37 ± 0,45	3,32 ± 0,59
21	24,76 ± 8,02	5,11 ± 1,70	7,58 ± 2,13
24	28,69 ± 6,43	6,51 ± 1,48	8,08 ± 1,72
26	30,94 ± 8,13	7,36 ± 1,93	7,36 ± 1,93

plantas analisadas em cada ponto de amostragem, sendo indicados os limites de confiança (l.c.) encontrados para cada média.

Para melhor visualização dos resultados, os dados contidos na tabela 4 são mostrados nas figuras 16 a 19.

A brotação dos fragmentos iniciais de rizóforos teve início aproximadamente 50 dias após o plantio, sendo as primeiras medidas de crescimento dos ramos aéreos efetuadas aos 3 meses. Os resultados apresentados na tabela 4A e figura 16 mostram que durante os 26 meses de experimento as plantas passaram por dois ciclos de desenvolvimento, apresentando crescimento vegetativo intenso no primeiro ciclo, seguido de senescência da parte aérea no final do outono e início de inverno e finalmente dormência da planta. Neste ciclo não ocorreu floração.

Visualmente, o final da dormência é marcado pela brotação de novos ramos aéreos no final do inverno e consequente desenvolvimento de inflorescências entre os meses de setembro e novembro. No segundo ciclo de desenvolvimento as plantas apresentaram um número maior de ramos aéreos (dados não apresentados) em relação ao primeiro, quando apenas um ramo se desenvolveu em cada planta.

Os ramos originados no segundo ciclo entraram em senescência ao redor de 24 meses do início do experimento, isto é, no final do outono, acompanhando o início de dormência das plantas.

Em concordância com o maior número de ramos aéreos, o número de folhas e os pesos fresco e seco da parte aérea foram mais elevados no segundo ciclo de desenvolvimento do que no primeiro (Figura 16). O mesmo não ocorreu com a altura do maior ramo de cada planta, que foi inferior no segundo ciclo de

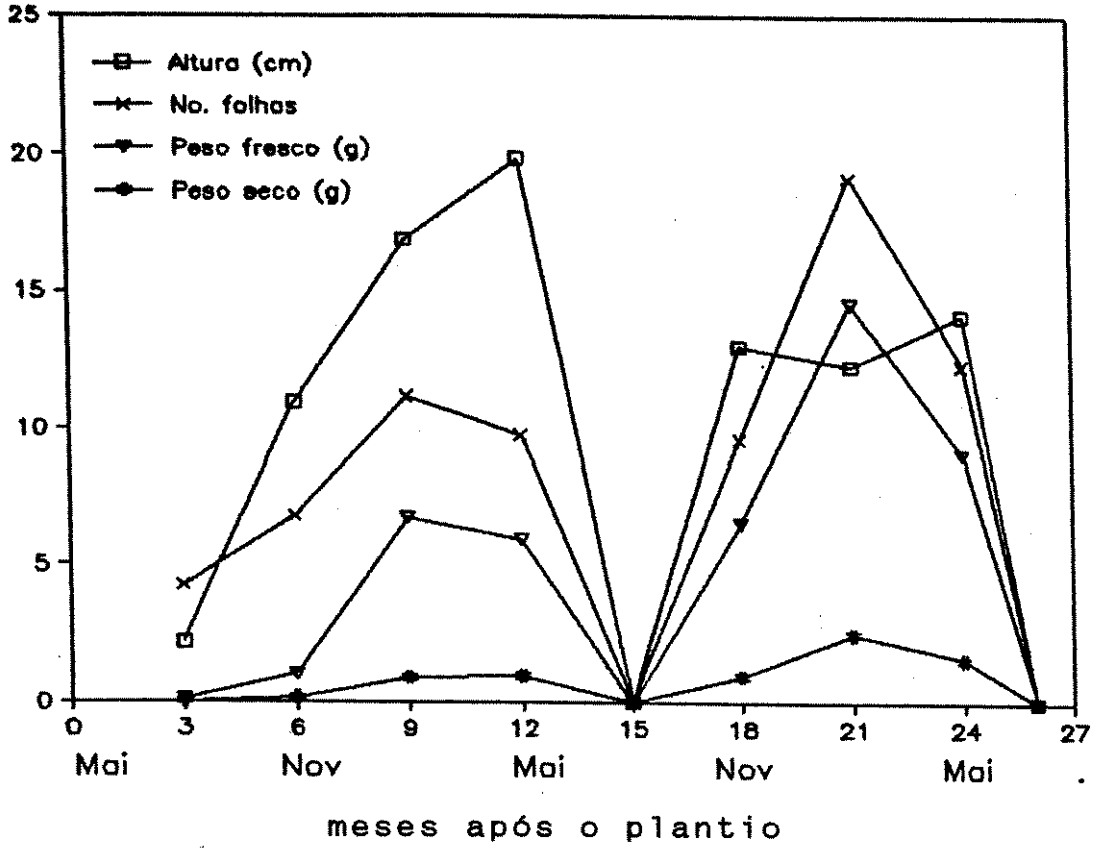


FIGURA 16 - Crescimento da parte aérea de plantas de **Vernonia herbacea**, obtidas por brotação do rizóforo.

desenvolvimento.

De maneira semelhante aos outros parâmetros mencionados acima, a área foliar apresentou dois picos máximos ao longo do período estudado, ambos no final do verão, aos 9 e aos 21 meses do início do experimento (Figura 17). Nas determinações subsequentes, que foram feitas no início da dormência, aos 12 e 24 meses, respectivamente, verificou-se uma diminuição na área foliar das plantas. Esta diminuição, que se apresentou apenas como uma tendência aos 12 meses, foi marcante aos 24.

Da mesma forma, aos 12 e 24 meses, foram observadas diminuições no número de folhas em cada planta e nos pesos fresco e seco (Figura 16). Aos 12 e 26 meses as plantas se encontravam em dormência, não havendo ramos aéreos.

Com relação à parte subterrânea (Tabela 4B, Figura 18), verificou-se um aumento no peso total dos rizóforos ao longo do período estudado. Este aumento se deve à formação e subsequente crescimento de ramificações do sistema subterrâneo (rizóforos jovens), cujas medidas passaram a ser efetuadas a partir do 6º mês do experimento, quando essas formações se tornaram evidentes (Figura 15). No entanto, a partir do início da dormência até a floração das plantas, entre 12 e 18 meses, verificou-se uma parada no crescimento dos rizóforos (Figura 18).

Quando os pesos secos da parte aérea e dos rizóforos foram comparados entre si ao longo dos 26 meses (Figura 19), verificou-se que em todos os pontos analisados o peso seco dos rizóforos foi superior ao dos ramos aéreos. As fases de crescimento aéreo intenso nos dois ciclos de desenvolvimento (entre 6 e 9 meses e entre 18 e 21 meses) coincidiram com a época de verão e foram

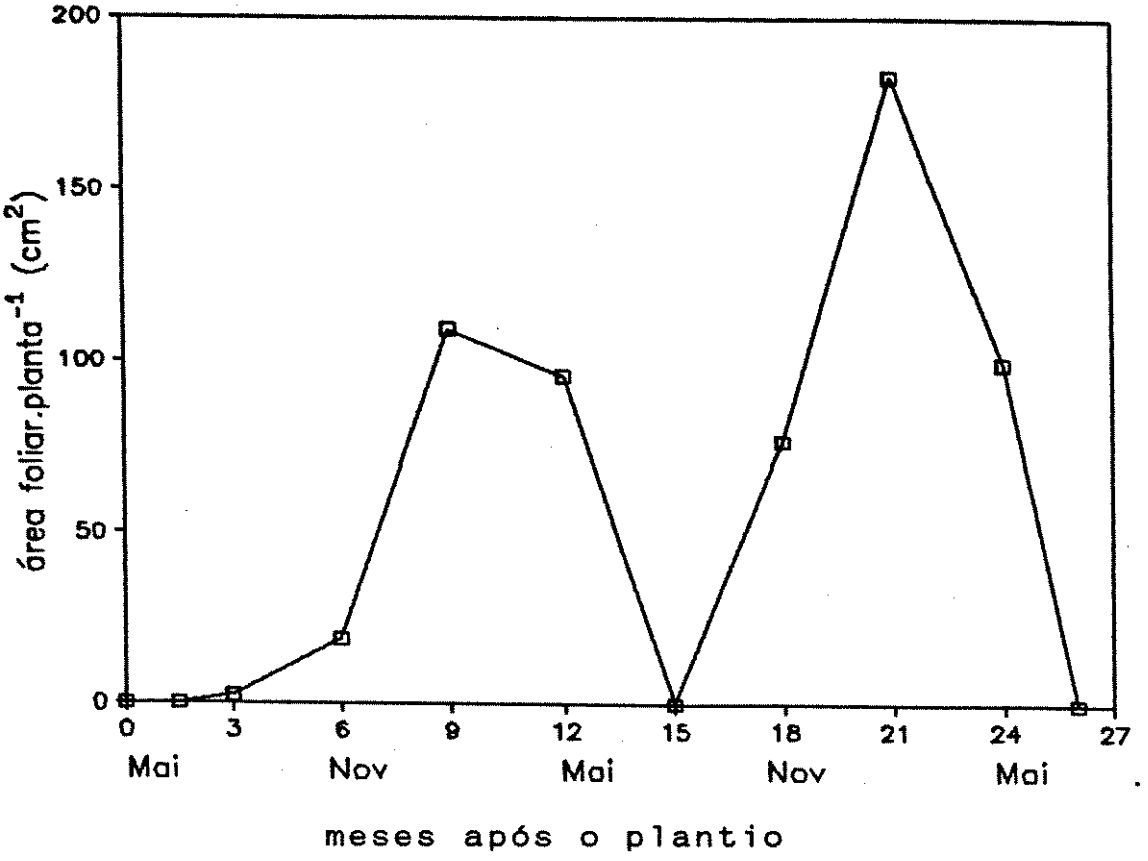


FIGURA 17 - Area foliar durante o crescimento de plantas de **Vernonia herbacea**, obtidas por brotação do rizóforo.

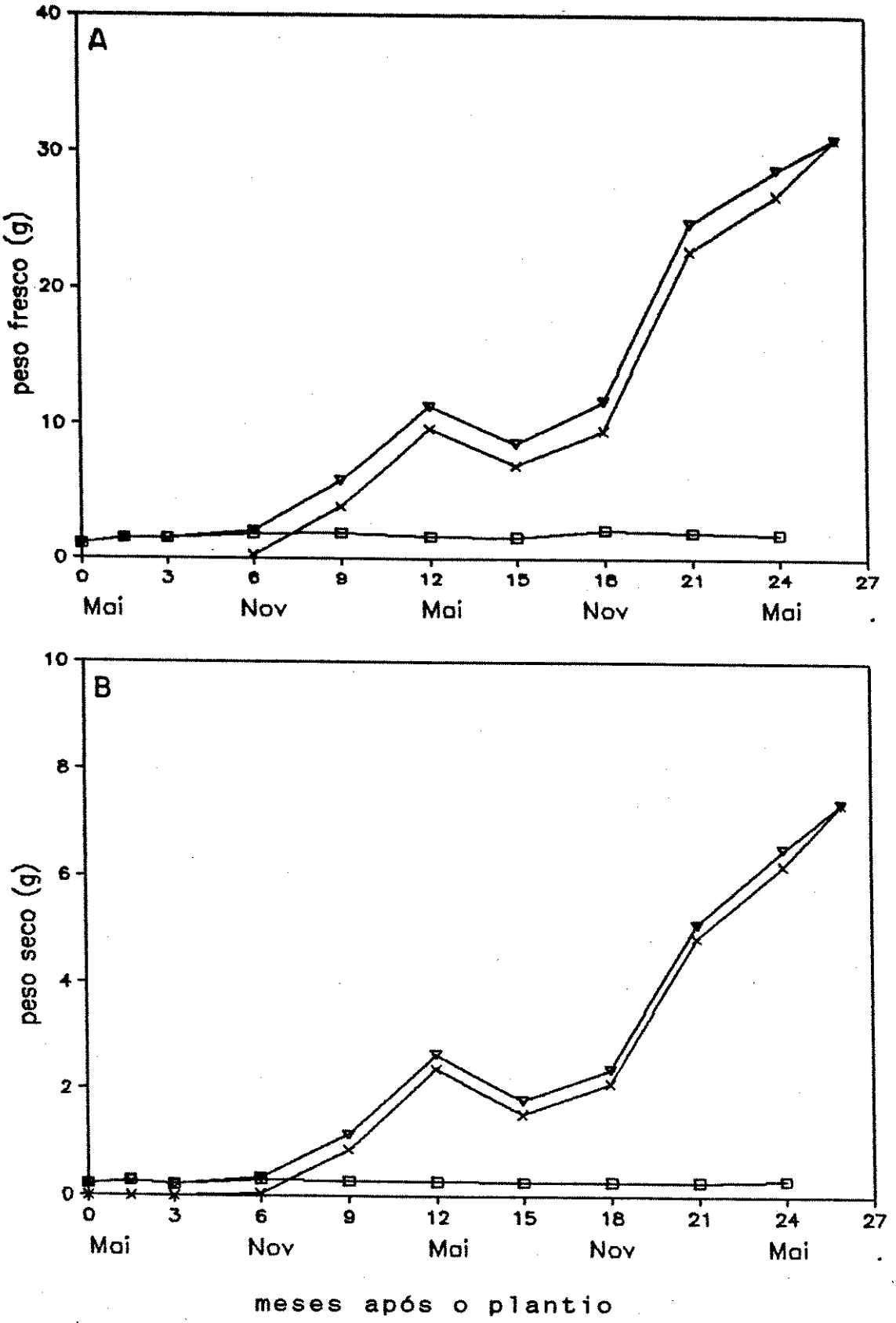


FIGURA 18 - Pesos fresco (A) e seco (B) durante o crescimento do sistema subterrâneo de plantas de **Vernonia herbacea**, obtidas por brotação do rizóforo. Fragmento inicial (□), rizóforos jovens (X), rizóforo total (▽).

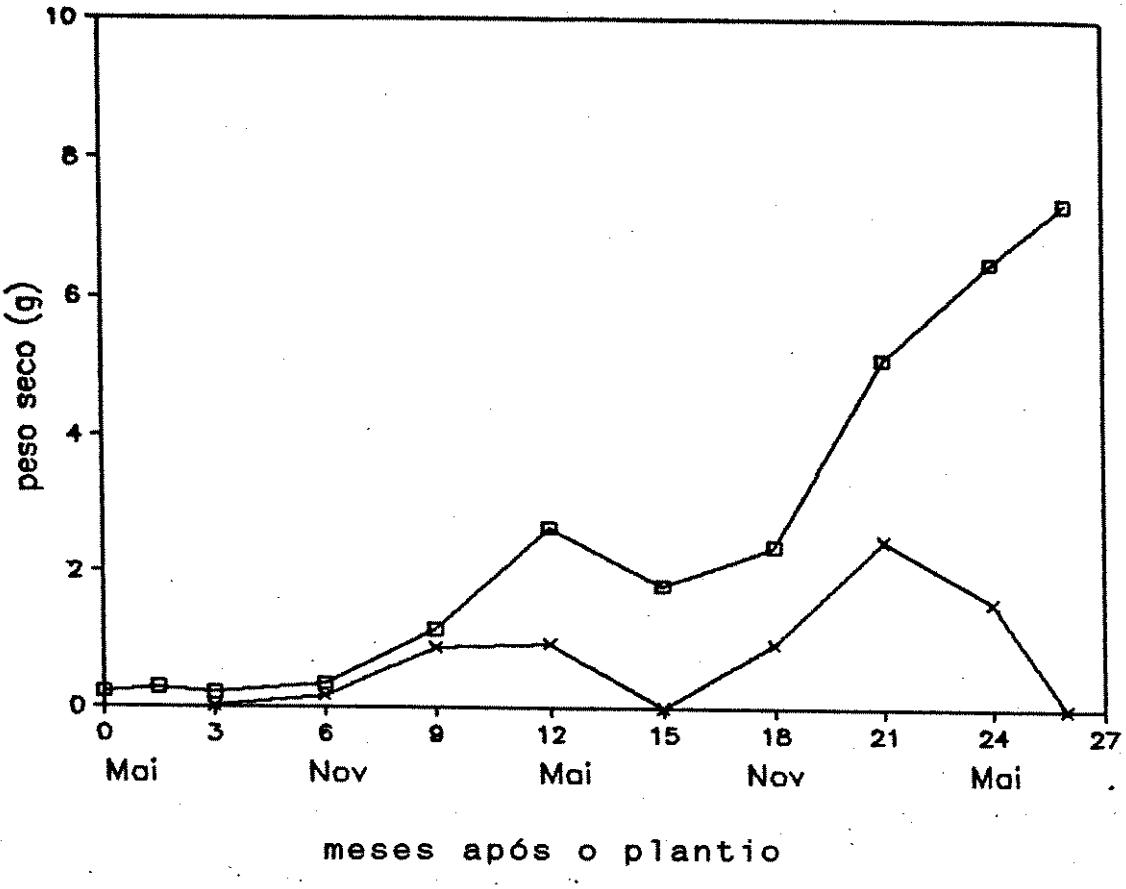


FIGURA 19 - Peso seco das partes aérea (X) e subterrânea (□) durante o crescimento de plantas de Vernonia herbacea, obtidas por brotação do rizóforo.

acompanhadas de grandes aumentos no peso dos rizóforos, principalmente no segundo ciclo quando a área foliar (Figura 17) e a taxa de assimilação líquida (TAL) (Figura 20) atingiram valores máximos dentro do período estudado.

Os valores de razão de área foliar (RAF) obtidos neste experimento (Figura 21) sugerem a eficiência do sistema assimilador (folhas) nesta espécie, mostrando que a relação entre a parte aérea fotossintetizante e o peso seco total da planta diminuiu à medida em que a planta se desenvolveu.

A razão entre o peso seco do órgão subterrâneo e o peso seco da parte aérea (PSS:PSA) também foi analizada ao longo dos 26 meses de experimentação (Figura 22). Exceto pelo valor encontrado no mês 3, que foi bastante alto pois a parte aérea neste ponto era incipiente, e o sistema subterrâneo era constituído apenas pelo rizóforo inicial, o padrão de variação de PSS:PSA foi semelhante nos dois ciclos de desenvolvimento observados. Este padrão constou de uma diminuição entre o final da primavera (meses 6 e 18) e o final do verão (meses 9 e 21), quando a parte aérea apresentou crescimento intenso, como já foi mencionado anteriormente, seguida de um aumento entre o final de verão e o outono (meses 12 e 24), quando o crescimento da parte aérea sofreu uma depressão, correspondendo ao início da senescência e, subsequentemente, à dormência (Figuras 16, 17 e 19).

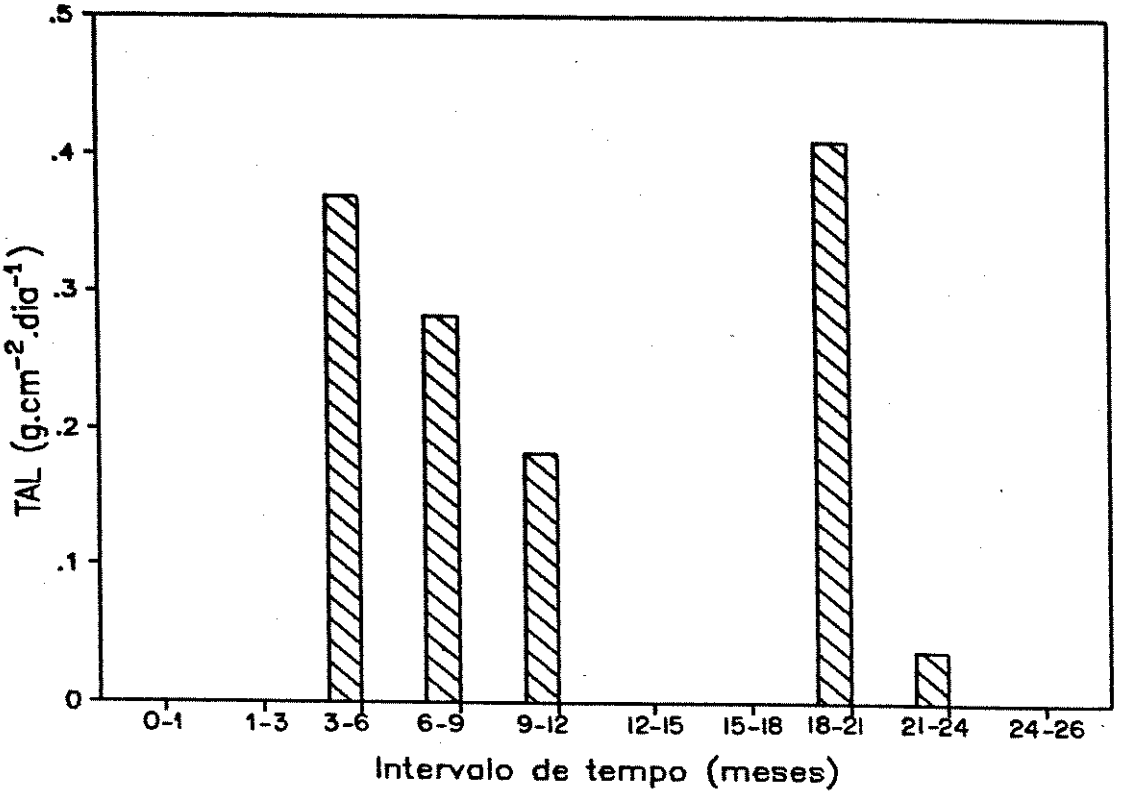


FIGURA 20 - Taxa de assimilação líquida (TAL) durante o crescimento de plantas de Vernonia herbacea, obtidas por brotação do rizóforo.

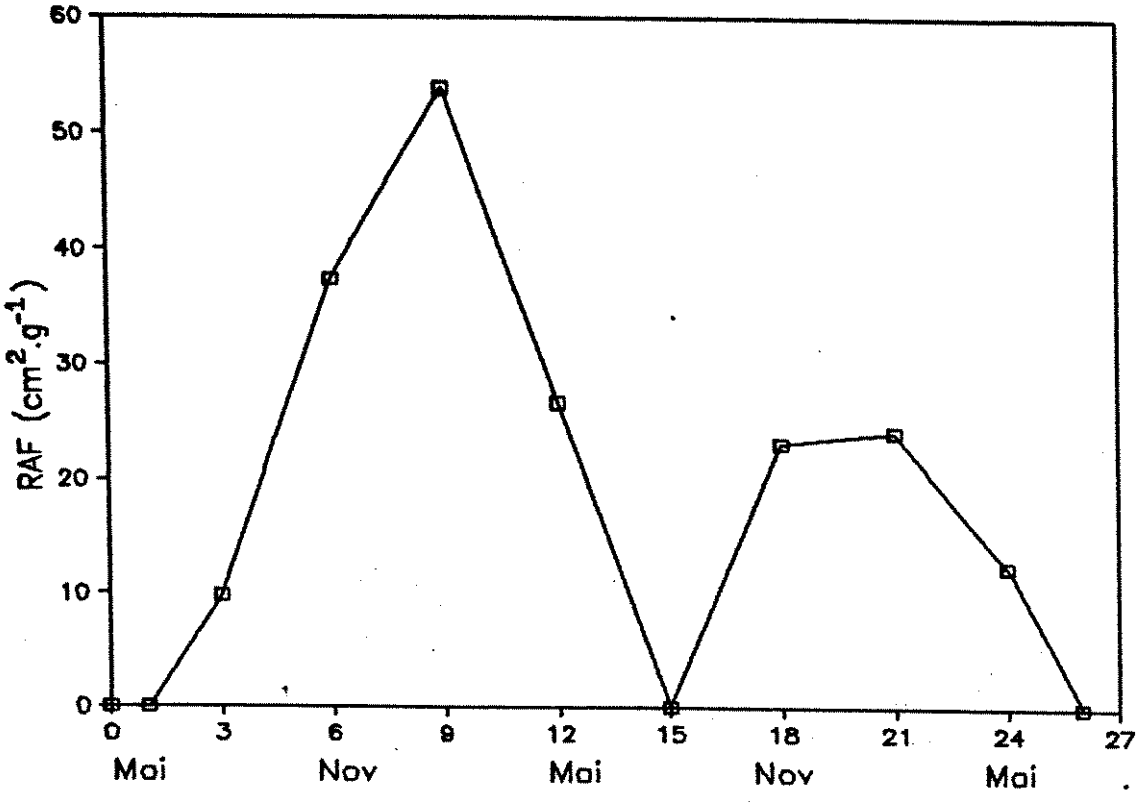


FIGURA 21 - Razão de área foliar (RAF) durante o crescimento de plantas de **Vernonia herbacea**, obtidas por brotação do rizóforo.

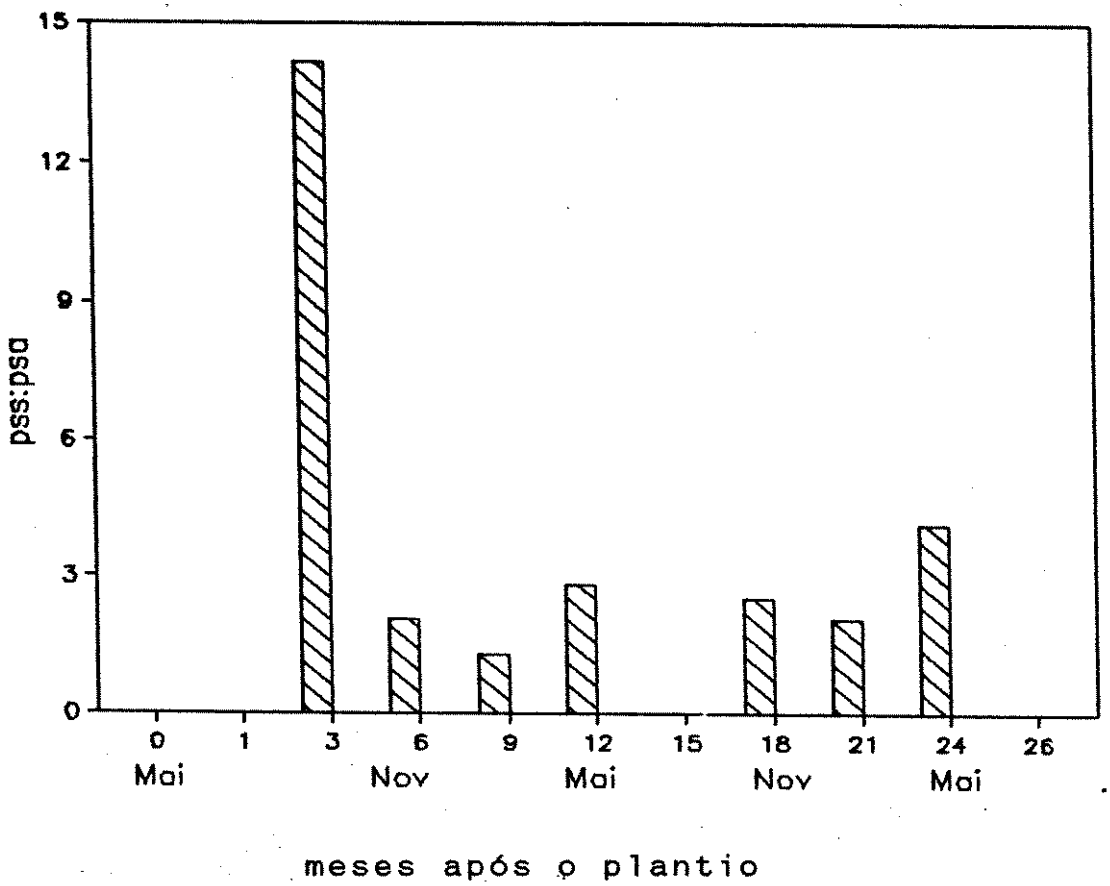


FIGURA 22 - Relação entre peso seco subterrâneo (pss) e peso seco aéreo (psa) durante o crescimento de plantas de **Vernonia herbacea**, obtidas por brotação do rizóforo.

2.2. Conteúdo e composição dos frutanos durante o crescimento da planta

2.2.1. Análises quantitativas

A matéria seca, expressa em porcentagem do peso fresco variou pouco durante o período estudado, tanto nos fragmentos iniciais do rizóforo quanto nos rizóforos jovens (Tabela 5). Os valores de peso seco encontrados nestes últimos foram, em geral, maiores do que nos rizóforos iniciais.

A tabela 5 apresenta também os dados de açúcares totais, representados pela soma dos açúcares encontrados nas frações etanólica e aquosa.

Assim como foi verificado para a matéria seca, os maiores valores de açúcares totais também foram encontrados nas novas ramificações do rizóforo nas quais constituem em média cerca de 65% da matéria seca encontrada. As diferenças observadas entre as épocas de análise foram pequenas, exceto nos rizóforos recém-formados, aos 6 meses de experimento, onde o conteúdo de carboidratos totais foi menor (Tabela 5B). Nesta fase, a porcentagem de matéria seca também foi menor quando comparada com os valores seguintes, que pouco variaram até o final do período estudado.

As variações entre os pesos de resíduos após as extrações também foram pequenas durante o período de análise (Tabela 5B).

A proporção de água em relação à matéria seca foi maior nos rizóforos iniciais do que nos rizóforos jovens. Os conteúdos de açúcares totais, como já mencionado, foram, em média, inferiores aos obtidos para os rizóforos jovens, e sofreram diminuição ao

TABELA 5. Conteúdo de matéria seca, açúcar total e resíduo em fragmentos iniciais de rizóforos (A) e rizóforos jovens (B) de Vernonia herbacea durante o crescimento. Os valores representam as médias ± erro padrão.

A

parâmetros analisados	MESES APÓS O PLANTIO									
	0	1	3	6	9	12	15	18	21	24
matéria seca (% peso fresco)	19,68 ± 2,60	19,14 ± 0,43	14,12 ± 0,56	16,21 ± 0,14	14,60 ± 1,53	16,07 ± 0,35	16,07 ± 0,70	12,23 ± 0,13	13,26 ± 0,40	16,21 ± 0,27
açúcar total (mg.gp seco^{-1})	463,70 ± 51,8	415,79 ± 83,8	376,53 ± 90,6	403,26 ± 43,7	331,75 ± 27,9	181,60 ± 42,9	235,78 ± 39,7	263,97 ± 51,8	150,86 ± 54,4	139,43 ± 14,1
resíduo (mg.gp seco^{-1})	121,00 ± 0,00	122,10 ± 0,01	161,70 ± 0,01	208,60 ± 0,02	264,80 ± 0,01	219,70 ± 0,01	230,80 ± 0,03	347,20 ± 0,02	396,70 ± 0,05	266,10 ± 0,01

B

parâmetros analisados	MESES APÓS O PLANTIO										
	0	1	3	6	9	12	15	18	21	24	26
matéria seca (% peso fresco)	-	-	-	17,17 ± 0,21	22,28 ± 0,16	24,61 ± 0,56	21,93 ± 0,36	22,06 ± 1,65	21,29 ± 0,78	23,15 ± 1,16	23,78 ± 0,58
açúcar total (mg.gp seco^{-1})	-	-	-	447,47 ± 6,1	649,00 ± 14,8	686,62 ± 18,5	693,89 ± 34,6	619,71 ± 25,0	679,87 ± 25,1	653,87 ± 15,9	692,88 ± 16,6
resíduo (mg.gp seco^{-1})	-	-	-	126,40 ± 0,00	110,10 ± 0,00	154,80 ± 0,01	111,60 ± 0,01	127,30 ± 0,01	126,90 ± 0,00	130,20 ± 0,01	132,10 ± 0,00

longo do período estudado. Os pesos dos resíduos ao longo desse período foram, em oposição, maiores nos rizóforos iniciais (Tabela 5A).

As variações dos carboidratos nas frações de oligofrutanos e de polifrutanos foram estudadas em maiores detalhes e são mostradas nas figuras 23 e 24.

Nos fragmentos iniciais de rizóforos, o conteúdo de frutose total na fração de polifrutanos, que era de 302,39 $mg.gps^{-1}$ no início do experimento (Figura 23A) diminuiu gradualmente ao longo dos meses, chegando a 6,34 $mg.gps^{-1}$ aos 21 meses de cultivo.

A degradação desses polímeros, portanto, se deu não apenas durante o primeiro período de brotação da parte aérea, ocorrido entre o 1º e o 3º mês principalmente, mas continuou durante todo o processo de desenvolvimento da planta, até o final do período estudado.

O conteúdo de monossacarídeos e oligofrutanos nos fragmentos iniciais de rizóforos, representado pelos teores de frutose total e açúcar total (Figura 23B), sofreu um aumento após o primeiro mês de experimento até o 9º mês, no período em que as plantas apresentaram crescimento vegetativo intenso. Em seguida ocorreu uma diminuição no 12º mês, coincidindo com o início de dormência das plantas, e novo aumento até o 18º mês, durante as fases de dormência, brotação e floração, respectivamente. Após os 18 meses o conteúdo desses compostos caiu, atingindo novamente valores baixos no início da dormência (24 meses), semelhantes aos encontrados no início do experimento.

As flutuações encontradas nos níveis desses açúcares e que foram apresentadas na figura 23B, apresentaram perfil semelhante

ao observado para os dados de crescimento da parte aérea (Figuras 16, 17 e 21).

A figura 23B apresenta ainda os dados de conteúdo de açúcares redutores nos fragmentos iniciais de rizóforo os quais mantiveram-se, em geral, baixos (entre 8 e 15 mg. gps^{-1}), sofrendo um aumento significativo aos 3 meses, elevando o nível para 48,78 $mg.gps^{-1}$.

A realização de análise de frutanos nos fragmentos iniciais de rizóforos não foi possível aos 26 meses, uma vez que estes já se encontravam bastante descaracterizados visualmente, impedindo sua separação do restante do sistema subterrâneo já bem desenvolvido.

Nos rizóforos jovens, que passaram a ser analisados a partir do 6º mês do experimento, o conteúdo de frutanos com GP > 16 também sofreu alterações significativas durante o período analisado (Figura 24A). Nesses tecidos novos, o conteúdo inicial era de 93.20 mg. gps^{-1}, e à medida que essas ramificações subterrâneas foram se desenvolvendo, passaram a acumular maiores quantidades desses compostos de modo que em 6 meses (no 12º mês do experimento), o conteúdo detectado foi de 472 mg. gps^{-1}, considerando-se a frutose total. Níveis elevados desses compostos foram mantidos entre o 12º e o 15º mês, período relativo ao início de dormência e dormência da planta. Com o final da dormência, início de brotação e floração, o conteúdo dos polifrutanos diminuiu, sendo recuperado apenas após o 21º mês do experimento. Aos 26 meses, com as plantas em dormência, o conteúdo desses polímeros atingiu novamente valores ao redor de

470 mg.gps^{-1}.

Por outro lado, o conteúdo de monossacarídeos e oligofrutanos presente nesses tecidos variou no sentido inverso ao do conteúdo de polifrutanos. Verificou-se, portanto, um conteúdo inicial elevado (340 mg.gps^{-1}) quando as ramificações subterrâneas eram bastante recentes (Figura 24B), seguido de diminuição aos 12 e 15 meses (161 mg.gps^{-1}), quando as plantas encontravam-se em início de dormência e dormência, propriamente dita. Seguindo-se esse período, ocorreu um aumento que atingiu o máximo aos 21 meses (297 mg.gps^{-1}), com as plantas em estado vegetativo, no final do verão. Após este período, o conteúdo dos oligofrutanos caiu novamente encontrando-se em níveis baixos (161 mg. gps^{-1}) mais uma vez durante a fase de dormência das plantas, aos 26 meses.

Comparando-se a figura 24B à 23B, verificou-se um paralelismo nas variações dos oligofrutanos durante o período estudado, observado também quando esta foi comparada à figura 16, que apresenta as variações nos parâmetros de crescimento da parte aérea das plantas.

A figura 24B mostra também os dados da variação de açúcares redutores nos rizóforos jovens, onde o conteúdo foi baixo em relação aos dados de frutose total e açúcar total, sendo que o valor mais elevado, de 20,10 mg. gps^{-1}, foi encontrado em rizóforos recém-formados aos 6 meses de cultivo. Em seguida houve uma diminuição gradual na concentração dos açúcares redutores atingindo o valor mínimo de 12,15 mg. gps^{-1}, aos 12 meses.

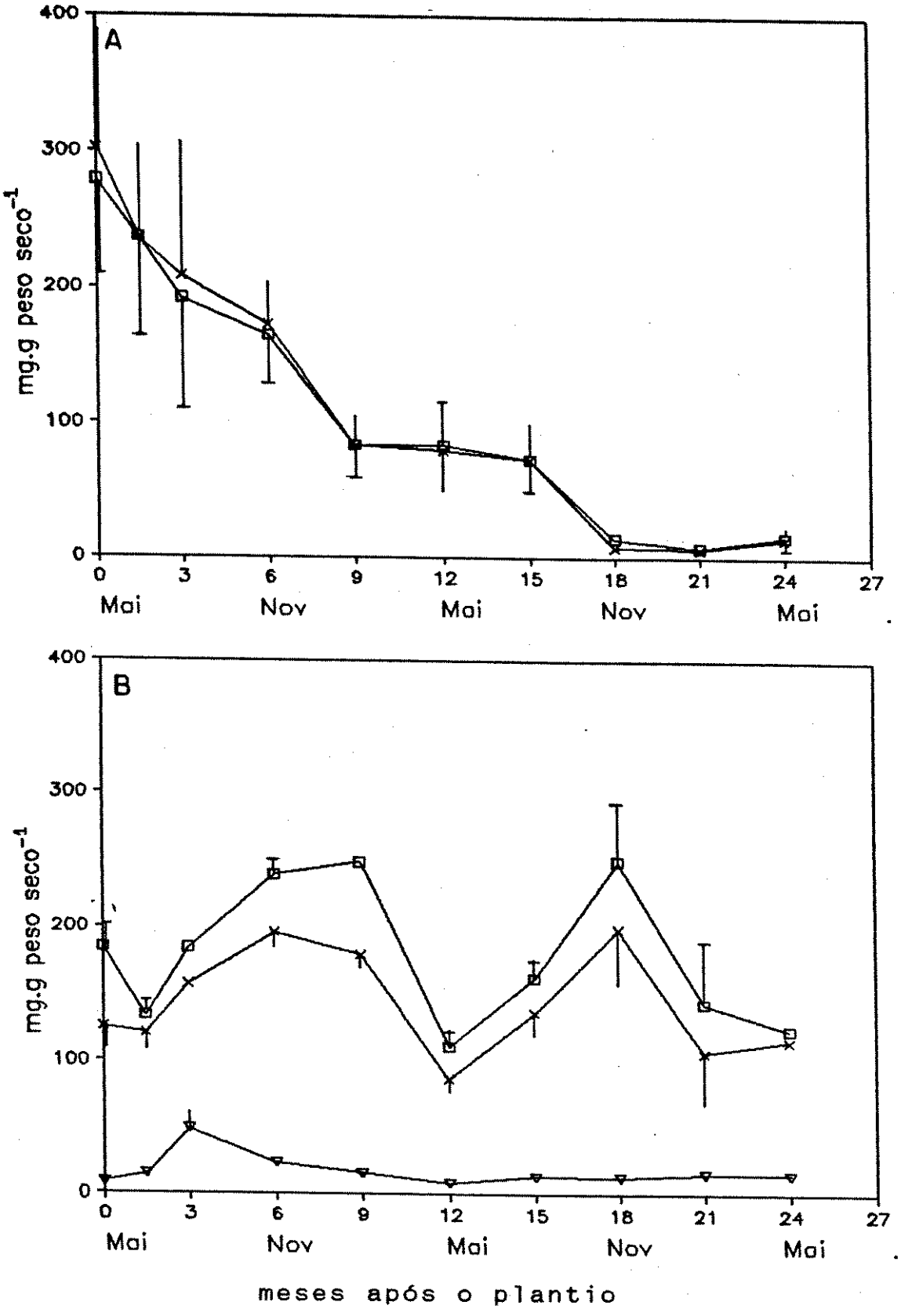


FIGURA 23 - Conteúdo de açúcar total (□), frutose total (x) e açúcar redutor (▽) nas frações de polifrutanos (A) e de oligofrutanos (B) em fragmentos iniciais de rizóforos, durante o crescimento de **Vernonia herbacea**. Barras verticais representam o erro padrão.

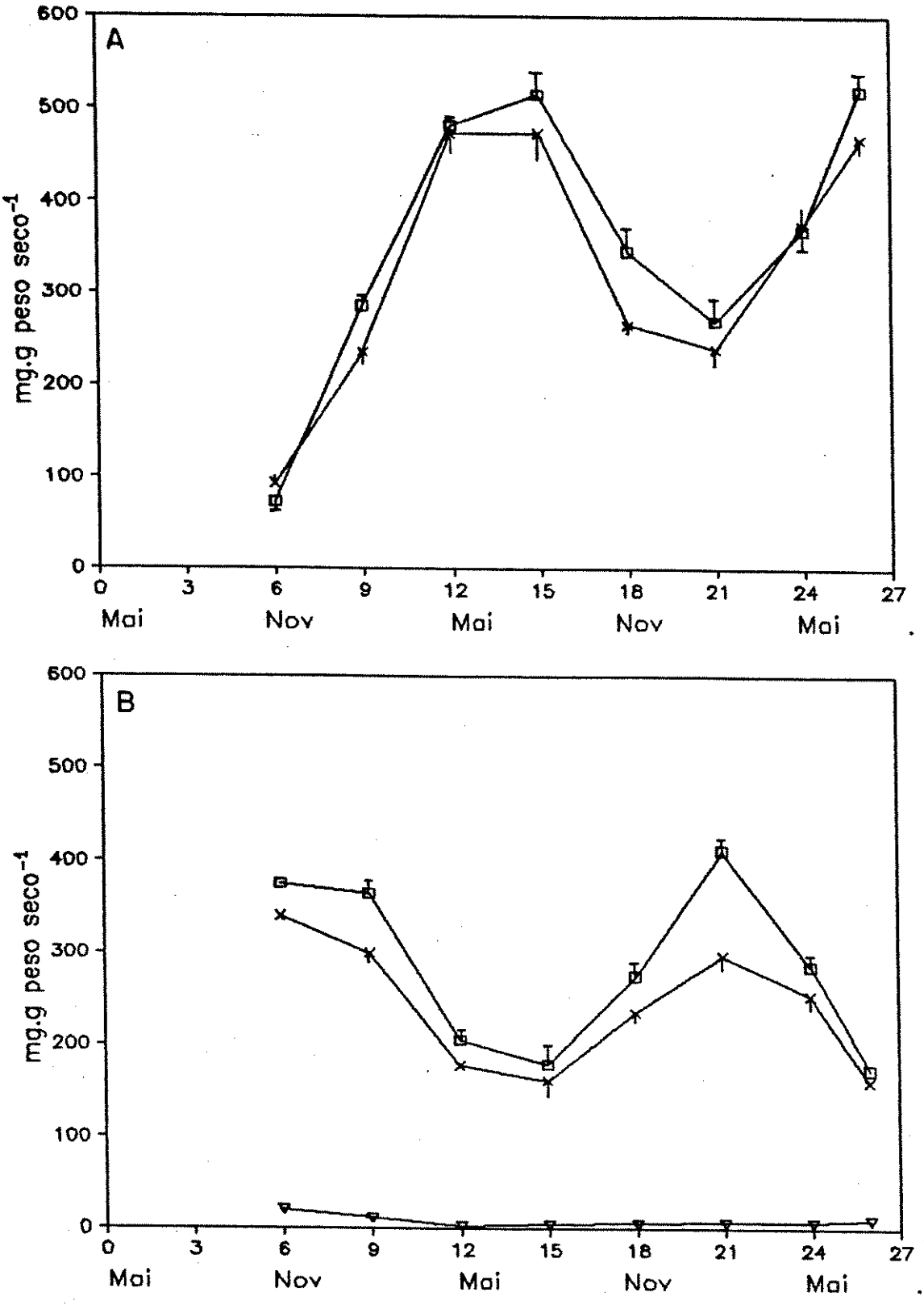


FIGURA 24 - Conteúdo de açúcar total (□), frutose total (x) e açúcar redutor (▽) nas frações de polifrutanos (A) e de oligofrutanos (B), em rizóforos jovens, durante o crescimento de **Vernonia herbacea**. Barras verticais representam o erro padrão.

2.2.2. Análises qualitativas

2.2.2.1. Oligofrutanos

A análise da fração de oligofrutanos, feita por cromatografia em camada delgada (Figura 25) , revelou a presença dos componentes da série homóloga de frutanos já apresentada na figura 11.

Todos os componentes da série foram encontrados, não apenas nos fragmentos iniciais como também nos rizóforos jovens, em todos os tempos analisados. Observou-se ainda, pela intensidade de coloração das manchas após revelação, que ocorreu uma variação nas proporções em que os componentes da série apareceram, nas fases estudadas.

2.2.2.2. Polifrutanos

O peso molecular (PM) médio e, consequentemente, o grau de polimerização (GP) das cadeias de frutanos presentes na fração de polissacarídeos (GP>16) dos fragmentos iniciais de rizóforos foram em geral maiores do que os encontrados para os frutanos de rizóforos jovens (Tabela 6).

Nos fragmentos iniciais, o PM médio no início do experimento foi de 6.615 (GP 41), caindo para 5.071 (GP 31) após 50 dias. Em novembro, 6 meses após o início do experimento, o PM médio foi 7.227 (GP 44), o mais elevado encontrado neste experimento. Embora o conteúdo total de frutanos tenha diminuído nesses tecidos durante a formação, o crescimento e o desenvolvimento da nova planta (Figura 23A), verificou-se que o PM médio das cadeias restantes de frutanos manteve-se praticamente inalterado.

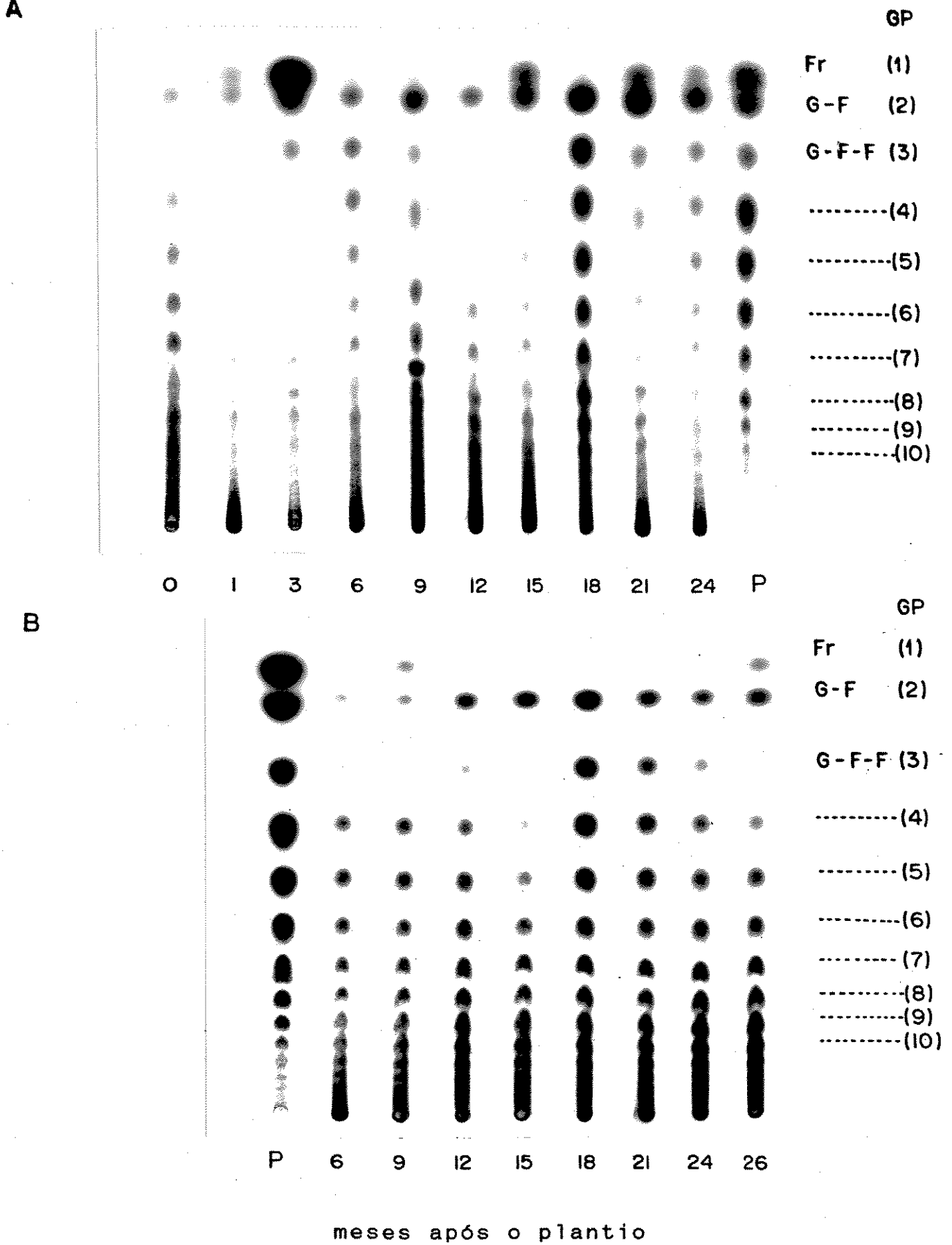


FIGURA 25 - Oligofrutanos presentes em fragmentos iniciais de rizóforos (A) e em rizóforos jovens (B) durante o crescimento de **Vernonia herbacea**. P-oligofrutanos de **Helianthus tuberosus**, Fr-frutose, G - F - sacarose, G - F - F - isocestose, GP - grau de polimerização.

TABELA 6. Variação nos pesos moleculares e graus de polimerização de polímeros de frutose presentes em fragmentos iniciais de rizóforos (A) e rizóforos jovens (B), durante o crescimento de Vernonia herbacea. Valores obtidos através de cromatografia por exclusão em biogel P-10.

A

meses após o plantio	peso molecular	grau de polimerização
0	6615	41
1	5071	31
3	5878	36
6	7227	45
9	5707	35
12	5707	35
15	5878	36
18	-	-
21	-	-
24	5541	34

B

meses após o plantio	peso molecular	grau de polimerização
6	4375	27
9	4642	29
12	4642	29
15	5878	36
18	5707	35
21	4781	30
24	4642	29
26	5223	32

A determinação do PM aos 18 e 21 meses não foi possível nesses tecidos pois a quantidade de material disponível nessas fases foi insuficiente para a realização das análises.

A tabela 6 apresenta ainda os dados de PM médio das cadeias de polifrutanos presentes nos rizóforos jovens. O maior valor de PM foi encontrado aos 15 meses, no final de dormência, sendo da ordem de 5.878 (GP 36), enquanto o menor (4.375 - GP 27) foi observado aos 6 meses, nos rizóforos recém-formados.

O aumento verificado no grau de polimerização aos 15 meses ocorreu quando a quantidade de polímeros de frutose nesses tecidos atingiu níveis elevados (Figura 24A). Por outro lado, uma diminuição no conteúdo destes compostos aos 21 meses (Figura 24A) foi acompanhada de uma redução no tamanho das cadeias (Tabela 6).

V. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O estudo dos compostos de reserva em vegetais superiores pode ser efetuado através da abordagem dos seguintes aspectos:

1) Análise de todos os componentes, do ponto de vista quantitativo e qualitativo, em um determinado momento da vida da planta, e

2) Acompanhamento das variações de um ou vários componentes durante um período da vida da planta.

Em ambos os casos o estudo pode ser efetuado sobre a planta inteira ou sobre um órgão da mesma, onde os compostos se acumulam. No presente trabalho optou-se pelo segundo procedimento, tomando-se como período o ciclo de vida anual da planta e elegendo-se, para estudo, o órgão subterrâneo (rizóforo) e seus principais compostos de reserva, os polímeros de frutose. Dentro dessa abordagem analisou-se o comportamento da planta, envolvendo aspectos do crescimento e desenvolvimento, e sua relação com as variações nos carboidratos de reserva durante a formação de novas plantas por propagação vegetativa, e em diferentes estádios fenológicos, que constituem a base para a compreensão da biologia e do metabolismo da planta.

1. Variação dos frutanos em rizóforos de plantas coletadas no cerrado, em diferentes estádios fenológicos

Os rizóforos de Vernonia herbacea são estruturas perenes que acumulam frutanos como principal carboidrato de reserva (FIGUEIREDO-RIBEIRO et al. 1986). Análises qualitativas mostraram

que os oligossacarídeos e os polissacarídeos presentes são derivados do trissacarídeo isocestose (Figura 11) e, portanto, semelhantes à série homóloga de frutanos encontrada em Helianthus tuberosus (EDELMAN & JEFFORD, 1968).

Análises quantitativas mostraram que os oligofrutanos e os polifrutanos presentes nestes órgãos variaram com a época do ano e com o estádio fenológico da planta, sugerindo a ocorrência de síntese, degradação e utilização diferencial dos mesmos durante o ciclo de vida da planta.

Desta forma, entre o início da brotação e a floração houve uma diminuição acentuada no conteúdo total de frutanos, o que indica sua utilização no crescimento dos novos ramos aéreos e no desenvolvimento das inflorescências. A diminuição no conteúdo de frutanos nesta fase coincidiu com uma queda no conteúdo de matéria seca (Figura 10 e Tabela 2) e não foi acompanhada por diminuição no tamanho médio das cadeias maiores de polifrutanos (Figura 12).

A manutenção do tamanho das cadeias de frutanos também foi observada em tubérculos de H. tuberosus mantidos a 20 °C, nos quais ocorreu perda de carboidratos, translocados para a formação do tubérculo-filho (JEFFORD & EDELMAN, 1963). Entretanto, em condições naturais, a diminuição no conteúdo total de carboidratos foi acompanhada por diminuição no GP das cadeias de frutanos na primavera, quando ocorre brotação da nova planta (JEFFORD & EDELMAN, 1961).

Acompanhando a diminuição no conteúdo total de frutanos ocorrida em V. herbacea entre a brotação e a floração, a sacarose e os oligofrutanos com GP > 3 também diminuiram na fase de

floração (Figura 11), enquanto o conteúdo de frutose livre aumentou, sendo este aumento detectado também através da determinação dos açúcares redutores (Figura 10A). Essas alterações indicam a ocorrência de hidrólise de frutanos e consequente liberação de frutose, sugerindo a existência da enzima FEH nos órgãos estudados.

O aumento dos açúcares redutores, entretanto, não foi tão acentuado quanto a diminuição ocorrida no conteúdo total de frutanos, evidenciando a translocação dos açúcares liberados para a parte aérea da planta e/ou a sua utilização no metabolismo energético do próprio órgão. Segundo FREHNER et al. (1984) a utilização dos açúcares se dá através do transporte da frutose do vacúolo para o citoplasma onde esta é rapidamente reutilizada na síntese de sacarose. Esta última é finalmente transportada para a parte aérea que constitui um forte dreno metabólico na fase de brotação e floração.

De acordo com o modelo de compartimentação do metabolismo de frutanos proposto por FREHNER et al. (1984), as três enzimas envolvidas estão localizadas no vacúolo. Neste caso as duas enzimas-chaves - SST e FEH - de ações opostas, necessitam de um mecanismo eficiente de regulação, uma vez que se encontram localizadas no mesmo compartimento celular. SCOTT (1968) e mais tarde FREHNER et al. (1984), trabalhando com o metabolismo de inulina em tubérculos de H. tuberosus, verificaram que a SST e a FEH não apresentam atividade simultânea. A atividade da SST, elevada no período de desenvolvimento do tubérculo, desaparece quando este para de crescer; a partir daí ocorre um aumento na

atividade da FEH. Por outro lado, enquanto a SST necessita de uma concentração de sacarose elevada para iniciar a síntese de frutanos, a FEH é inibida por este dissacarídeo (EDELMAN & JEFFORD, 1964).

Embora estudos enzimáticos não tenham sido realizados nos rizóforos de V. herbacea, um mecanismo de regulação semelhante pode estar atuando nesses tecidos, pois entre as fases de brotação e floração, por exemplo, quando houve indicação de hidrólise de frutanos, o conteúdo de sacarose diminuiu (Fig. 11), o que pode ter favorecido a atividade da FEH.

Segundo ZIMMERMAN & BROWN (1974) a retomada do crescimento vegetal que normalmente segue ao período de repouso é, geralmente, caracterizada por mobilização do material de reserva. Em raízes de Taraxacum officinale (RUTHERFORD & DEACON, 1974), assim como em tubérculos de H. tuberosus (JEFFORD & EDELMAN, 1961), o conteúdo de frutanos com GP elevado diminuiu consideravelmente na primavera enquanto os conteúdos de oligofrutanos e açúcares redutores aumentaram. Segundo os autores, as alterações nas frações de frutanos representam a despolimerização e mobilização dos carboidratos de reserva das raízes e tubérculos por ação da FEH, provendo nutrientes para o crescimento dos ramos aéreos e para a floração.

Em rizóforos de V. herbacea sob condições naturais de cerrado, o mecanismo de despolimerização parece diferir em parte do modelo acima citado , no que se refere à variação nas concentrações relativas de oligofrutanos e polifrutanos, visto que ambas frações de frutanos sofreram decréscimo na fase de floração (Figura 10).

Após a floração e durante todo o verão, com o crecimento intenso da parte aérea e atividade fotossintética elevada, os níveis de frutanos de ambas frações estudadas aumentaram significativamente (Figura 10). Nesta fase verificou-se também um aumento marcante no GP médio dos frutanos de cadeias maiores (Figura 12) e na porcentagem de matéria seca (Tabela 2). Esses resultados são semelhantes ao que foi descrito no final de verão e início de outono para tubérculos de H. tuberosus em desenvolvimento (EDELMAN & JEFFORD, 1968) e raízes de Taraxacum officinale (RUTHERFORD & DEACON, 1974).

É sabido que as condições ambientais exercem efeitos sobre a acumulação de frutanos. Estudos revistos por ARCHBOLD (1940 in PONTIS & del CAMPILLO, 1985) e SMITH (1973) mostraram que a acumulação desses compostos é aumentada por tratamentos que reduzem o crescimento da planta tais como falta de nutrientes, exposição a baixas temperaturas, estresse hídrico ou excisão de órgãos competitivos e que, consequentemente, diminuem as necessidades da planta por compostos assimilados. Tratamentos que aumentam a fixação do carbono pela fotossíntese como, por exemplo, alta irradiância ou fotoperíodos longos, também levam a uma maior acumulação e formação de polímeros maiores (SMITH, 1968).

Estes dados estão de acordo com o que foi verificado para V. herbacea uma vez que o aumento no conteúdo de frutanos e no GP de polifrutanos ocorridos após a floração coincidiu com o período de verão quando a irradiância e o fotoperíodo são maiores.

Neste período, marcado por intenso crescimento da parte

aérea (Figura 16), a eficiência fotossintética desta planta pareceu ser elevada. Os produtos assimilados não apenas supriram a demanda metabólica causada pelo crescimento, como ainda o excedente foi transportado para os órgãos subterrâneos, repondo desta forma as reservas que haviam sido utilizadas desde o início da brotação até a floração.

Após o verão houve uma parada no crescimento dos ramos aéreos embora os rizóforos continuassem a crescer, de acordo com o que foi verificado em plantas cultivadas em canteiros (Figura 16) e observado em plantas crescendo em condições naturais de cerrado. Nessas últimas ocorreu uma diminuição no conteúdo de frutanos no início da dormência, com decréscimo do GP dos frutanos de cadeias maiores (Figura 12). Na fração de oligofrutanos o decréscimo foi menos intenso do que na fração dos polifrutanos e aparentemente ocorreu pela diminuição dos açúcares redutores (Figura 10A), especialmente da frutose (Figura 11).

Na fase de dormência das plantas, verificaram-se novamente, aumentos nos conteúdos de matéria seca (Tabela 2), oligofrutanos e de polifrutanos (Figura 10) mas o GP médio dos polímeros manteve-se semelhante ao encontrado no início de dormência (Figura 12). A proporção de oligofrutanos com GP > 4 também aumentou, principalmente quando comparado ao observado nas fases de floração e estádio vegetativo (Figura 11). É provável que nesta fase, o GP médio dos polímeros não aumente e, portanto não acompanhe o aumento no conteúdo total de frutanos, devido à ação da enzima FFT, que, neste caso atuaria transferindo resíduos de frutose para cadeias menores, não favorecendo aqui o alongamento da cadeia que foi verificado no final do verão.

Durante o período de dormência das plantas, que corresponde ao inverno, há, no cerrado de Moji-Guaçú, uma diminuição nas temperaturas médias e na precipitação pluviométrica, com consequente diminuição da quantidade de água no solo, embora não ocorra deficiência hídrica todos os anos (DE VUONO et al. 1986).

Segundo MANTOVANI (1988), para muitas espécies geófitas e hemicriptófitas - como é o caso de V. herbacea - ocorrem estresses hídricos todos os anos, devido à profundidade do lençol freático e ao não desenvolvimento de sistemas subterrâneos muito profundos por essas plantas. O fotoperíodo diário também atinge valores mínimos nessa época.

Portanto, as condições ambientais prevalescentes na região nessa época do ano, associadas à parada de crescimento dos ramos aéreos das plantas e consequente diminuição das necessidades de fotoassimilados num período imediatamente anterior à senescência, além da translocação de compostos da parte aérea para os rizóforos, devem ter favorecido a acumulação dos frutanos nesta fase, conforme mostrado por ARCHBOLD (1940 in PONTIS & del CAMPILLO, 1985), SMITH (1968), WHITE (1973) e POLLOCK (1984). Segundo HENDRY & BROCKLEBANK (dados não publicados, in HENDRY 1987), o fenômeno da acumulação de frutanos durante o inverno é comum em espécies de Asteraceae de clima temperado. O mesmo deve ocorrer em espécies de climas tropicais, uma vez que fenômeno semelhante foi observado em Viguiera discolor, outra espécie de Asteraceae do cerrado que também acumula frutanos nas raízes tuberosas (Isejima, 1989).

Com o final da dormência e o início da brotação dos novos

ramos na primavera, o conteúdo de frutanos voltou a diminuir (Figura 10), como era de se esperar, de acordo com o que já foi mencionado anteriormente sobre a utilização de compostos de reserva nesta fase de desenvolvimento.

O baixo conteúdo de amido nos rizóforos em todos os estádios fenológicos estudados, sugere não ser este um composto de reserva importante nos órgãos subterrâneos desta espécie, pois mesmo no final de verão, quando sua concentração foi aumentada, o conteúdo total foi ainda baixo em relação ao conteúdo de frutanos (Tabela 3).

Em certas espécies acumuladoras de frutanos, do gênero Allium, por exemplo, o amido é totalmente ausente (BELVAL, 1939 in MEIER & REID, 1982). No entanto em outras o amido e o frutano podem ser encontrados no mesmo tecido, como é o caso de Symphytum officinale (STAESCHE, 1966 in EDELMAN & JEFFORD, 1968) ou em partes diferentes da planta, como em Helianthus tuberosus, onde os tubérculos contêm frutanos e as folhas, amido.

Em V. herbacea, frutanos com baixo peso molecular foram encontrados em folhas mas não em caules (dados não apresentados). O conteúdo de amido, no entanto, não foi determinado nesses tecidos, embora seja conhecido o fato deste composto ser sintetizado e armazenado nos cloroplastos. Portanto, no que se refere à distribuição dos carboidratos de reserva, esta espécie se assemelharia mais à Symphytum officinale, uma vez que em V. herbacea, frutanos e amido foram detectados nos rizóforos (Tabelas 2 e 3) e provavelmente ocorram juntos também nas folhas.

2. Brotação de fragmentos de rizóforos retirados de plantas em diferentes estádios fenológicos.

Os rizóforos de V. herbacea apresentam uma grande quantidade de gemas distribuidas por toda a sua superfície. Com a fragmentação dos mesmos, a dormência das gemas é quebrada de modo a permitir o crescimento do ramo aéreo. Em geral, verifica-se o desenvolvimento de uma ou no máximo duas gemas em cada fragmento (Figura 13).

A propagação vegetativa desta espécie por brotação de fragmentos de rizóforo parece ocorrer independentemente do conteúdo inicial de frutanos ali encontrado, uma vez que esta técnica foi eficaz em todos os estádios fenológicos analisados (Figura 14).

Entretanto, nas fases de brotação e floração das plantas, o tempo médio e a porcentagem de brotação dos fragmentos foram maiores.

Vários autores já demonstraram que a dormência das gemas é induzida em muitas espécies pela diminuição gradual da temperatura e/ou pelo encurtamento do dia, fenômenos que ocorrem naturalmente no outono (GALSTON & DAVIES, 1972; LEOPOLD & KRIEDEMAN, 1975; SALISBURY & ROSS, 1978). Segundo VALIO (1979), a dormência é um mecanismo de adaptação a condições de falta de água ou de temperaturas desfavoráveis.

MANTOVANI (1988) verificou que a grande maioria das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú brotaram após um período variável de dormência. Segundo este autor, a brotação da maioria das espécies ocorreu entre setembro e outubro, quando se

verificam aumentos na precipitação, na temperatura e na umidade relativa na região (DE VUONO et al., 1986). Este período coincide ainda com o aumento do fotoperíodo diário.

Portanto, em rizóforos de V. herbacea é possível que a diferença no tempo médio e na porcentagem de brotação encontrados nos diferentes estádios fenológicos tenha ocorrido, pelo menos em parte, devido às condições fisiológicas das próprias gemas, induzidas pelas condições ambientais. Neste caso, estas apresentavam-se naturalmente em período de brotação entre os meses de setembro e novembro (brotação e floração, respectivamente) quando o tempo médio e a porcentagem de brotação foram maiores (Figura 14).

Nas demais fases analisadas (estádio vegetativo, início de dormência e dormência), as gemas estando dormentes, necessitaram um tempo maior para a quebra da dormência e início da brotação.

3. Variação dos frutanos durante o crescimento de novas plantas

Os fragmentos de rizóforos utilizados neste experimento foram retirados de plantas em início de dormência. Como nesta fase é necessário um tempo maior para o início da brotação das gemas, procurou-se ampliar a possibilidade de se detectar maiores alterações metabólicas no início do período estudado.

A brotação dos fragmentos iniciais de rizóforos, que deram origem às novas plantas, teve início aproximadamente 50 dias após o plantio.

As plantas assim obtidas apresentaram estádios de desenvolvimento bem definidos durante o período de 26 meses. Após

a brotação inicial ocorreu crescimento vegetativo intenso, principalmente dos 3 aos 9 meses, marcado pelo aumento em altura do maior ramo, do número de folhas e área foliar e dos pesos fresco e seco da parte aérea (Tabela 4, Figuras 16 e 17).

Neste primeiro ciclo não ocorreu floração, provavelmente porque em setembro - época do início da floração nesta espécie - as plantas encontravam-se ainda numa etapa inicial de desenvolvimento.

O termo juvenilidade é utilizado para indicar uma fase inicial do crescimento de plântulas em que a indução de floração não ocorre (VINCE-PRUE, 1975). É possível que plantas novas de V. herbacea, embora não originadas de sementes, apresentem um tipo de limitação para a floração semelhante à fase de juvenilidade. Neste caso, a limitação seria provavelmente mais em função do grau de desenvolvimento e maturidade do órgão subterrâneo ou da planta como um todo, do que da parte aérea apenas, uma vez que após a brotação, no 2º ciclo, as plantas floresceram enquanto possuiam ramos aéreos jovens.

Doze meses após o plantio dos fragmentos, a parte aérea entrou em senescência, ocorrendo, subsequentemente, a entrada da planta em dormência, caracterizada nesta espécie pela perda total dos ramos aéreos.

A perda da parte aérea em V. herbacea ocorreu na mesma época, em plantas crescendo naturalmente na região de cerrado de Moji-Guaçú e em plantas cultivadas nos canteiro, com irrigação, em São Paulo. Esta semelhança no comportamento fenológico sugere que a senescência da parte aérea e a entrada da planta em

dormência não sejam uma resposta direta ao estresse hídrico nesta espécie e sim à diminuição gradual da temperatura e/ou encurtamento do dia (GALSTON & DAVIES, 1972; SALISBURY & ROSS, 1978), que ocorrem tanto para as plantas mantidas no cerrado como nos canteiros irrigados.

No que se refere à entrada em dormência , os dados obtidos com V. herbacea estão de acordo com o que foi observado em outras espécies do cerrado possuidoras de órgãos subterrâneos de reserva como Ocimum nudicaule (FIGUEIREDO-RIBEIRO & DIETRICH, 1981) e Cochlospermum regium (CARVALHO, 1986), nas quais este fenômeno tem início simultaneamente em plantas crescendo naturalmente no cerrado e em plantas cultivadas em canteiros com irrigação.

O final da dormência foi marcado pela brotação de novos ramos, ao final do inverno e coincidiu com o aumento gradual do comprimento do dia e elevação da temperatura. Mais uma vez este comportamento foi observado na mesma época em ambos os grupos de plantas - no cerrado e nos canteiros do Instituto de Botânica.

Os parâmetros de crescimento dos ramos aéreos medidos neste segundo ciclo de desenvolvimento atingiram valores maiores do que no primeiro (Figura 16), exceto no que diz respeito à altura do maior ramo. Isto foi devido, provavelmente, ao fato de um maior número de ramos ter se desenvolvido neste segundo ciclo.

Com as plantas já melhor estabelecidas nesta fase, a floração foi intensa e ocorreu na época prevista (setembro-outubro), ou seja, logo após o início da brotação. O crescimento vegetativo continuou até o final do verão, aos 21 meses, após o que se verificou uma diminuição de peso da parte aérea, do número de folhas e da área foliar, sugerindo a entrada dos ramos aéreos

em senescência.

Com relação ao sistema subterrâneo (Figura 18), o aumento de peso dos rizóforos ocorreu devido ao crescimento de rizóforos jovens que se originaram a partir do desenvolvimento de gemas existentes no fragmento inicial do rizóforo. Estas observações revelam informações semelhantes ao que ocorre com os rizóforos de 3 espécies de Vernonia estudadas por SAJO e MENEZES (1986b). Segundo as autoras, quando estas estruturas foram mantidas fora do solo, em presença de luz e até sem suprimento hídrico, ocorreu o desenvolvimento de ramos aéreos, com folhas, a partir de gemas que, em condições naturais (ausência de luz e no solo) originariam ramificações subterrâneas (rizóforos).

Em V. herbacea, o rizóforo jovem assim originado passou a constituir o novo sistema subterrâneo onde os compostos de reserva foram sendo acumulados (Figura 24). Sua formação teve início depois do 3º mês, de modo que 6 meses após o plantio dos fragmentos suas dimensões eram mensuráveis pelos procedimentos utilizados nesse estudo (Tabela 4B e Figuras 18 e 19). A parte subterrênea apresentou crescimento inicial acelerado que coincidiu com a fase de crescimento intenso da parte aérea durante o verão, continuando a aumentar em peso mesmo quando o crescimento desta havia cessado, entre 9 e 12 meses, no primeiro ciclo de desenvolvimento.

Entre maio e novembro (aos 12 e 18 meses do experimento), período correspondente ao final de outono, inverno e primavera, houve uma parada no crescimento dos rizóforos jovens - registrado através da variação no seu peso seco (Figuras 18 e 19). O

crescimento foi retomado somente após a floração das plantas, e coincidiu com o desenvolvimento intenso da parte aérea durante o verão.

No 2º ciclo de crescimento, entretanto, o aumento do peso seco dos rizóforos continuou mesmo após a parada de crescimento da parte aérea e até a entrada da planta em dormência, aos 26 meses, sugerindo uma maior disponibilidade, em relação ao 1º ciclo, de produtos fotoassimilados, translocados para os órgãos subterrâneos da planta. Isto também pode ser inferido pelos valores da RAF obtidos nesta fase, os quais foram menores do que no 1º ciclo (Figura 21). A razão da área foliar reflete a relação entre o sistema assimilador e o peso seco da planta. Valores menores mostram, indiretamente, um aumento no sistema subterrâneo das plantas em relação à parte aérea. Taxas de assimilação líquida maiores no 2º ciclo (Figura 20) indicam maior eficiência fotossintética destas plantas nesse período e corroboram os resultados obtidos com relação à RAF.

O aumento em peso seco dos rizóforos jovens foi acompanhado até o 12º mês pelo aumento no conteúdo de polifrutanos, que se manteve elevado e constante entre o início de dormência e dormência propriamente dita, diminuindo significativamente durante a brotação e floração. A retomada de crescimento dos rizóforos após os 18 meses foi outra vez seguida de aumento no conteúdo de polifrutanos após 21 meses.

Desta forma verificou-se novamente, assim como nas plantas crescendo naturalmente no cerrado, conteúdo elevado de polifrutanos na fase de dormência e baixo nas fases de brotação e floração das plantas, evidenciando, nesta última, a ocorrência de

despolimerização destes compostos para utilização numa fase em que a parte aérea atua como forte dreno metabólico na planta.

O conteúdo de oligofrutanos nos rizóforos jovens, por sua vez, variou de forma contrária aos polifrutanos, demonstrando a interconversão desses compostos durante o ciclo de desenvolvimento das plantas, como demonstrado por JEFFORD & EDELMAN (1963) e BACON & LOXLEY (1952), em tubérculos de H. tuberosus.

Estes resultados não estão de acordo com o que foi observado em plantas crescendo no cerrado, uma vez que nestas, a variação encontrada nos oligofrutanos acompanhou, embora não de forma tão acentuada, a variação nos polifrutanos. Isto provavelmente ocorreu devido a diferenças no trato cultural, já que no cerrado as plantas estão sujeitas a limitações nutricionais (MALAVOLTA, 1980) e hídricas (MANTOVANI, 1988), diferentemente das plantas cultivadas nos canteiros.

De qualquer modo, tanto as plantas no cerrado como as cultivadas nos canteiros, em São Paulo, sofreram variações significativas no conteúdo total de frutanos (Tabelas 2 e 5), durante o período estudado, sendo que esta variação ocorreu principalmente em função da variação nos polifrutanos.

Os resultados obtidos sugerem, portanto, que durante o ciclo de desenvolvimento ocorre síntese, despolimerização e utilização diferencial de frutanos em rizóforos de V. herbacea, podendo estes compostos ser considerados como reserva nesta espécie.

Com relação aos oligofrutanos presentes nos fragmentos iniciais de rizóforos verificou-se uma flutuação no seu conteúdo

ao longo do período estudado parecendo refletir uma utilização maior ou menor destes compostos pela parte aérea ou mesmo pelo novo sistema subterrâneo formado, que variou com a fase de desenvolvimento da planta (Figura 23). Neste caso, essa região do sistema subterrâneo estaria atuando principalmente como caule, sem função armazenadora de reservas. Através deste os produtos fotoassimilados seriam transportados da parte aérea para o novo sistema subterrâneo em épocas em que a síntese sobrepusesse a utilização e no sentido inverso, em ocasiões em que a parte aérea funcionasse como dreno metabólico, como por exemplo durante crescimento vegetativo intenso e floração.

A variação dos oligofrutanos nestes tecidos se refletiu também através da análise qualitativa (Figura 25), que revelou a presença de todos os componentes da série homóloga ao longo do período de estudo. Um aumento no conteúdo de açúcares totais 3 meses após o plantio dos fragmentos foi devido, principalmente, a um aumento na frutose livre nesta mesma época, ocorrido provavelmente, através da despolimerização de cadeias de frutanos em uma fase de grande utilização destes compostos pela parte aérea em brotação e para a formação dos rizóforos jovens.

É interessante notar que as curvas de crescimento da parte aérea (Figura 16), que demonstraram a ocorrência de 2 ciclos de desenvolvimento durante o período em que as plantas foram analisadas, apresentaram perfis semelhantes ao das variações dos oligofrutanos nos rizóforos novos e rizóforos iniciais (embora nesses últimos tenha ocorrido um pequeno adiantamento em relação aos primeiros) (Figuras 23B e 24B), e opostos às variações dos conteúdos de polifrutanos de rizóforos novos (Figura 24A).

Portanto, fases de crescimento intenso da parte aérea coincidiram com fases de maior disponibilidade de oligofrutanos nos rizóforos de V. herbacea e foram seguidas por fases de maior crescimento da parte subterrânea (Figura 19) e de aumentos significativos no conteúdo de polifrutanos nos rizóforos jovens (Figura 24A).

Os fragmentos iniciais de rizóforos tiveram o seu conteúdo de polifrutanos reduzido ao longo dos 26 meses, mostrando que estes compostos foram sendo utilizados não apenas no 1º período de brotação mas durante todo o período estudado. Este resultado mostra ainda que a ocorrência de frutanos nos rizóforos de V. herbacea é de grande importância na propagação e no estabelecimento de novas plantas, como foi também verificado para outras espécies (EDELMAN & JEFFORD, 1963).

Durante a brotação dos ramos aéreos e posterior desenvolvimento de uma nova planta, com o sistema subterrâneo regenerado, o conteúdo de resíduo encontrado nos rizóforos iniciais aumentou e foi em geral maior do que nos rizóforos jovens (Tabela 5). O conteúdo de matéria seca, por outro lado, foi maior nos rizóforos jovens.

Estes resultados, juntamente com os resultados das análises quantitativas dos frutanos em ambos os tecidos, mostraram que os rizóforos iniciais passaram a apresentar características comumente encontradas em caules subterrâneos sem função específica de órgãos de reserva. Esta passou a ser realizada pelos rizóforos jovens que constituem o novo sistema subterrâneo da planta, assim como os rizóforos iniciais passaram a atuar

apenas como estrutura caulinar, como mencionado anteriormente.

Assim como havia sido observado nas plantas coletadas no cerrado, naquelas cultivadas nos canteiros, em São Paulo, grandes alterações no conteúdo de polifrutanos nos rizóforos iniciais e nos rizóforos jovens acarretaram pequenas alterações no GP médio das cadeias, aparentemente sem muita relação com o estádio fenológico (Tabela 6). No cerrado, um grande aumento no GP das cadeias foi característico apenas de um estádio fenológico bem definido (vegetativo) e, em plantas cultivadas em canteiros, o aumento no GP dessas cadeias foi verificado nos rizóforos em formação (entre 6 e 15 meses), acompanhando em ambos os casos um aumento significativo no conteúdo de frutanos verificado nestas fases. Pode-se supor, desta forma, que a enzima FEH, se presente nos rizóforos de V. herbacea, atue uniformemente nas cadeias com diferentes tamanhos de modo que o GP médio sofra alterações muito pequenas, praticamente sem mudanças no perfil da distribuição das moléculas de diferentes tamanhos. Além disso, a FFT pode estar atuando concomitantemente na recomposição dessa distribuição.

Mecanismo semelhante poderia ocorrer também em tubérculos de H. tuberosus estocados a 20 °C (JEFFORD & EDELMAN, 1963), e explicaria a não diminuição do GP das cadeias de frutanos ali acumulados, mesmo após a diminuição no conteúdo líquido desses compostos, ocorrida devido à translocação dos mesmos para o tubérculo-filho.

VI. RESUMO

Vernonia herbacea é uma espécie de Asteraceae, herbacea perene, nativa do cerrado, que apresenta um órgão subterrâneo denominado rizóforo, que atua como órgão de reserva, chegando a armazenar até 80% do seu peso seco em frutanos, além de possibilitar a propagação vegetativa da espécie.

Variações no conteúdo e na composição dos frutanos foram estudadas em plantas de V. herbacea em diferentes estádios fenológicos. Os frutanos encontram-se distribuidos em uma série homóloga, cujos componentes sofrem variações nas diferentes épocas. Um aumento de frutose na floração evidenciou a ocorrência de despolimerização das cadeias de frutanos. Entre a brotação e a floração ocorreu também uma diminuição marcante no conteúdo total de frutanos, sugerindo sua translocação para a parte aérea que se encontrava em crescimento intenso.

Os níveis desses compostos foram restabelecidos durante o verão quando as condições ambientais favoreceram o seu acúmulo e o aumento no GP das moléculas presentes na fração de polifrutanos.

O período de dormência nestas plantas, que coincide com o inverno, também foi marcado por um aumento significativo no conteúdo de frutanos, embora não tenha sido acompanhado, neste caso, de aumento no GP médio dos polifrutanos. Estas alterações parecem ser favorecidas pela diminuição da temperatura e da precipitação pluviométrica que ocorrem na região do cerrado durante o inverno, aliadas a uma parada de crescimento das

plantas e subsequente entrada das mesmas em senescência.

Amido também foi encontrado nos rizóforos, embora em concentrações baixas, em todos os estádios fenológicos estudados.

A propagação vegetativa desta espécie, obtida por brotação do rizóforo, ocorre independentemente do conteúdo inicial de frutanos nesses tecidos. A velocidade e a porcentagem de brotação foram maiores nas fases de brotação e floração, provavelmente devido às condições fisiológicas das gemas, naturalmente induzidas à brotação pelas condições ambientais prevalescentes neste período, em oposição ao encontrado nas demais fases analisadas.

Variações no conteúdo e na composição de frutanos foram verificadas também durante o crescimento de novas plantas, em fragmentos iniciais de rizóforos e nas novas ramificações deste órgão, formadas durante esse período. Essas plantas que foram cultivadas em canteiros do Instituto de Botânica, em São Paulo, passaram por 2 ciclos de crescimento durante o período de 26 meses, tendo apresentado estádios de desenvolvimento bem definidos e sincronizados com o observado em plantas crescendo naturalmente no cerrado.

Nos fragmentos iniciais de rizóforos ocorreu uma diminuição marcante no conteúdo de polifrutanos ao longo do período analisado, demonstrando a intensa utilização destes compostos durante o desenvolvimento de novas plantas. Estes fragmentos, a partir dos quais os ramos aéreos e subterrâneos (rizóforos jovens) são formados, parecem assumir nestas condições o papel de caule, sem função armazenadora de compostos de reserva. Através destes, portanto, os produtos fotoassimilados são transportados

para o sistema subterrâneo em crescimento e em ocasiões nas quais a parte aérea atua como região de dreno metabólico (brotação e floração), uma parte dos compostos armazenados nos rizóforos é hidrolizada e translocada no sentido inverso.

Os rizóforos novos apresentaram um conteúdo inicial baixo de polifrutanos, demonstrando estar este órgão em fase de formação, atingindo valores elevados durante a fase de dormência das plantas, e baixos durante a brotação e a floração. Essas variações foram semelhantes às observadas em plantas coletadas no cerrado.

As variações nos conteúdos de oligofrutanos observadas nos rizóforos jovens ocorreram no sentido inverso ao dos polifrutanos e mostraram que uma maior disponibilidade dos oligofrutanos coincidiu com fases de crescimento intenso da parte aérea, sendo seguidas de fases de maior crescimento do órgão subterrâneo.

As variações no GP médio das cadeias de polifrutanos não acompanharam as variações nos níveis desses compostos, exceto em plantas crescendo naturalmente no cerrado no final do verão (estádio vegetativo) e em rizóforos jovens em fase de formação e acúmulo de frutanos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, P. 1965. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96:595.

ASPINALL, G.O. & DAS GUPTA, P.C. 1959. The structure of the fructosan from Agave vera-cruz Mill. J. Chem. Soc. 718-722.

BACON, J.S.D. 1959. The trisaccharide fraction of some monocotyledons. Biochem. Soc. 73:507-514.

BACON, J.S.D. & BELL, D.J. 1953. A new trisaccharide produced from sucrose by mold invertase. J. Chem. Soc. 2528-2530.

BACON, J.S.D. & LOXLEY, R. 1952. Seasonal changes in the carbohydrates of the Jerusalem artichoke tuber. Biochem. J. 51:208-213.

BELL, D.J. & PALMER, A. 1952. Structural studies on inulin from Inula helenium and on levans from Dactylis glomerata and Lolium italicum. J. Chem. Soc. 3763-3770.

BHATIA, I.S. & SRINIVASAN, M. 1953. Polyfructosan from Furcroea gigantea. Curr. Sci. 22:236-237.

CAIRNS, A.J. & POLLOCK, C.J. 1988. Fructan biosynthesis in excised leaves of Lolium temulentum L. I. Chromatographic characterization of oligofructans and their labelling patterns following $^{14}CO_2$ feeding. New Phytol. 109:399-405.

CARVALHO, C. G. de S. 1986. Variações nos carboidratos e enzimas em órgãos subterrâneos de Cochlospermum regium (Mart. e Schr.) Pilger em desenvolvimento. Tese de doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 160p.

CORNER, E.J.H. 1964. The life of plants. Weidenfeld & Nicholson, London.

DARBYSHIRE, B. & HENRY, R.J. 1978. The distribution of fructans in onions. New Phytol. 81:29-34.

DE VUONO, Y.S., BATISTA, E.A. & FUNARI, F.L. 1986. Balanço hídrico na área da Reserva Biológica de Mogi-Guaçú, São Paulo - Brasil. Hoehnea 13:73-85.

DEONDER, R. 1972. Role and mechanisms of transglycosylation reactions. In Biochemistry of the Glycosidic Linkage (R. Piras & H.G. Pontis, eds.). Academic Press, New York, p. 21-78.

DICKERSON, A.G. & EDELMAN. J. 1966. The metabolism of fructose polymers in plants. VI. Transfructosylation in living tissue

of Helianthus tuberosus L. J. Exp. Bot. 17:612-619.

DIETRICH, S.M.C. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 1985. Organos subterraneos y propagacion vegetativa en plantas de los cerrados brasileros. Medio ambiente 7:45-52.

DUBOIS, N., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K. KEBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 28:350-356.

EAGLES, C.F. 1967. Variation in the soluble carbohydrate content of climate races of Dactylis glomerata (cocksfoot) at different temperatures. Ann. Bot. 31:645-651.

EDELMAN J. & DICKERSON, A.G. 1966. The metabolism of fructose polymers in plants. Transfructosylation in tubers of Helianthus tuberosus L. Biochem. J. 98:787-794.

EDELMAN, J. & JEFFORD, T.G. 1964. The metabolism of fructose polymers in plants. 4. B-fructofuranosidases of tubers of Helianthus tuberosus L. Biochem. J. 93:148-161.

EDELMAN, J. & JEFFORD, T.G. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in Helianthus tuberosus. New Phytol. 67:517-531.

EDELMAN, J. & POPOV, K. 1962. Metabolism of $^{14}CO_2$ by iluminated shoot of Helianthus tuberosus L. with special reference to fructose polymers. C.r. Acad. bulg. Sci. 15:179.

ESCALADA, J.A. & MOSS, D.N. 1976. Changes in non-structural carbohydrate fractions of developing spring wheat kernels. Crop Sci. 16:627-631.

FERRI, M.G. 1944. Transpiração de plantas permanentes do cerrado. Bolm. Fac. Fil Ciênc. Univ. S. Paulo 51 (Botânica) 4:161-224.

FLEMING, S.E. & GROOTWASSINK, J.W.D. 1979. Preparation of high-fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 12:1-28.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 1980. Variações fisiológicas e metabólicas no xilopódio de Ocimum nudicaule Benth., em diferentes estádios fisiológicos. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 193p.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. & DIETRICH, S.M.C. 1981. Variações estacionais nos compostos de reserva e no metabolismo do xilopódio de Ocimum nudicaule Benth. var. anisifolia Giul. (Labiatae). Revta brasil. Bot. 4:73-82.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L., DIETRICH, S.M.C., CHU, E.P., CARVALHO, M.A.M., VIEIRA, C.C.J. & GRAZIANO, T.T. 1986. Reserve carbohydrates in underground organs of native

Brazilian plants. Revta brasil. Bot. 9:159-166.

FREHNER, M., KELLER, F. & WIENKEN, A. 1984. Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (Helianthus tuberosus L.). J. Plant Physiol. 116:197-208.

GALSTON, A.W. & DAVIES, P.J. 1972. Mecanismos de controle no desenvolvimento vegetal. Edgard Blucher, EDUSP, São Paulo. 171p.

GIAQUINTA, R.T. 1980. Translocation of sucrose and oligosaccharides. In The Biochemistry of Plants. Vol.3 (J. Preiss, ed.) Academid Press, New York, p. 271-320.

GROSS, D., BLANCHARD, P.H. & BELL, D.J. 1954. Neokestose, a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. J. Chem Soc. 1727-1730.

GROTELUESCHEN, R.D. & SMITH, D. 1968. Carbohydrates in grasses. III. Estimation of the degree of polymerization of the fructosans in the stem basis of timothy and bromegrass near seed maturity. Crop Sci. 8:210-212.

GUPTA, A.K., BHATIA, M. & BHATIA, I.S. 1985. Glucofructosan metabolism in Cichorium intybus roots. Phytochem. 24:1423-1427.

HAMMER, H. 1970. Oligo- and polyfructosides from the bulbs of two Leucojum species. Acta Chem. Scand. 24:1294-1300.

HENDRY, G. 1987. The ecological significance of fructan in a contemporary flora. New Phytol. 106:201-216.

HENRY, R.J. & DARBYSHIRE, B. 1980. Sucrose:sucrose fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase from Allium cepa. Phytochemistry 19:1017-1020.

HONEYMAN, J. 1962. B-D Fructose. In Methods in Carbohydrate Chemistry. Vol I (R.L. Whistler & Wolfrom, M.L. eds) Academic Press, New York, p.116-117.

HOUSLEY, T.L., DAUGHTRY, C.S.T. & DALE, E.M. 1985. Fructosyl transferase activity and fructan content in wheat seeds. Agronomy Abstracts, p.82.

ISEJIMA, E.M. 1989. Partição de matéria seca no crescimento e variações fenológicas na série de frutanos das raízes tuberosas de Viguiera discolor Baker (Asteraceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 113p.

JANICK, J. 1968. A ciência da horticultura. Livraria Freitas Bastos S.A. São Paulo, 485p.

JEFFORD, T.G. & EDELMAN, J. 1963. The metabolism of fructose polymers in plants. 2. Effect of temperature on the carbohydrate changes and morphology of stored tubers of Helilanthus tuberosus L. J. Exp. Bot. 14:56-62.

JERMYN, M.A. 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. Nature 177:38-39.

JONES, S.B. 1977. Vernonieae-Systematic Review. In The Biology and Chemistry of the Compositae Vol 1 (V.H. Heywood, J.E. Harborne, L. Turner, eds.) Academic Press, London, p.503-521.

KANAYA, K.I., CHIBA, S. & SHIMOMURA, T. 1978. Thin-layer chromatography of linear oligosaccharides. Agr. Biol. Chem. 42:1947-1948.

KANDLER, O. & HOPF, H. 1980. Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. In The Biochemistry of Plants. Vol. 3: Carbohydrates: Structure and Function (J. Preiss, ed.) Academic Press, New York, p. 221-270.

KANDLER, O. & HOPF, H. 1984. Biosynthesis of oligosaccharides in vascular plants. In Storage carbohydrates in vascular plants (D.H. Lewis, ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p. 115-131.

KOSARIC, N., COSENTINO, G.P. & WIECZOREK, A. 1984. The Jerusalem artichoke as an agricultural crop. Biomass 5:1-36.

LABHART, Ch., NOSEBERGER, J. NELSON, C.J. 1983. Photosynthesis and degree of polymerisation of fructan during reproductive growth of meadow fescue at two temperatures and two photon flux densities. J. Exp. Bot. 34:1037-1046.

LABOURIAU, L.G. 1966. Revisão da situação da ecologia vegetal dos Cerrados. An. Acad. Brasil. Ciênc. 38(Suplemento) 5-38.

LABOURIAU, L.G. 1967. Sobre a fisiologia da germinação das sementes de Vicia graminea Sm. Tese de Livre-Docência em Fisiologia Vegetal, apresentada à Universidade Rural do Brasil. 84 p.

LAIDLAW, R.A. & REID, S.G. 1951. Studies on fructosan. III. A fructosan from Lolium perenne. J. Chem. Soc. p.1830-1834.

LEITÃO-FILHO, H.F. 1972. Contribuição ao conhecimento taxonômico da tribo Vernoniaceae no Estado de São Paulo. Tese de Doutoramento. Universidade de São Paulo, 216p.

LEOPOLD, A.C. & KRIEDEMANN, P.E. 1975. Plant Growth and Development. McGraw-Hill Book Company, New York, 545p.

LEVITT, J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses, Vol. 1. Academic Press, New York.

LEWIS, D.H. 1984. Occurrence and distribution of storage carbohydrates in vascular plants. In Storage carbohydrates in vascular plants (D.H. Lewis, ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p. 1-52.

MAAS, W.S.G. & CRAIGIE, J.S. 1964. Examination of some soluble constituents of Sphagnum gametophytes. Can. J. Bot. 42:805-813.

MacLEOD, A.M. & McCORQUODALE, H. 1958. Water-soluble carbohydrates of seeds of the Gramineae. New Phytol. 57:168-182.

MAGALHÃES, A.C.N. 1979. Análise quantitativa do crescimento. In Fisiologia Vegetal Vol. 1 (M.G. Ferri, ed.) EPU e EDUSP, São Paulo.

MALAVOLTA, E. 1980. Elementos da nutrição mineral de plantas. Ed. Agron. Ceres. São Paulo.

MANTOVANI, W. 1983. Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú, Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 147p.

MANTOVANI, W. & MARTINS, F.R. 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú, Estado de São Paulo. Revta brasil. Bot. 11:101-112.

McCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V. & OWENS, H.S. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables: application to peas. Analyt. Chem. 22:1156-1158.

McRARY, W.L. & SLATTERY, M.C. 1945. The colorimetric determination of fructosan in plant material. J. Biol. Chem. 157:161-167.

MEDCALF, D.G. & CHEUNG, P.W. 1971. Composition and structure of glucofructans from durum wheat flour. Cereal Chem. 48:1-8.

MEIER H. & REID, J.S.G. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In Encyclopedia of Plant Physiology. New Series, Vol. 13 A. Plant Carbohydrates I. (F.A. Loewus & W. Tanner, eds.). Springer-Verlag., Heidelberg, p.418-471.

MENEZES, N.L., MULLER, C. & SAJO, M.G. 1979. Um novo e peculiar tipo de sistema subterrâneo em espécies de Vernonia da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil). Bolm. Bot., Univ. S. Paulo, 7:33-38.

OJIMA, K. & ISAWA, T. 1968. The variation of carbohydrates in various species of grasses and legumes. Can. J. Bot. 46:1507-1511.

POLLOCK, C.J. 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. New Phytol. 104:1-24.

POLLOCK, C.J. & JONES, T. 1979. Seasonal patterns of fructan and metabolism in forage grasses. New Phytol. 83:8-15.

POLLOCK, C.J. & CHATTERTON, N.J. 1988. Fructans. In The Biochemistry of Plants - A Comprehensive Treatise Vol. 14. Carbohydrates: Structure and Function (J. Preiss, ed.) Academic Press, New York, p. 109-140.

POLLOCK, C.J. & PREISS, J. 1980. The citrate-stimulated starch synthase of starchy maize kernels: purification and properties. Arch. Biochem. Biophys. 204:578-588.

POLLOCK, C.J., HALL, M.A. & ROBERTS, D.P., 1979. Structural analysis of fructose polymers by gas-liquid chromatography and gel filtration. J. Chromatogr. 171:411-415.

PONTIS, H.G. 1990. Fructans. In Methods in Plant Biochemistry. Vol.2, Carbohydrates (P.M. Dey & J.B. Harborne, eds.). Academic Press, London. p.353-369.

PONTIS, H.G. & DEL CAMPILLO, E. 1985. Fructans. In Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants. (P.M. Dey & R.A. Dixon, eds.) Academic Press, New York, p.205-226.

PREISS, J. & LEVI, C. 1980. Starch biosynthesis and degradation. In The Biochemistry of Plants. Vol 3. (J.Preiss, ed.) Academic Press, New York, p.371-423.

RACHID, M. 1947. Transpiração e sistemas subterrâneos da vegetação de verão nos campos cerrados de Emas. Bolm. Fac. Fil. Ciênc. Univ. S. Paulo 80 (Botânica) 5:5-140.

RACHID-EDWARDS, M. 1956. Alguns dispositivos para proteção de plantas contra a seca e o fogo. Bolm. Fac. Fil. Ciênc. Univ. S. Paulo 207 (Botânica) 13:37-69.

RAWITSCHER, F.K., RACHID, M. & FERRI, M.G. 1943. Profundidade dos solos e vegetações em campos cerrados do Brasil meridional. An. Acad. brasil. Ciênc. 15:267-294.

RIZZINI, C.T. & HERINGER, E.P. 1961. Underground organs of plants from some southern Brazilian savannas, with special reference to the xylopodium. Phyton 17:105-124.

RIZZINI, C.T. & HERINGER, E.P. 1966. Estudos sobre os sistemas subterrâneos difusos de plantas campestres. Anais Acad. Brasil. Ciênc. Rio de Janeiro 38:85-112.

RUTHERFORD, P.P. & DEACON, A.C. 1972. B-fructofuranosidases from roots of dandelion (Taraxacum officinale Weber). Biochem. J. 126:569-573.

RUTHERFORD, P.P. & DEACON, A.C. 1974. Seasonal variation in dandelion roots of fructosan composition, metabolism and response to treatment with 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid. Ann. Bot. 38:251-260.

RUTHERFORD, P.P. & WESTON, E.W. 1968. Carbohydrate changes during cold storage of some inulin-containing roots and tubers. Phytochem. 7:175-180.

SAJO, M.G. 1982. Estudos dos órgãos vegetativos de espécies de Vernonia Screb (Compositae) da Serra do Cipó (Minas Gerais). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 89p.

SAJO, M.G. & MENEZES, N.L. 1986a. Anatomia do rizóforo de espécies de Vernonia Screb. (Compositae) da Serra do Cipó, MG. Rev. Brasil. Biol. 46:189-196.

SAJO, M.G. & MENEZES, N.L. 1986b. Origem e crescimento do rizóforo em espécies de Vernonia Screb. (Compositae), da Serra do Cipó, MG. Rev. brasil. Biol. 46:197-202.

SALISBURY, F.B. & ROSS, C. 1969. Plant Physiology. Wadsworth Publishing Company, Inc., Belmont, Ca, 422p.

SCHNYDER H. & NELSON, C.J. 1987. Growth rates and carbohydrate fluxes within the elongation zone of tall fescue leaf blades. Plant Physiol. 85:548-553.

SCOTT, R.W. 1968. Transfructosylation in higher plants containing fructose polymers. Ph D thesis, University of London, 244p.

SCOTT, R.W., JEFFORD, T.G. & EDELMAN, J. 1966. Sucrose:sucrose frutosyltransferase from higher plant tissues. Biochem. J. 100:23p.

SHIOMI, N. 1981a. Two novel hexasaccharides from the roots of Asparagus officinalis. Phytochemistry 20:2581-2583.

SHIOMI, N. 1981b. Purification and characterization of 6G-fructosyltransferase from the roots of asparagus (Asparagus officinalis L.) Carbohydr. Res. 96:281-292.

SHIOMI, N. 1982. Purification and characterization of 1F-fructosyltransferase from the roots of asparagus (Asparagus officinalis L.) Carbohydr. Res. 99:157-169.

SHIOMI, N. & IZAWA, M. 1980. Purification and characterisation of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from the roots of asparagus (Asparagus officinalis L.). Agric. Biol. Chem. 44:603-614.

SHIOMI, N. YAMADA, J. IZAWA, M. 1979. Synthesis of several fructo-oligosaccharides by asparagus fructosyltransferases. Agric. Biol. Chem. 43:2233-2244.

SMITH, D. 1967. Carbohydrates in grasses. II. Sugar and fructosan composition of the stem bases of bromegrass and timothy at several growth stages and in different plant parts at anthesis. Crop Sci. 7:62-67.

SMITH, D. 1968. Carbohydrates in grasses. IV. Influence of temperature on the sugar and fructosan composition in timothy plant parts at anthesis. Crop Sci. 8:331-334.

SMITH, D. 1973. The nonstructural carbohydrates. In The Biochemistry of Herbage. Vol.2. (G.W. Butler & R.W. Bailey, eds.) Academic Press, New York, p. 105-155.

SOMOGYI, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem. 160:61-63.

SRINIVASAN, M. & BHATIA, I.S. 1953. The carbohydrates of Agave vera cruz Mill. Biochem. J. 55:286-289.

STEBBINS, G.L. 1977. Development and comparative anatomy of the Compositae. In The Biology and Chemistry of the Compositae Vol. 1 (V.H. Heywood, J.E. Harborne & L. Turner eds.), Academic Press, London, p. 91-109.

SULLIEMAN, A.A.A., BACON, J., CHRISTIE, A. & LEWIS, D.H. 1979. The carbohydrates of the leafy liverwort, Plagiochila asplenioides (L.) Dum. New Phytol. 82:439-448.

TENÓRIO, E.C. 1969. Fenologia de gramíneas. In Anais Congr. Soc. Bot. Brasil. p. 231-241.

THORNE, J.H. & GIAQUINTA, R.T. 1984. Pathways and mechanisms associated with carbohydrate translocation in plants. In Storage Carbohydrates in Vascular Plants (D.H. Lewis, ed.) Cambridge University Press, Cambridge, p.75-96.

TOMASIC, J., JENNINGS, H.J. & GLAUDEMANS, C.P.J. 1978. Evidence for a single type of linkage in a fructofuranan from Lolium perenne. Carbohydr. Res. 62:127-133.

VÁLIO, I.F.M. 1979. Reprodução em plantas superiores. In Fisiologia Vegetal Vol. 2 (M.G.Ferri, coord.) EPU e EDUSP, SãoPaulo, p.281-312.

VIEIRA, C.C.J. 1991. Flutuações sazonais e caracterização parcial dos carboidratos solúveis do órgão subterrâneo de Gomphrena officinalis Mart. (Amaranthaceae). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 135p.

VINCE-PRUE, D. 1975. Photoperiodism in Plants. McGraw-Hill Book Company. London. 444p.

WAGNER, W. & WIEMKEN, A. 1986. Properties and subcellular localization of fructan hydrolase in the leaves of barley (**Hordeum vulgare** L. cv. Gerbel). J. Plant Physiol. 123:429-439.

WAGNER, W. & WIEMKEN, A. 1989. Fructan metabolism in expanded primary leaves of barley (**Hordeum vulgare** L. cv. Gerbel): Change upon ageing and spatial organization along the leaf blade. J. Plant Physiol. 134:237-242.

WAGNER, W., KELLER, F. & WIEMKEN, A. 1983. Fructan metabolism in cereals: induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. Z. Pflanzenphysiol. 112:359-372.

WAITE, R. BOYD, J. 1953. The water-soluble carbohydrates of grasses. I. Changes occurring during the normal life-cycle. J. Sci. Food Agric. 4:197-204.

WHITE, L.M. 1973. Carbohydrate reserves of grasses: a review. Journal of Range Management 26:13-18.

WILLIAMS, R.F. 1946. The physiology of plant growth with special reference to the concept of net assimilation rate. Ann. Bot. N.S., vol.10.

WISE, C.S., DIMLER, R.J., DAVIS, H.A. & RIST, C.E. 1955. Determination of easily hydrolyzable fructose units in dextran preparation. Analyt. Chem. 27:33-36.

ZIMMERMAN M.H. & BROWN, C.L. 1974. Trees: structure and function. Springer-Verlag, Berlin. 336p.