

Produção de frutanos em calos e plântulas clonadas *in vitro* de *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae)

Nair Massumi Itaya¹, Ana Paula Artimonte Vaz², Gilberto B. Kerbauy³ e Rita de Cássia L. Figueiredo-Ribeiro^{1,4}

Recebido em 28/09/2004. Aceito em 02/02/2005

RESUMO – (Produção de frutanos em calos e plântulas clonadas *in vitro* de *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae)). *Viguiera discolor* Baker é uma espécie nativa do cerrado, cuja sobrevivência está ameaçada pela invasão de espécies exóticas. Considerando sua elevada produção e a vasta aplicação de frutanos, o presente trabalho foi conduzido visando à obtenção *in vitro* dessa espécie e à prospecção desses carboidratos nessas condições. Sementes foram germinadas *in vitro*, em meio MS modificado, e após cinco semanas de incubação, nós caulinares foram isolados e incubados no mesmo meio adicionado de 0,5 mg L⁻¹ de ANA, regenerando plantas uniformes, raízes não espessadas, raízes tuberosas e estruturas semelhantes a calo (calo tipo 1), formadas na região caulinar basal. Análise desse material evidenciou a presença de frutanos do tipo inulina nas raízes tuberosas e nos calos tipo 1. Na presença de 2,4-D obteve-se a formação de calos friáveis (calo tipo 2), nos quais também foram detectados frutanos e suas enzimas de síntese sacarose: sacarose 1-frutossiltransferase (SST) e frutano: frutano 1-frutossiltransferase (FFT). Embora em concentrações menores às observadas nas plantas cultivadas sob condições naturais, o material produzido *in vitro* apresentou frutanos do mesmo tipo e razão SST/FFT menor do que um. Em meio de cultura sem hormônios, foi verificada a regeneração de 50% de plantas a partir dos nós caulinares. A propagação de *V. discolor in vitro* pode viabilizar a multiplicação e a preservação da espécie, bem como a produção de frutanos nessas condições.

Palavras-chave: cerrado, inulina, carboidratos de reserva, raízes tuberosas

ABSTRACT – (Fructan production in callus and *in vitro* cloned seedlings of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae)). *Viguiera discolor* Baker is a herbaceous species, native to cerrado and its survival has been threatened by the invasion of exotic species. Considering its high production and the wide application of fructans, the present work has aimed to establish *in vitro* culture of this species and to investigate the presence of fructans under these conditions. Seeds were germinated *in vitro* on modified MS medium and after plant growth, stem nodes were isolated and incubated on the previous culture medium, supplemented with 0.5 mg L⁻¹ NAA, which allowed the production of uniform plants, and formation of non thickened roots, tuberous roots and callus-like structures (callus type 1). Analysis of these materials showed the presence of inulin-type fructans. Incubation of stem nodes in the presence of 2,4-D induced growth of friable callus (callus type 2), in which fructans and their synthesis enzymes sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (SST) and fructan: fructan 1-fructosyltransferase (FFT) were detected. Although in lower concentrations, the ratio SST/FFT activities and their fructans were similar to values found in plants cultivated under natural conditions. Stem nodes incubation on hormone-free medium resulted in regeneration of 50% plantlets. *In vitro* propagation, of *V. discolor*, may allow large-scale multiplication and conservation of this species, as well as fructan production under this condition.

Key words: cerrado, inulin, reserve carbohydrates, tuberous roots

Introdução

Os frutanos são constituídos por cadeias de frutose ligadas a uma molécula de sacarose terminal. Representam um dos grupos de carboidratos mais amplamente distribuídos entre as plantas superiores, sendo encontrados em mono- e dicotiledôneas, principalmente nas ordens mais evoluídas, como Poales e Asterales (Lewis 1984; Sulliman *et al.* 1979; Meier & Reid 1982). Muitas dessas plantas têm sido utilizadas há séculos para fins alimentares ou medicinais (Fuchs

1993), podendo-se citar como exemplos ricos em frutanos o trigo, a cebola, o alho-porró, a alcachofra, a erva-doce, a bardana e o aspargo (Van Loo *et al.* 1995). Estudos recentes têm revelado interesse crescente no uso de frutanos na alimentação, sendo recomendado o consumo diário de 1 a 4 gramas de inulina (um dos frutanos mais comuns) por pessoa, na dieta norte-americana (Mosh Fegh *et al.* 1999).

Os frutanos de cadeias curtas são conhecidos como frutoligosacarídeos (FOS), sendo obtidos a partir da hidrólise de frutanos de cadeias longas ou por meio

¹ Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, C. Postal 4005, CEP 01061-970, São Paulo, SP, Brasil

² Embrapa Transferência de Tecnologia, Escritório de Negócios de Campinas, Av Anchieta 173-41, CEP 13015-100, Campinas, SP, Brasil

³ Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, C. Postal 11461, CEP 05422-970, São Paulo, SP, Brasil

⁴ Autor para correspondência: ritarib@usp.br

de sua síntese, tendo como substrato a sacarose e enzimas comerciais produzidas por microrganismos. Por sua vez, os frutanos de cadeias longas da série da inulina são de difícil obtenção, existindo poucas espécies vegetais capazes de sintetizá-los, paralelamente a um controle restrito da ação de enzimas hidrolíticas durante os processos de armazenamento nos órgãos de reserva (De Roover *et al.* 1999).

Dentre as propriedades nutricionais e biológicas dos FOS, podem-se citar o efeito de fibra dietética, a estimulação seletiva do crescimento de bifidobactérias no cólon, a modulação do metabolismo de lipídeos, a diminuição da pressão sanguínea e da glicemia e o aumento na fixação de minerais, principalmente cálcio (Hidaka *et al.* 1986; Modler *et al.* 1990; Yamasaki & Matsumoto 1993; Van den Heuvel *et al.* 1999). Por outro lado, a inulina com alto grau de polimerização (GP \geq 25), cuja fermentação é mais lenta, tem se evidenciado como inibidor de carcinogênese, especialmente no caso de tumores quimicamente induzidos e frequentes na região distal do cólon (Rowland *et al.* 1998).

Viguiera discolor Baker (Asteraceae) é uma espécie herbácea, perene e nativa do cerrado brasileiro, cuja sobrevivência está ameaçada pela crescente invasão de plantas exóticas, especialmente as gramíneas africanas. Em *Viguiera discolor* foram identificados frutanos de cadeias longas com GP de até 170, os quais são acumulados nas raízes tuberosas, onde podem representar até 80% da massa seca (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993).

A micropropagação de plantas representa uma alternativa para a produção comercial de espécies de interesse econômico, entre as quais as medicinais com valor farmacológico reconhecido. Embora essa técnica tenha como desvantagem o custo elevado, o valor comercial de um produto final selecionado e uniforme, além da possibilidade de produção em larga escala de plantas livres de doenças, justificam a sua utilização (Chu & Kurtz 1990).

A cultura de tecidos também tem sido apontada como valioso instrumento para o estudo dos metabolismos primário e secundário, constituindo um sistema apropriado para a produção de compostos importantes, dentre esses os carboidratos solúveis e suas enzimas associadas (Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1992). Contudo, a presença de frutanos em tecidos vegetais produzidos *in vitro* tem sido reportada de forma muito esparsa na literatura (Abou-Mandour *et al.* 1987; Hale *et al.* 1987; Haab *et al.* 1991; Mercier *et al.* 1992; Vieira *et al.* 1995; Sims *et al.* 2000).

Considerando a elevada produção de frutanos de cadeias longas em *Viguiera discolor* e a vasta aplicação industrial desses carboidratos, além da existência de lacunas no conhecimento do metabolismo enzimático desses polímeros, o presente trabalho foi conduzido visando ao estabelecimento *in vitro* dessa espécie e à prospecção de frutanos nos tecidos produzidos sob essas condições. Além disso, a produção de calos foi induzida no intuito de se verificar a presença desses polímeros e das enzimas do seu metabolismo.

Material e métodos

Material vegetal – Aquênios de *Viguiera discolor* Baker foram colhidos em abril/1999, a partir de plantas cultivadas em canteiros de propagação da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo. Os aquênios foram imersos em uma solução de hipoclorito de sódio comercial 100% com teor de cloro a 2,5%, adicionada de algumas gotas de detergente doméstico, durante 50 min, sob agitação. Em seguida, sob condições de câmara asséptica, foram lavados três vezes com água destilada autoclavada e, após a retirada de seu envoltório externo, foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio de cultura MS (Murashige & Skoog 1962), modificado pela diluição dos macronutrientes à metade, adicionado de 20 g.L⁻¹ de sacarose e geleificado com 6 g.L⁻¹ de Phytigel.

Após cinco semanas da germinação, os nós caulinares foram isolados e cultivados no meio de cultura acima descrito para a regeneração de plantas, e suplementado com 0,5 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) ou 3 mg.L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), visando à formação de raízes não espessadas, raízes tuberosas e calos. Os tecidos obtidos *in vitro* foram isolados e submetidos às análises quantitativas e qualitativas de frutanos, assim como quanto à presença das enzimas do metabolismo desses carboidratos. Os experimentos foram repetidos duas vezes de forma independente, sendo obtidos resultados similares.

Extração e análise de frutanos – A extração de frutanos foi realizada segundo método descrito por Pollock & Jones (1979). Após quatro meses de cultivo em meios adicionados de hormônios, as amostras foram segmentadas e imediatamente fervidas em etanol 80%, por 5 min a 80 °C, para inativação das enzimas. A seguir, foram homogeneizadas e centrifugadas a

700 rpm, por 15 min, à temperatura ambiente. Os resíduos precipitados foram re-extraídos com etanol 80% e centrifugados como descrito acima. A seguir, os resíduos foram novamente extraídos com água destilada, por 30 min a 60 °C e filtrados a vácuo. Os sobrenadantes das três extrações foram reunidos, concentrados em rotoevaporador até pequeno volume e retomados em água destilada, constituindo a fração denominada extrato total de carboidratos solúveis. O teor de frutose total, na forma livre e combinada, foi determinado colorimetricamente pelo método de antrona modificado, conforme descrito por Jermyn (1956), sendo as dosagens realizadas em triplicata, utilizando-se inulina de *Helianthus tuberosus* L. (Sigma), como padrão.

Os extratos de carboidratos solúveis foram purificados em colunas de troca iônica utilizando-se resinas Dowex na forma catiônica (50×8 - 200) e aniônica (1×8 - 200). Após aplicação de um pequeno volume de amostra no topo da coluna, a mesma foi eluída com 20 volumes de água destilada. A seguir, os eluatos foram neutralizados com hidróxido de amônio e concentrados até a secura, sendo retomados em pequeno volume de água deionizada. As amostras destinadas à análise por cromatografia de troca aniônica de alto desempenho (HPAEC) foram retomadas de forma a se obter uma concentração de 4 mg.mL⁻¹ para análise em coluna CarboPac PA-100, e 200 µg.mL⁻¹ para análise em coluna CarboPac PA-1. A seguir, foram filtradas em membrana de náilon específica para cromatografia líquida de alto desempenho, com 0,45 µm de malha.

Os açúcares foram analisados pelo sistema cromatográfico da Dionex (modelo DX-300) em colunas CarboPac PA-1 para oligossacarídeos ou CarboPac PA-100 para polissacarídeos, conforme programas previamente estabelecidos (Shiomi 1993). Para a eluição dos carboidratos, utilizou-se um gradiente de mistura do eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH) ao eluente A (150 mM de NaOH), com fluxo de 1 mL.min⁻¹, por meio da seguinte programação: Sistema I (para PA-1): 0-1 min, 25 mM; 1-2 min, 25-50 mM; 2-14 min, 50-500 mM; 14-22 min, 500 mM; 22-30 min, 25 mM; Sistema II (para PA-100): 0-2 min, 25-50 mM; 2-8 min, 50-350 mM; 8-28 min, 350-500; 28-30 min, 25 mM. Os carboidratos foram detectados por pulso amperométrico (PAD), sendo os potenciais aplicados E1 (540 ms), E2 (100 ms) e E3 (50 ms) de 0,05, 0,60, e -0,60, respectivamente, com nível de sensibilização de 1000 nA.

Extração enzimática e ensaios de atividade – Imediatamente após sua retirada do meio de cultura, os calos induzidos na presença de 2,4-D foram lavados em água destilada, cortados e homogeneizados (homogeneizador portátil Blend Master Jr - Hamilton Beach) em tampão citrato-fosfato pH 5,5, contendo β-mercaptoetanol 2 mM, ácido ascórbico 5 mM e azida sódica 0,02%, na proporção de 1:1 (p/v). O homogeneizado foi filtrado em náilon e o sobrenadante foi levado a 20% de saturação com sulfato de amônio, sendo agitado suavemente por 1 h e precipitado por mais 1 h, a 5 °C. O material foi então submetido à centrifugação a 10.000 g, por 20 min, e o precipitado descartado. O sobrenadante foi novamente precipitado com sulfato de amônio com 70% de saturação e processado de maneira idêntica à descrita acima, sendo então retomado na proporção de 1 mL para 10 g de peso fresco inicial no tampão de extração. Os extratos foram dessalinizados em BioGel P6 DG equilibrado em tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,5.

As proteínas foram quantificadas conforme método de Bradford (1976), sendo a albumina de soro bovino utilizada como padrão. A atividade enzimática foi medida a partir da incubação do extrato enzimático com sacarose (800 mM) para a medida de atividade da sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99) e com 1-cestose (800 mM) para a medida de atividade da frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100), ambos na proporção de 1:8. Os ensaios foram realizados em pH 5,5, a 30 °C e tempo de incubação de 24 h, conforme determinando previamente (Itaya *et al.* 1997). Os produtos das reações enzimáticas de 1-SST e 1-FFT foram analisados por HPAEC/PAD, sendo a atividade calculada com base nas áreas dos picos das amostras, comparativamente às de padrões autênticos.

Resultados e discussão

A germinação *in vitro* dos aquênios de *Viguiera discolor*, cujos envoltórios externos foram retirados, atingiu cerca de 80% de sucesso, após sete dias da transferência para o meio de cultura. As plântulas apresentaram crescimento relativamente rápido e intenso, com a formação de caules delgados e folhas bastante sensíveis à desidratação. Por sua vez, a produção de plantas clonadas, a partir de explantes nodais cultivados em meio de cultura livre de hormônios, apresentou menor percentagem de êxito, tendo sido verificada percentagem de regeneração de 50%.

A presença de ANA no meio de cultura resultou na formação de plantas uniformes e no desenvolvimento de raízes não espessadas, raízes tuberosas e estruturas na região basal do caule, semelhantes a calos enrijecidos, denominadas calo tipo 1 (Fig. 1). Uma formação de calos friáveis (calo tipo 2) foi obtida quando os nós caulinares foram incubados em meio de cultura adicionado de 2,4-D. Experimentos anteriores indicaram que a adição de ácido indolil-acético (AIA) ou 6-benzilamino-purina (BAP) ao meio de cultura não foi favorável ao desenvolvimento das plantas, resultando na oxidação do material vegetal ou acúmulo excessivo de água (dados não apresentados).

A análise dos carboidratos solúveis por HPAEC/PAD revelou a presença de glucose, frutose, sacarose e frutanos da série homóloga da inulina tanto nos calos, quanto nas raízes não espessadas e raízes tuberosas cultivadas *in vitro*, na presença de ANA (Fig. 2). Entretanto, foram observadas variações nas proporções de monossacarídeos e dos diferentes membros

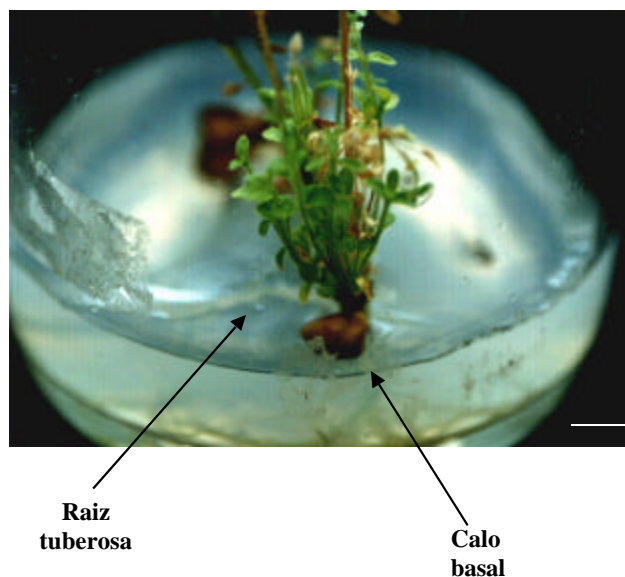


Figura 1. Aspecto geral das plântulas de *Viguiera discolor* Baker clonadas a partir de explante nodal, destacando-se a formação de raízes tuberosas e de um calo (calo tipo 1) na região basal do caule (barra = 0,6 cm).

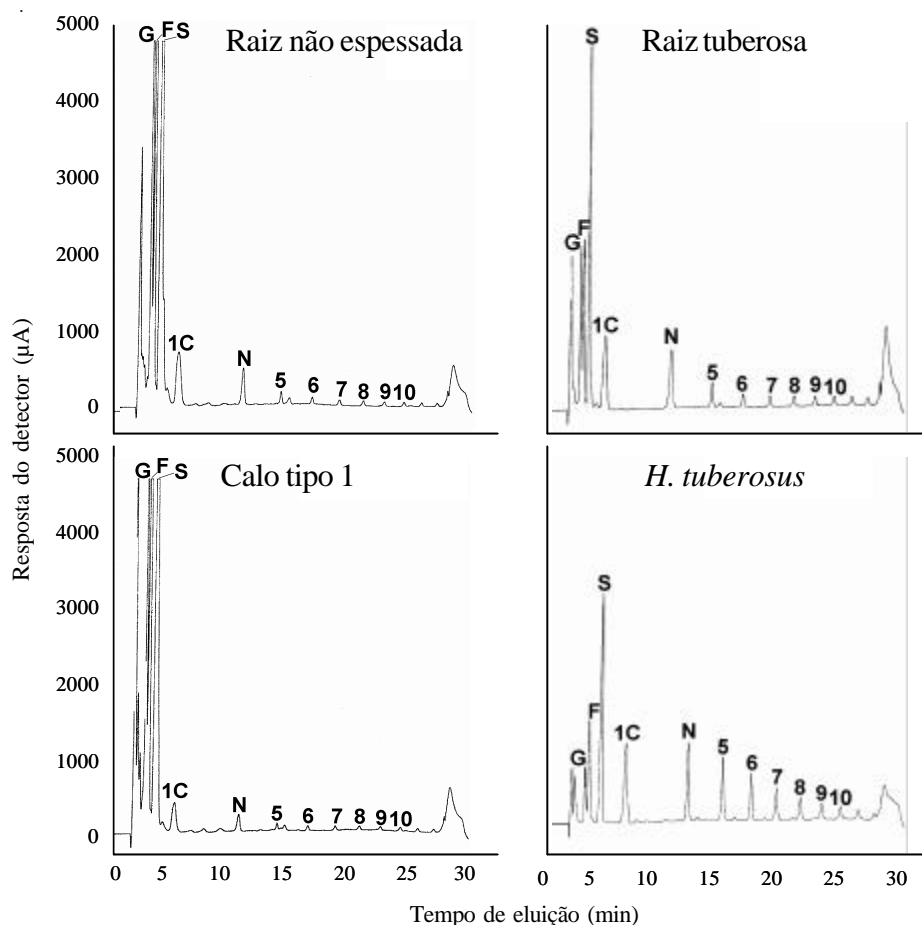


Figura 2. Análise por HPAEC/PAD em coluna CarboPac PA-100 dos oligofrutanos obtidos de raiz não espessada, raiz tuberosa e calo tipo 1 de *Viguiera discolor* Baker cultivados *in vitro* em meio de cultura adicionado de ANA. G, F, S, 1C e N referem-se aos tempos de eluição dos padrões de glucose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose, respectivamente. Os demais picos foram identificados por comparação com o tempo de eluição dos oligofrutanos de tubérculos de *Helianthus tuberosus* L. Os valores numéricos referem-se ao grau de polimerização (GP) do frutano.

componentes da série homóloga da inulina. Além disso, as análises qualitativas dos carboidratos solúveis extraídos das raízes não espessadas e dos calos de *V. discolor* evidenciaram perfis cromatográficos semelhantes entre si, porém distintos daqueles obtidos nas raízes tuberosas, cujos teores de glucose e frutose foram menores (Fig. 2). Por sua vez, os calos do tipo 2, obtidos na presença de 2,4-D, apresentaram os teores mais elevados de glucose e frutose (Fig. 3B).

Nos extratos de raízes tuberosas cultivadas *in vitro* na presença de ANA ou em plantas mantidas sob condições de cerrado, todos os membros da série homóloga da inulina estavam presentes, quando

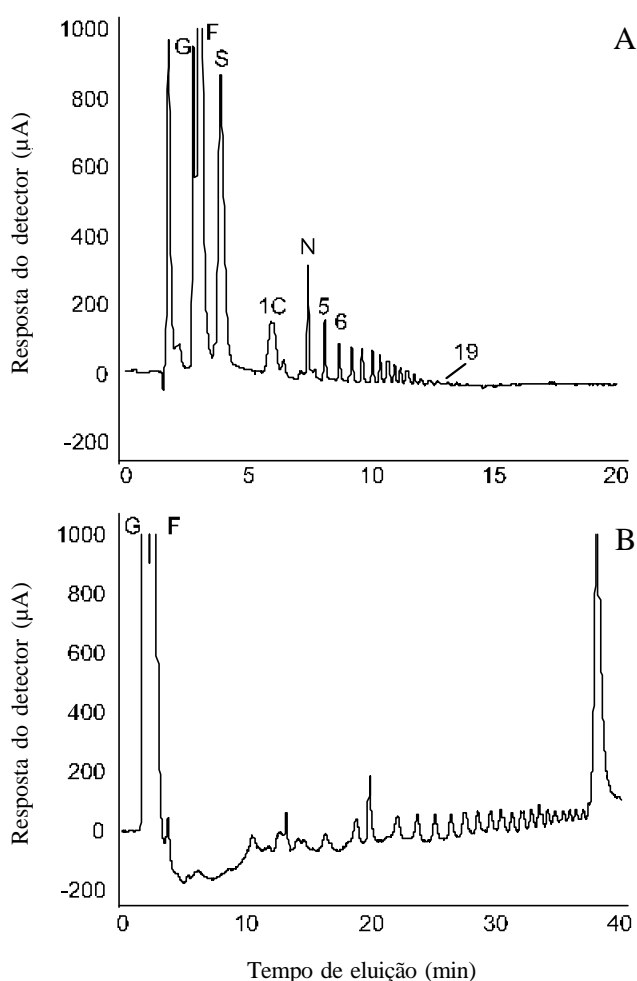


Figura 3. Perfis dos carboidratos solúveis extraídos de raízes tuberosas coletadas na natureza (A) e de calos tipo 2, originados a partir do cultivo de nós caulinares de *Viguiera discolor* Baker em meio de cultura adicionado de 2,4-D (B), obtidos por análise por HPAEC/PAD em coluna CarboPac PA-1. G,F,S, 1C e N referem-se aos tempos de eluição dos padrões de glucose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose, respectivamente. Os demais picos foram identificados por comparação com o tempo de eluição dos oligofrutanos de tubérculos de *Helianthus tuberosus* L. Os valores numéricos referem-se ao GP do frutano.

analisados por HPLC em coluna CarboPac PA-1 (dados não apresentados). As raízes tuberosas, por sua vez, apresentaram concentrações discretamente maiores de nistose (Fig. 2; Fig. 3A) e uma concentração de até 3,5 vezes maior de frutanos, quando comparadas aos calos tipo 1 (Tab. 1). Contudo, o teor obtido *in vitro* foi cerca de sete vezes inferior ao observado nos mesmos tecidos de plantas crescidas em condições naturais do cerrado (Itaya *et al.* 1997). Resultados semelhantes foram observados em plantas micropropagadas de outra espécie herbácea nativa do

Tabela 1. Conteúdo de frutanos (mg.g⁻¹ massa fresca) em plantas de *Viguiera discolor* Baker cultivadas *in vitro*.

Tecidos analisados	Frutanos (mg.g ⁻¹)
Raiz não espessada	10,25
Raiz tuberosa	13,45
Calo (tipo 1)	3,82

cerrado, *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (paratudo-campo), as quais também acumularam frutanos iguais aos encontrados em plantas crescidas em condições naturais, porém em concentrações inferiores (Moreira *et al.* 1999). Comparativamente aos compostos extraídos das raízes tuberosas crescidas em meios adicionados de ANA (Fig. 2), a quantidade de frutose na forma livre e combinada encontrada nas estruturas semelhantes a calos foi cerca de 60 vezes menor (dados não apresentados).

Os nós caulinares de *V. discolor* que, sob condições naturais não acumulam frutanos, originaram calos capazes de sintetizar esses carboidratos quando cultivados em meio de cultura contendo nutrientes minerais, sacarose e auxinas. Resultados semelhantes foram obtidos por Vieira *et al.* (1995), trabalhando *in vivo* com *Gomphrena macrocephala* espécie que acumula frutano do tipo fleano nas raízes tuberosas. Por sua vez, calos de *Symphytum officinale* L. (confrei), obtidos a partir de folhas e pecíolos cultivados na presença de 2,4-D, também produziram frutanos, preservando esta capacidade nas plantas regeneradas posteriormente (Abou-Mandour *et al.* 1987).

As atividades das enzimas de síntese de frutanos (SST e FFT) foram detectadas nas raízes tuberosas (dados não apresentados) e nos extratos enzimáticos dos calos tipo 2 de *V. discolor* (Fig. 4). De forma semelhante à encontrada para as raízes tuberosas de plantas cultivadas *in vivo* (Itaya *et al.* 1997), a razão

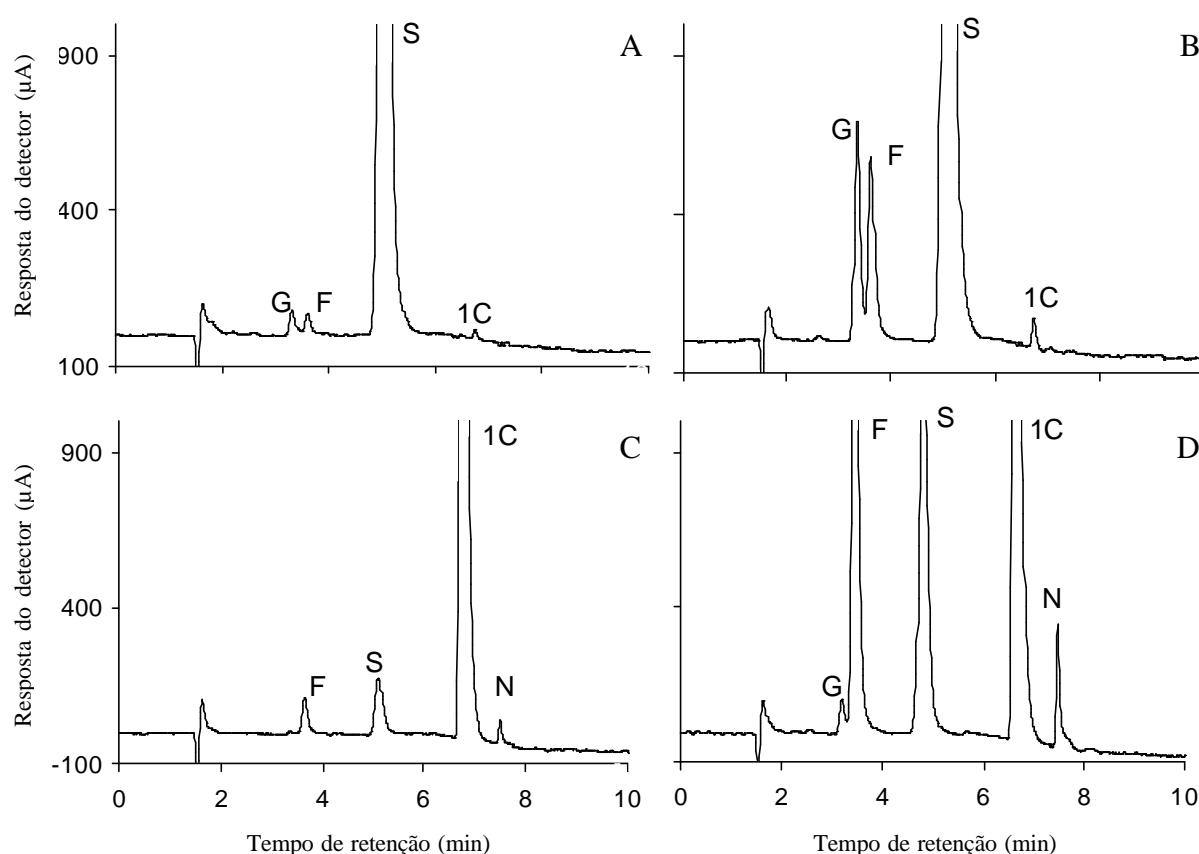


Figura 4. Análise por HPAEC/PAD em coluna CarboPac PA-1 dos produtos formados pela incubação de extratos enzimáticos de calos tipo 2 de *Viguiera discolor* Baker com sacarose (A e B) e com 1-cestose (C e D). A concentração final do substrato foi 100 mM; A e C referem-se ao tempo zero das respectivas incubações. G, F, S, 1C e N referem-se aos tempos de eluição de glucose, frutose, sacarose, 1-cestose e nistose, respectivamente.

SST/FFT nos extratos enzimáticos desses calos apresentou valor inferior a 1 (Tab. 2). Segundo Itaya *et al.* (2002), proporções diferentes entre as atividades de SST e FFT nas espécies de asteráceas acumuladoras de inulina seriam determinantes da produção de frutanos com diferentes comprimentos de cadeia. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram as relações já encontradas entre as enzimas do metabolismo de frutanos para plantas de *V. discolor* cultivadas em condições naturais, bem como para outras espécies de Asteraceae (Itaya *et al.*

2002), sugerindo que o metabolismo enzimático de frutanos é preservado em células menos diferenciadas. Contudo, a participação de reguladores de crescimento, entre outros fatores, pode ser crucial na expressão das atividades das enzimas de síntese dos frutanos.

O cultivo *in vitro* bem sucedido de plantas e calos de *V. discolor* sugere ser esta uma alternativa viável para a obtenção de material vegetal em quantidade suficiente para fins de purificação das enzimas de síntese de frutanos. Embora os extratos enzimáticos dos calos tenham apresentado atividades de 1-SST e

Tabela 2. Atividades das enzimas 1-SST e 1-FFT em extratos de raízes tuberosas de *Viguiera discolor* Baker cultivadas *in vivo* e em calos produzidos a partir de explantes de nós caulinares cultivados *in vitro*.

Tecido analisado	1-SST ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de prot. h^{-1})	1-FFT ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ de prot. h^{-1})	Proporção de atividade (1-SST/1-FFT)
Raiz tuberosa	1290,00	1970,00	0,65
Calo	197,00	993,55	0,20

1-FFT de forma consistente, as análises de carboidratos por HPAEC/PAD não evidenciaram a presença de uma série completa da inulina, como observada em outras raízes tuberosas sob condições naturais e *in vitro*. De acordo com Isejima & Figueiredo-Ribeiro (1993), a presença da série homóloga completa da inulina em *V. discolor* é dependente do estado fenológico da planta, sendo, portanto, modulada por fatores ambientais. O conhecimento dos efeitos da composição do meio de cultura sobre a síntese e a atividade das enzimas do metabolismo de frutanos *in vitro* requer estudos mais aprofundados.

A obtenção *in vitro* de plantas clonadas de *V. discolor*, especialmente a partir da cultura de nós caulinares, sugere a utilização desta técnica para fins de multiplicação rápida e preservação da espécie. Entretanto, estudos complementares são necessários para aclimação eficiente das plântulas produzidas em laboratório, devido à sua sensibilidade nas etapas subsequentes à transferência para condições *ex vitro*.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP, pelo apoio financeiro (Proc. 98/05124-8), bem como pela bolsa de Doutorado concedida a N.M. Itaya (Proc. 97/12007-5). G.B. Kerbauy e R.C.L. Figueiredo-Ribeiro são bolsistas de Produtividade Científica do CNPq.

Referências bibliográficas

- Abou-Mandour, A.A.; Czygan, F.C.; Haab, D. & Franz, G. 1987. Fructan synthesis in tissue culture of *Symphytum officinale* L.: Initiation, differentiation and metabolic activity. **Planta Medica** **53**: 482-487.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry** **72**: 248-254.
- Chu, I.Y.E. & Kurtz S.L. 1990. Commercialization of plant micropropagation. Pp. 126-164. In: P.V. Ammirato; D.A. Evans; W.R. Sharp & Y.P.S. Bajaj (eds.). **Handbook of plant cell culture**. New York, McGraw Hill.
- De Roover, J.; Van Laere, A.; Winter, M.D.; Timmermans J.W. & Van den Ende, W. 1999. Purification and properties of a second fructan 1-exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. **Physiologia Plantarum** **106**: 28-34.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.; Dietrich, S.M.C.; Machado de Carvalho, M.A.; Vieira, C.C.J.; Dias-Tagliacozzo, G.M. & Tertuliano, M.F. 1992. As múltiplas utilidades dos frutanos. **Ciência Hoje** **14**: 16-18.
- Fuchs, A. 1993. **Inulin and inulin containing crops**. Amsterdam, Elsevier.
- Haaß, D.; Mandour, A.A.; Blaschek, W.; Franz, G. & Czygan, F.C. 1991. The influence of phytohormones on growth, organ differentiation and fructan production in callus of *Symphytum officinale* L. **Plant Cell Reports** **10**: 421-437.
- Hale, A.D.; Pollock, C.J. & Dalton, S.J. 1987. Polysaccharide production in liquid cell suspension cultures of *Phleum pratense* L. **Plant Cell Reports** **6**: 435-438.
- Hidaka, H.; Eida, T.; Tokunaga, T. & Tashiro, Y. 1986. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. **Bifidobacterium Microflora** **5**: 37-50.
- Isejima, E.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1993. Dynamics of fructans in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by phenology. **Plant Cell Physiology** **34**: 723-727.
- Itaya, N.M.; Buckeridge, M.S. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1997. Biosynthesis *in vitro* of high-molecular-mass fructan by cell-free extracts from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). **New Phytologist** **136**: 53-60.
- Itaya, N.M.; Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2002. Fructosyl transferases and hydrolase activities in rhizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). **Physiologia Plantarum** **116**: 451-459.
- Jermyn, M.A. 1956. A new method for the determination of keto-hexoses in presence of aldohexoses. **Nature** **177**: 38-39.
- Lewis, D.H. 1984. Occurrence and distribution of carbohydrates in vascular plants. Pp. 1-52. In: D.H. Lewis (ed.). **Storage carbohydrates in vascular plants**. Cambridge, Cambridge University Press.
- Meier, H. & Reid, J.S.G. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. Pp. 418-471. In: F.A. Loewus & W. Tanner (eds.). **Encyclopedia of Plant Physiology**. New Series V. 13A. Plant Carbohydrates I. Heidelberg, Springer-Verlag.
- Mercier, H.; Vieira, C.C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1992. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **28**: 249-254.
- Modler, H.W.; McKellar, R.C. & Yamaguchi, M. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute Food Science Technology Journal** **23**: 29-41.
- Moreira, M.F.; Vieira, C.J. & Zaidan, L.B.P. 1999. Efeito do fotoperíodo no crescimento e no padrão de acúmulo de frutanos em plantas aclimatizadas de *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **22**: 397-403.
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum** **15**: 473-497.
- Mosh Fegh, A.J.; Friday, J.E.; Goldman, J.P. & Chung Ahuga, J.K. 1999. Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. **Journal of Nutrition** **129**: 1407S-1411S.
- Pollock, C.J. & Jones, T. 1979. Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. **New Phytologist** **83**: 9-15.

- Rowland, I.R.; Rumney, C.J.; Coutts, J.T. & Lievense, L. 1998. Effects of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen induced aberrant crypt foci in rats. **Carcinogenesis** **19**: 281-285.
- Shiomi, N. 1993. Structure of fructo-polysaccharide (asparagosin) from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). **New Phytologist** **123**: 263-270.
- Sims, I. M.; Middleton, K.; Lane, A.G.; Cairns, A.J. & Bacic, A. 2000. Characterization of extracellular polysaccharides from suspension cultures of members of the Poaceae. **Planta** **210**: 261-286.
- Sulliaman, A.A.A.; Bacon, J.; Chistie, A. & Lewis, D.H. 1979. The carbohydrates of the leafy liverwort, *Plagiochila asplenioides* (L.) Dum. **New Phytologist** **82**: 439-448.
- Van Loo, J.; Coussement, P.; De Leenheer, L.; Hoebregs, H. & Smits, G. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet. **Critical Review of Food Science Nutrition** **35**: 525-552.
- Van den Heuvel, E.G.H.M.; Muys, T.; Van Dokkum, W. & Schaafsma, G. 1999. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. **American Journal of Clinical Nutrition** **69**: 544-548.
- Vieira, C.C.J.; Braga, M.R. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1995. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** **42**: 233-238.
- Yamasaki, H. & Mastumoto, J. 1993. Production of fructo-oligosaccharide-rich fructose syrup. Pp. 355-357. In: A. Fuchs (ed.). **Inulin and inulin containing crops**. Amsterdam, Elsevier Science Publishers.