

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

GERALDO ROGÉRIO FAUSTINI CUZZUOL



**NUTRIÇÃO MINERAL NO CRESCIMENTO E NO
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS EM
Vernonia herbacea (VELL.) RUSBY**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Geraldo Rogério Faustini
Cuzzuol
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para a obtenção do Título de Doutor em
Biologia Vegetal.

Lilian B. Zaidan

Orientador: Dra. Lilian Beatriz Penteadó Zaidan

Co-orientador: Dra. Maria Angela Machado de Carvalho

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2003

FICHA CATALOGRÁFICA

UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	UNICAMP
	C989m
V	EX
TOMBO BCI	54656
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/07/03
Nº CPD	

BIBID. 296162

CM00186339-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C989n

Cuzzuol, Geraldo Rogério Faustini

Nutrição mineral no crescimento e no metabolismo de carboidratos solúveis em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby/Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientadora: Lilian Beatriz Penteado Zaidan

Tese (Doutorado) -- Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Vernonia. 2. Frutanos. 3. Ecofisiologia. I. Zaidan, Lilian Beatriz Penteado.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da defesa: 14/05/03

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudio José Barbedo _____

Prof. Dr. Ladaslav Sodek _____

Dra. Nair Massumi Itaya _____

Prof. Dr. Pedro Roberto Furlani _____

Prof. Dr. Eduardo Caruso Machado _____

Profa. Dra. Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro _____

515402

Agradecimentos

Ao Arquiteto do Universo, por mais esse projeto profissional em minha vida;

À Dra. Lilian Beatriz Penteado Zaidan, pela orientação primorosa e liberdade em construir ciência;

À Dra. Maria Angela Machado de Carvalho, pela co-orientação e pelo meu aperfeiçoamento teórico e prático em metabolismo de carboidratos;

Ao Dr. Pedro Roberto Furlani, pelos conhecimentos transmitidos em nutrição mineral e que muito colaboraram no planejamento dessa pesquisa;

Às biólogas Amanda Asega e Patrícia Galina, e à Dra Nair M. Itaya, pela colaboração inestimável nas atividades rotineiras de laboratório;

Ao Dr. Henrique Pessoa dos Santos e à bióloga Ana Maria Baroni, pela assistência técnica nas medidas de fotossíntese;

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, pelo apoio logístico e administrativo;

À equipe de apoio do laboratório da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo, onde encontrei ambiente fraterno e estimulante;

À Universidade Estadual de Campinas, em especial aos professores do Departamento de Fisiologia Vegetal, pelo aprendizado;

À Universidade Federal do Espírito Santo, pela minha liberação para realização desse estudo;

À CAPES, pela concessão de bolsa de doutorado;

e a minha esposa, Maria da Conceição Rocha, pela compreensão e incentivo na realização desse empreendimento.

INDICE GERAL

Resumo	vii
Abstract	ix
1.Introdução	1
2.Revisão Bibliográfica	5
2.1 Nutrição Mineral em Plantas de Cerrado	5
2.2 Ocorrência de Frutanos na Natureza	7
2.3 Frutanos	9
2.3.1 Estrutura Molecular	9
2.3.2 Biossíntese e Degradação	12
2.3.3 Função na Saúde Humana e Aplicação na Indústria de Alimentos	14
2.3.4 Influência de Fatores Ambientais e Condições Nutricionais	16
3.Objetivos	20
4.Capítulo 1 - Soluções Nutritivas para o Cultivo de <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby.....	21
Resumo	23
Abstract	24
Introdução.....	25
Materiais e Métodos	28
Resultados	31
Discussão.....	34
Literatura Citada.....	40
5.Capítulo 2 - Efeito do Nitrato no Crescimento, na Partição de Fotossintatos e na Força do Dreno em Plantas de <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby	54
Resumo	56
Abstract	57
Introdução.....	58
Materiais e Métodos	61
Resultados	67
Discussão.....	75
Literatura Citada.....	88
6.Capítulo 3 - Respostas de <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby ao Estresse de Nitrogênio	105
Resumo	107
Abstract	108

Introdução	109
Materiais e Métodos	112
Resultados.....	116
Discussão	119
Literatura Citada.....	126
7.Capítulo 4 - Crescimento e Produção de Frutanos em Plantas de <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby Submetidas à Cobertura Nitrogenada.....	139
Resumo	141
Abstract.....	142
Introdução	143
Materiais e Métodos	146
Resultados.....	149
Discussão	152
Literatura Citada.....	157
8.Considerações Finais	166
9.Literaturas Citadas da Introdução e Revisão Geral e das Considerações Finais	171

RESUMO

Vernonia herbacea é uma Asteraceae herbácea, perene e nativa de cerrado. Possui órgãos subterrâneos denominados rizóforos que acumulam frutanos do tipo inulina. Esses polímeros de frutose têm sido associados à resistência ao estresse por deficiência hídrica e nutricional, e por baixa temperatura, atuando como reguladores osmóticos. A importância econômica dos frutanos também é grande, devido a sua aplicação na indústria alimentícia e de cosméticos. Carboidratos dessa classe têm sido empregados com sucesso na prevenção de doenças do intestino, por estimular a proliferação das bifidobactérias. O fato dos frutanos não serem absorvidos pelo organismo humano faz desses carboidratos uma fonte alternativa de açúcar de baixa caloria. Dentre os fatores externos já estudados, a manipulação de nutrientes tem sido a prática mais utilizada para estimular a produção de frutanos. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de investigar o efeito dos nutrientes, especialmente o nitrogênio, no conteúdo de frutanos em *V. herbacea*, buscando, ainda, entender as interações entre o metabolismo de carboidratos solúveis e o crescimento. Com base em resultados anteriores em que rizóforos de *V. herbacea* apresentaram crescimento limitado em solução de Hoagland, foi formulada uma solução nutritiva, denominada Vernonia, a partir da constituição química foliar de *V. herbacea*. Em relação à solução de Hoagland, a solução Vernonia em 50% de força iônica proporcionou melhor produção de rizóforos e frutanos por planta, após 180 dias de cultivo. Por outro lado, maior crescimento da parte aérea ocorreu nas soluções completas (100% de força iônica) de Hoagland e Vernonia. Procurando investigar o comportamento dessa espécie em condições de estresse nutricional, plantas cultivadas em solução Vernonia enriquecida (10,7 mmol/L) foram transferidas para solução deficiente (1,3 mmol/L) de N-NO₃. Alterações fisiológicas e metabólicas ocorreram em resposta ao estresse nutricional. Um rápido aumento na biomassa da parte aérea foi observado aos 30 dias após o início do

tratamento. Na fase de maior síntese de frutanos (90 e 180 dias) a concentração desses compostos nas plantas submetidas à deficiência de nitrogênio foi maior, enquanto a produção de frutanos por planta foi superior na solução enriquecida de nitrogênio. O conteúdo foliar de proteína total solúvel diminuiu, gradativamente, à medida que se aproximou a fase de senescência e, de forma mais acentuada, em plantas sob estresse nutricional. Tais resultados sugerem maior mobilização de nitrogênio orgânico para os rizóforos onde ocorreram, simultaneamente, aumento no conteúdo de proteínas e acúmulo de frutanos. Uma redução da fotossíntese aos 30 dias foi observada em plantas cultivadas nas duas concentrações de nitrato, e parece estar relacionada ao aumento na concentração dos carboidratos foliares, sustentando a hipótese de que a fotossíntese seja regulada pelo conteúdo de carboidratos solúveis. Procurando dar subsídios para o uso sustentável de espécies de cerrado, plantas de *V. herbacea* foram cultivadas em uma área de cerrado onde receberam diferentes doses de adubação nitrogenada na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O crescimento das plantas foi estimulado apenas nas doses entre 6 e 12 kg/ha de nitrogênio após 12 meses de cultivo. Por outro lado, plantas tratadas com 24 kg/ha de nitrogênio chegaram a acumular 6,0 g de frutanos por planta enquanto nas plantas que não receberam N suplementar, esse valor foi de 3,5 g, sugerindo a aplicação de 24 kg/ha de nitrogênio para a produção de frutanos em solos de cerrado.

ABSTRACT

Vernonia herbacea is a herbaceous, perennial Asteraceae, native to the Brazilian cerrado. The plants have underground organs, known as rhizophores, which accumulate fructans of the inulin type. Fructose polymers have been associated to stress conditions, such as water and nutritional deficiency and low temperatures acting as osmotic regulators for the plant. Fructans have an outstanding economic importance due to their application in the food and pharmaceutical industries. These compounds have been successfully used in the prevention of intestinal diseases promoting the growth of bifidobacteria. In addition, fructans are not absorbed by the human organism, which makes these compounds useful in the production of alternative low calorie sugar. Among all the external factors yet reported to stimulate the biosynthesis of fructan, handling of nutrient application showed to be a very common practice. The aim of the present study was to investigate the effect of nutrient supply, with emphasis on nitrogen, in the fructan contents of *V. herbacea* plants. As a secondary objective, we aimed to understand how carbohydrate metabolism interacts with plant growth in *V. herbacea*. Previous results have shown that growth of rhizophores can be limited when Hoagland solution is added to plants of *V. herbacea*. Thus a nutrient solution (named Vernonia solution) was formulated based on the chemical constituents of *V. herbacea* leaves. When compared to Hoagland solution, Vernonia solution with 50% ionic strength had a positive effect on growth after 180 days of cultivation, increasing the production of rhizophores and fructans per plant. On the other hand an increase in the growth of aerial organs was observed when complete Hoagland or Vernonia solution (100% ionic strength) was added to the plants. To investigate how plants behave under nutritional stress conditions, plants previously cultivated in N-NO₃⁻ enriched Vernonia solution (10.7 mmol/L) were transferred to N-NO₃ deficient Vernonia solution (1.3 mmol/L). Physiological and metabolic changes were

detected in plants in response to nutritional stress. An increase in the biomass of the aerial organs was observed 30 days after the beginning of the treatments. Between 90 and 180 days, when fructan accumulation occurred more intensively, fructan concentration in plants submitted to nitrogen deficiency was higher, although fructan production per plant was superior in plants grown in the nitrogen-enriched solution. Total soluble leaf protein decreased slowly close to the senescence phase and this decrease was more intense in plants under nutritional stress. These results suggest the occurrence of mobilization of organic nitrogen towards the rhizophores, reflected by the increase in protein and fructans. Photosynthesis was reduced at day 30 in plants cultivated in both nitrate solutions and this reduction could be related to an increase of leaf carbohydrate concentration. This fact points to the hypothesis that photosynthesis is regulated by soluble carbohydrate content. To provide basic information for the sustainable use of the cerrado vegetation, plants of *V. herbacea* were cultivated in a cerrado area and received different concentrations of nitrogen solution as $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. After 12 months, growth was stimulated only in plants receiving 6 to 12 kg/ha of nitrogen. Plants treated with 24 kg/ha of nitrogen accumulated 6.0 g fructan per plant, while in control plants, not treated with supplementary N, this value was only 3.5 g. These results indicate that 24 kg/ha of nitrogen is the concentration recommended for fructan production by plants of *V. herbacea* in cerrado soils.

1. INTRODUÇÃO

Na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu, estado de São Paulo, cerca de 50% da vegetação herbácea e subarborescente de cerrado apresenta órgãos subterrâneos espessados (Mantovani, 1983). Asteraceae é a família mais ampla em número de gêneros e espécies no cerrado, chegando a representar 17% da flora local de angiosperma (Mantovani & Martins, 1988). Aproximadamente 60% das espécies de Asteraceae, daquela localidade, acumulam carboidratos solúveis do tipo frutanos em seus órgãos de reserva (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986).

O gênero *Vernonia* é de ampla ocorrência nesta área de cerrado (Mantovani 1983), representado por 22 espécies, todas do estrato herbáceo-subarborescente. É peculiar a esse táxon a presença de órgãos subterrâneos espessados com estrutura caulinar, denominados rizóforos (fig. 1), através dos quais as plantas se reproduzem vegetativamente (Menezes *et al.*, 1979).

O ciclo fenológico de muitas espécies de cerrado é caracterizado por uma fase de crescimento vegetativo que se inicia na primavera e se estende até o final do outono, quando os órgãos aéreos entram em senescência, coincidindo com o período de baixa temperatura e precipitação pluviométrica (De Vuono *et al.*, 1986). Nessa ocasião, os órgãos subterrâneos entram em dormência, e assim permanecem até a chegada da estação chuvosa na primavera quando ocorre a rebrota de novos ramos aéreos. No inverno, as partes aéreas das plantas de *V. herbacea* senescem e o conteúdo de frutanos aumenta, chegando a representar 80% da massa seca dos seus rizóforos (Carvalho & Dietrich, 1993).

As variações sazonais dos frutanos sugerem que, além do papel de reserva, esses compostos podem estar relacionados a mecanismos adaptativos em resposta ao estresse ambiental, oferecendo resistência a baixa temperatura e/ou dessecação (Figueiredo-Ribeiro *et*

al., 1991; Isejima *et al.*, 1991; Carvalho & Dietrich, 1993), através de sua contribuição na mudança do potencial osmótico (Hendry, 1987; Hendry & Wallace, 1993).



Figura 1 - Planta adulta de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby com rizóforos desenvolvidos.

Além da importância ecológica, os frutanos são de grande interesse econômico, devido às suas propriedades benéficas à saúde (Tomomatsu, 1994) que despertaram a atenção da indústria mundial de alimentos. Essa classe de carboidratos tem sido empregada com sucesso nos casos de constipação e prevenção de doenças do intestino, por estimular a proliferação das bifidobactérias, e no controle da osteoporose, por estimular a absorção de cálcio (Coussement

& Franck, 1998). O fato dos frutanos não serem absorvidos pelo organismo humano (Nilsson *et al.*, 1988; Hidaka & Hirayama, 1991) fez desses polímeros de frutose uma fonte alternativa de açúcar de baixa caloria. Em vista do crescente interesse por novas fontes de frutanos para uso na indústria alimentícia e farmacêutica, *V. herbacea* configura como alternativa para a produção deste carboidrato.

Não obstante sejam bem conhecidas a estrutura e a fisionomia da vegetação de cerrado (Felippe & Dale, 1990), muito pouco se sabe sobre os processos de crescimento e o papel dos carboidratos de reserva no estabelecimento das plantas ali ocorrentes, em relação às suas necessidades nutricionais. Portanto, estudos sobre nutrição mineral em plantas nativas de cerrado, com ênfase na modelação da força do dreno em espécies acumuladoras de frutanos, são de grande interesse.

Apesar da vegetação de cerrado ser tolerante e bem adaptada à baixa fertilidade do solo, não está eliminada a possibilidade de estimular a maior produção de biomassa aumentando a oferta de nutrientes para a planta. Esta hipótese foi testada no **Capítulo 1**, cultivando-se plantas de *V. herbacea* em diferentes soluções nutritivas. Tendo como referência resultados obtidos em plantas da família Asteraceae de regiões temperadas, nas quais foi constatada a influência do nitrogênio no metabolismo de frutanos, procurou-se verificar se o mesmo efeito ocorria em *V. herbacea* (**Capítulo 2**). Nesse trabalho pretendeu-se, ainda, obter informações a respeito dos processos fisiológicos dessa espécie em relação ao nitrogênio. Numa etapa complementar, foram avaliadas as respostas metabólicas e fisiológicas de plantas de *V. herbacea* transferidas de meio enriquecido para meio deficiente em nitrogênio (**Capítulo 3**). Importantes dados foram obtidos sobre o metabolismo de frutanos e o crescimento dessa espécie quando este nutriente é restringido. Por fim, buscando atender à necessidade do uso sustentável do cerrado, plantas de *V. herbacea* foram cultivadas em condições de campo onde receberam adubação nitrogenada.

Essa prática visou ao aumento da produtividade de frutanos, de modo a viabilizar sua utilização econômica (**Capítulo 4**).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Nutrição Mineral em Plantas de Cerrado

Até o presente, pouco se sabe sobre a influência dos nutrientes minerais na fisiologia de crescimento de plantas herbáceas de cerrado, em particular quanto à interação com o metabolismo de carboidratos de reserva.

Crescimento limitado, troncos retorcidos, maior alocação de carbono para raízes e elevada razão C:N são características encontradas na vegetação de cerrado, sendo apontadas como principais causas: a baixa fertilidade, toxicidade de alumínio e deficiência hídrica do solo (Felippe & Dale, 1990; Paulilo & Felippe, 1995; Haridasan *et al.*, 1997; Sasaki & Felippe, 1998). Arens (1963) sugeriu que os baixos níveis nutricionais no solo de cerrado levariam ao armazenamento de carboidratos, determinando o escleromorfismo e o crescimento limitado de sua vegetação.

Os poucos trabalhos sobre nutrição mineral em espécies nativas de cerrado foram realizados, principalmente, com arbóreas e, em menor número, com algumas herbáceas. De modo geral, a maioria das plantas absorve mais nutrientes em resposta ao aumento destes no solo (Moraes, 1994; Vilela & Haridasan, 1994; Haridasan *et al.*, 1997); e mais biomassa é alocada para os órgãos aéreos, aumentando a razão parte aérea:raiz quando adubadas com nitrogênio (Renó *et al.*, 1997; Melo, 1999; Oliveira 1999).

Outras espécies de cerrado não mostraram nenhuma resposta ao nitrogênio, mas sim ao fósforo. Para algumas arbóreas, o fósforo foi o nutriente mais limitante na fase de crescimento inicial (Melo, 1999). Um aumento na biomassa seca da herbácea *Bidens gardneri* (Asteraceae) foi verificado em resposta às doses crescentes de fósforo (Felippe & Dale, 1990), indicando

que a deficiência de nutrientes no solo é um fator limitante para o crescimento de espécies nativas de cerrado.

Comparadas com cultivares agrícolas, plantas de ambientes oligotróficos exibem baixa taxa de absorção radicular que pode aumentar em resposta à elevação da fertilidade do solo, porém com capacidade inferior de absorção à das espécies de ambientes mais férteis (Marschner, 1995). Desse modo, apesar de bem adaptadas a solos pobres em nutrientes, as espécies nativas, incluindo as de cerrado, apresentam baixo crescimento e baixa razão parte aérea:raiz mesmo sob maior disponibilidade de nutrientes (Chapin, 1980, 1988; Paulilo & Felipe, 1995).

Resultados diferentes foram obtidos com *V. herbacea*, outra herbácea de cerrado. Enquanto Teixeira *et al.* (1997) mostraram que a adição de solução nutritiva de Hoagland, em substrato arenoso, promoveu o crescimento dos órgãos aéreos de plantas cultivadas em casa de vegetação, Carvalho *et al.* (1998) notaram um possível efeito negativo da fertilização mineral na biomassa, em condições de campo, sem no entanto terem sido encontrado diferenças significativas dado o elevado coeficiente de variação das medidas de crescimento. Conforme Parke & Norvell (1999) resultados obtidos em diferentes condições ambientais, como descrito anteriormente para *V. herbacea*, não devem ser comparados e generalizados. Portanto, os resultados obtidos com esses dois trabalhos são insatisfatórios para uma conclusão mais precisa quanto ao comportamento nutricional dessa astéracea de cerrado.

Estudos de crescimento inicial em arbóreas de cerrado, como *Dalbergia miscolobium* (Paulilo & Felipe, 1995; Sasaki & Felipe, 1998) e *Qualea grandiflora* (Felippe & Dale, 1990), mostraram haver maior crescimento em resposta ao menor suprimento de nutrientes (50% da força iônica da solução de Hoagland); porém, efeitos tóxicos apareceram quando tratadas com solução completa de Hoagland. Diferentemente, plantas de *B. gardneri* apresentaram melhor desempenho na solução de Hoagland em 200% de força iônica (Klein *et*

al., 1996). A maior suscetibilidade das arbóreas de cerrado à solução de Hoagland indica que suas exigências nutricionais devam ser menores, respondendo positivamente até um limite a partir do qual o suprimento de nutrientes torna-se estressante.

As respostas do crescimento à adição de nutrientes em plantas nativas refletem uma pequena elevação da taxa de crescimento (TCR), indício de que tais plantas possuem baixo potencial de TCR (Lambers & Poorter, 1992; Marschner 1995; Lambers *et al.*, 1998). Baixa TCR é considerada por Grime & Hunt (1975) uma estratégia de sobrevivência de plantas em ambientes menos férteis. Segundo Chapin (1980, 1988), tais plantas, quando cultivadas em solo mais férteis, acumulam os nutrientes ao invés de aproveitá-los imediatamente, vindo a utilizá-los mais tarde, quando a disponibilidade de nutrientes for limitante (comportamento denominado “luxury consumption”).

Estudos de nutrição mineral em plantas nativas de cerrado com enfoque na modelação da força do dreno em espécies acumuladoras de frutanos é de particular interesse. Até o momento, somente dois trabalhos abordaram esse tema em herbáceas nativas de cerrado: o de Teixeira *et al.* (1997) e o de Carvalho *et al.* (1998), ambos em *V. herbacea*.

2.2. Ocorrência de Frutanos

Os frutanos encontram-se entre os carboidratos de reserva mais amplamente distribuídos no Reino Plantae, ocorrendo em monocotiledôneas de clima temperado (Liliflorae e Glumiflorae), em dicotiledôneas (Asterales, Campanulales e Lamiales) (Meier & Reid, 1982; Lewis, 1984), em briófitas e algas verdes. São também encontrados em fungos (*Aspergillus*) e bactérias (Lewis, 1984; Hendry & Wallace, 1993).

Nos vegetais superiores os frutanos estão localizados, principalmente, em órgãos subterrâneos de reserva, não sendo, porém restritos a essas estruturas. São encontrados, em

menores quantidades, em caules, folhas, inflorescências, frutos e sementes (Meier & Reid, 1982). Em gramíneas, os frutanos ocorrem nas bases de folhas e caules (Smith, 1973).

Hendry & Wallace (1993) estimaram a presença de frutanos em 15% das Angiospermas, sendo a maioria membros de 7 ordens: Poales (*Triticum*, *Avena*) e Liliales (*Allium*, *Asparagus*, *Gladiolus*), entre as monocotiledôneas, e Asterales (*Helianthus*, *Cichorium*), Campanulales, Dipsacales, Polemoniales e Ericales, entre as dicotiledôneas. Portanto, são grupos taxonômicos compreendendo numerosas espécies, distribuídas amplamente nas regiões temperadas, áridas e semiáridas do globo terrestre, onde a sazonalidade é bem definida (Figueiredo-Ribeiro, 1993; Hendry & Wallace, 1993).

Entre as famílias mencionadas por Hendry (1987), somente algumas têm sido estudadas mais profundamente, destacando-se Poaceae e Asteraceae (Pollock & Chatterton, 1988).

Na vegetação de cerrado, mais de 50% das espécies da família Asteraceae produzem frutanos do tipo inulina em seus órgãos subterrâneos (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986; Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993), cujo conteúdo varia amplamente, de 2,4% da massa seca em *Vernonia brevifolia* a 70% em *Vernonia herbacea* e em *Viguiera discolor* (Figueiredo-Ribeiro, 1993). Outras espécies de dicotiledôneas desse bioma, tais como *Gomphrena macrocephala* (Amaranthaceae), também acumulam elevados teores de frutanos do tipo fleanos em suas raízes tuberosas (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993). Esta foi a primeira referência da presença de frutanos na ordem Caryophyllidae.

Os frutanos são encontrados em diversas espécies de interesse econômico, incluindo cereais (trigo, cevada, etc.), ornamentais (dálías, tulipas, etc.), hortaliças (cebola, alho, alface, etc.) e forrageiras (*Lolium* e *Festuca*) (Hendry & Wallace, 1993). As maiores fontes comerciais de frutanos da série da inulina são raízes de *Dhalia* sp. e de *Cichorium intybus* e tubérculos de *Helianthus tuberosus*, todas da família asterácea de regiões temperadas. Dentre

essas espécies, *C. intybus* é a mais produtiva, podendo atingir 12 t/ha de inulina (Meier *et al.*, 1993).

A distribuição geográfica das famílias que apresentam espécies contendo frutanos é tão diversa que traz dúvidas a respeito de sugestões prévias de que os frutanos ocorrem principalmente em plantas de regiões temperadas (Figueiredo-Ribeiro, 1993). Deve-se considerar, ainda, que mesmo em climas frios a maioria das espécies não acumulam frutanos como polissacarídeo de reserva (Pollock & Chatterton, 1988). Hendry (1987) argumentou ser impossível encontrar as vantagens seletivas do metabolismo de frutanos apenas através da análise da distribuição geográfica das espécies.

2.3. Frutanos

2.3.1. Estrutura Molecular

Os frutanos são carboidratos de reserva conhecidos há aproximadamente 200 anos e, depois do amido e da sacarose, são os de maior ocorrência no Reino Plantae (Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Frutanos são polímeros de D-frutose relacionados estrutural e metabolicamente com a sacarose. Consistem de séries homólogas de oligo- e polissacarídeos não redutores, nos quais cada membro contém um resíduo a mais de frutose que o membro anterior (Edelman & Jefford, 1968). Esses polímeros de frutose carregam um resíduo de D-glicose unido por uma ligação α -1 \rightarrow 2, como na sacarose, geralmente localizado na extremidade da cadeia (Kandler & Hopf, 1980). Diferem dos demais polissacarídeos por serem levorrotatórios, altamente solúveis em água quente e insolúveis em etanol, bastante suscetíveis à hidrólise ácida e localizados exclusivamente nos vacúolos (Pollock & Chatterton, 1988).

O frutano mais simples é o trissacarídeo monofrutosil-sacarose. Três isômeros deste trissacarídeo (1-cestose, 6-cestose e neocestose) foram isolados e identificados quimicamente (fig. 2), formando a base de três séries homólogas de frutanos com diferentes padrões de ligação e configuração espacial.

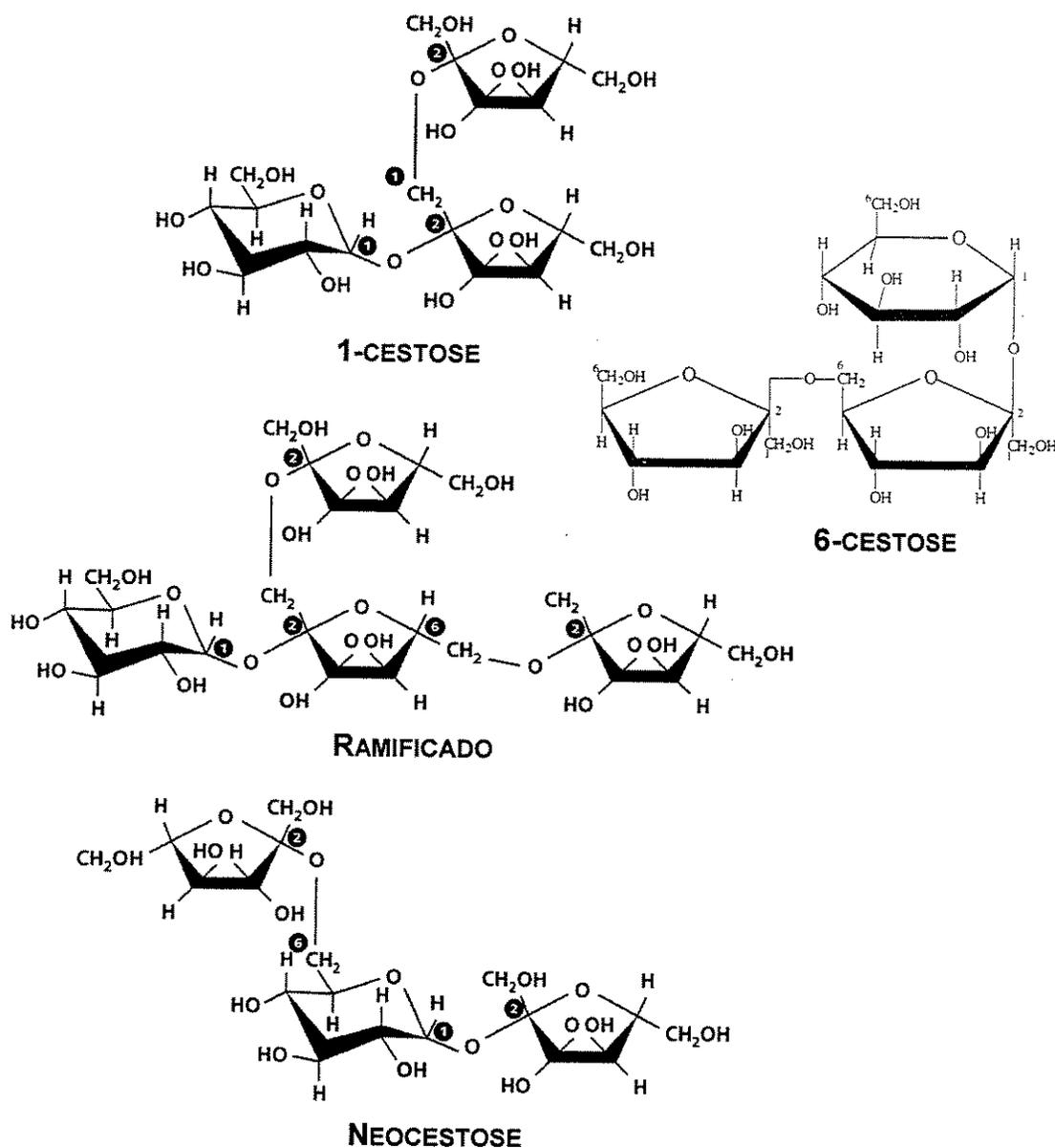


Figura 2. Estruturas de trissacarídeos e tetrassacarídeos que formam a base das principais séries homólogas de frutanos (Vijn & Smeekens, 1999; Van Laere & Van den Ende, 2002).

A série da 1-cestose (isocestose) consiste de cadeias lineares, contendo um resíduo de glicose na extremidade da cadeia e ligações β -2 \rightarrow 1 entre os resíduos de frutose (Edelman & Jefford, 1968), e é assim representada: G-1, 2-F-1, (2-F-1)_n, 2-F, onde G = glicose, F = frutose e n = número de frutose.

Os frutanos desta série são denominados inulina em associação ao gênero *Inula* no qual foram originalmente reportados (Rose, 1800 citado por Meier & Reid, 1980). São encontrados abundantemente em Asteraceae de regiões temperadas e de cerrado.

A série dos levanos ou fleanos, baseada no trissacarídeo 6-cestose consiste de cadeias lineares, contendo resíduos de frutose unidos através de ligações do tipo β -2 \rightarrow 6 (Albon *et al.*, 1953, citado por Kandler & Hopf, 1980), representada pela fórmula geral: G-1, 2-F-6 (2-F-6)_n, 2-F.

Os frutanos do tipo levano ou fleano são comumente encontrados em bactérias, gramíneas e mais recentemente, na família Amaranthaceae (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993). São assim denominados em referência ao gênero *Phleum* do qual foram originalmente extraídos (Pollock & Jones, 1979).

Uma outra série, a da neocestose, é baseada no trissacarídeo de mesmo nome, que difere dos outros dois isômeros por ter a glicose ligada a duas frutoses através dos carbonos 1 e 6 (Gross *et al.*, 1954). O alongamento da cadeia, neste caso, pode se dar pelos dois resíduos de frutose por ligações β -2 \rightarrow 1 e β -2 \rightarrow 6, uma vez que o resíduo de glicose está no interior do polímero. A série é assim representada: F-2, (1-F-2)_m, 1-F-2,6-G-1,2-F-1, (2-F-1)_n, 2-F, onde m = número de resíduos de frutose doados.

Frutanos deste tipo foram purificados e caracterizados estruturalmente a partir de *Asparagus officinalis* (Shiomi, 1981), e são bastante comuns na família Liliaceae.

Além desses três tipos básicos de frutanos, também foram encontrados outros tipos, contendo ligações mistas na mesma cadeia ou com estruturas altamente ramificadas com ligações β -2 \rightarrow 1 e β -2 \rightarrow 6 (Carpita *et al.*, 1991).

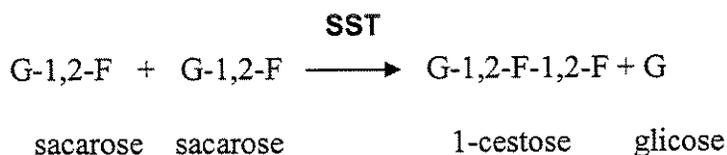
Os diversos componentes de uma série homóloga aparecem nos tecidos, em concentrações relativas diferentes, dependendo da época do ano e da espécie estudada. A massa molecular média depende do estágio fenológico da planta e das condições ambientais em que esta se encontra, mas o tamanho máximo dos fruto-polissacarídeos parece ser determinado geneticamente (Pollock & Chatterton, 1988).

O grau de polimerização (GP) dos frutanos pode variar de 3 até mais de 200 unidades. Em bactérias, o GP dos frutanos é de até 100 ou mais resíduos de frutose (Vijn & Smeekens, 1999). Os frutanos encontrados em *Helianthus tuberosus* possuem GP médio de 35 (Edelman & Jefford, 1968), em *C. intybus*, 65 (Praznik & Beck, 1985), e em *Avena sativa*, 10 (Pollock & Jones, 1979) podendo chegar ao GP máximo de 250 em algumas gramíneas. Nas espécies de cerrado, o GP dos frutanos é bastante variado, alcançando o valor de 35 em *V. herbacea* (Carvalho *et al.*, 1997), 70 em *Viguiera discolor* (Itaya *et al.*, 1999) e 230 em *Gomphrena macrocephala* (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993).

2.3.2. Biossíntese e Degradação

Os frutanos são sintetizados a partir da sacarose mediante a ação combinada de duas transferases: a sacarose:sacarose frutossil transferase (SST) e a frutano:frutano frutossil transferase (FFT), conforme observado inicialmente por Edelman & Jefford (1968) e confirmado mais tarde por outros autores.

A SST cataliza a reação irreversível para formação de 1-cestose, a partir de duas moléculas de sacarose, liberando uma molécula de glicose:



A glicose liberada pode ser subsequenteemente fosforilada e utilizada na síntese de sacarose.

A SST apresenta alta especificidade pela sacarose (Scott, 1968) e também foi detectada em espécies que apresentam frutanos de estrutura diferente da 1-cestose (Shiomi & Izawa, 1980).

A constante de Michaelis-Mentem da SST para a sacarose 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 frutanos é relacionado diretamente à concentração de sacarose livre no local de atuação da enzima (Pollock & Chatterton, 1988).

A outra enzima, a FFT, é responsável pelo alongamento da cadeia de frutano. Esta enzima cataliza a transferência reversível de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora (Pollock & Chatterton, 1988):



Onde, G-F = sacarose, n = unidades de frutose presentes na molécula doadora (n pode ser igual ou superior a 2), m = número de unidades de frutose da cadeia doadora receptora.

Nessa reação, a sacarose atua apenas como receptora de resíduos de frutose, enquanto a menor molécula doadora desses resíduos é a 1-cestose. Esta, por sua vez, da mesma forma que as moléculas maiores, atua tanto como doadora quanto como receptora de resíduos de frutose (Pollock & Chatterton, 1986).

Duas enzimas estão envolvidas no processo de degradação dos frutanos: a frutano:frutano frutossil transferase (FFT), através de sua atividade reversível de transferência de resíduos de frutose, e a frutanoexohidrolase (FEH), pela remoção sequencial e irreversível de resíduos terminais de frutose (Edelman & Jefford 1968):



Através dessa reação, o polímero é convertido de maneira irreversível em frutose e sacarose, uma vez que esta enzima não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose. Visto que os açúcares na planta são translocados sob a forma de sacarose, parte da frutose liberada por essa reação deve ser convertida a glicose, possibilitando a formação de novas moléculas de sacarose (Edelman & Jefford, 1968).

Edelman & Jefford (1968) sugeriram um modelo hipotético de compartimentação do metabolismo de inulina dentro das células. Segundo esse modelo a FFT estaria localizada no vacúolo, sendo aí o local de síntese e de armazenamento dos frutanos, enquanto a SST agiria no citosol. Trabalhos realizados com células de *Hordeum vulgare* (Wagner *et al.*, 1983; Wagner & Wiemken, 1986) e de tubérculos de *Helianthus tuberosus* (Frehener *et al.*, 1984) mostraram que as enzimas relacionadas à síntese e hidrólise de frutanos estão localizadas no vacúolo.

2.3.3. Função na Saúde Humana e Aplicação na Indústria de Alimentos

Os frutanos são de grande interesse econômico, devido às suas propriedades benéficas à saúde e sua aplicação na indústria de alimentos (Tomomatsu, 1994).

Os fruto-polissacarídeos são utilizados para a produção de xaropes ricos em frutose, pois em uma só etapa consegue-se obter aproximadamente 95% de frutose. Os concentrados de frutose são tradicionalmente produzidos a partir da hidrólise do amido em três etapas enzimáticas sucessivas, envolvendo Δ -amilase, amiloglicosidase e glicose isomerase, ou a partir da hidrólise da sacarose pela invertase, obtendo-se uma mistura final de glicose e frutose, na qual o teor de frutose representa aproximadamente 50% (Manzoni & Cavazzoni, 1992; Godfrey & West, 1996). O interesse em se produzir xaropes de frutose é devido, ainda, à maior solubilidade da frutose e por ser esta menos cariogênica que a sacarose. Além disso, baixos níveis de frutose podem ser metabolizados pelo organismo humano sem a necessidade de insulina (Nilsson *et al.*, 1988, Hidaka & Hirayama, 1991), podendo assim ser utilizada como adoçante alternativo em dietas de baixa caloria (Kosaric *et al.*, 1984).

Os frutanos são resistentes à hidrólise digestiva e atingem o cólon onde atuam como fonte de carbono para as bifidobactérias (Tomomatsu, 1994). A ação metabólica dessas bactérias sobre os frutanos resulta na secreção de compostos orgânicos inibitórios à proliferação de bactérias patogênicas, reduzindo dessa forma a incidência de doenças intestinais como o câncer de cólon (Coussement & Franck, 1998).

As bifidobactérias contribuem também para a produção de ácidos graxos de cadeias curtas (AGCC) que ao serem absorvidos pelo intestino, entram na circulação sanguínea diminuindo o conteúdo de triglicérides e colesterol. Há evidências de que os AGCC estimulem a absorção de cálcio, magnésio e ferro, promovendo a densidade mineral óssea e a recuperação das hemácias nos casos de anemia (Coussement & Franck, 1998). O aumento na secreção de AGCC pelas bifidobactérias é acompanhado pela diminuição do pH, atingindo níveis indesejáveis para as bactérias patogênicas, porém satisfatórios à proliferação das bifidobactérias, que são resistentes a meios ácidos (Tomomatsu, 1994).

Dessa forma, os frutanos são considerados probióticos, pois estimulam o crescimento de bactérias benéficas e, conseqüentemente, a menor incidência de doenças intestinais. As bifidobactérias também previnem a constipação por estimularem o peristaltismo intestinal, promovendo a eliminação da massa fecal (Tomomatsu, 1994).

A inulina apresenta uma série de propriedades físico-químicas de grande interesse para a indústria de alimentos. A sua elevada capacidade higroscópica, formando estruturas semelhantes a géis, faz desse ingrediente alimentar um excelente espessante de alimentos, permitindo o seu uso como substituto de gorduras (Silva, 1996). A possibilidade de ser utilizada como estabilizante de alimentos cooperou para que a inulina fosse empregada com sucesso em iogurtes, sorvetes e cremes, sendo hoje usada em mais de 450 produtos alimentícios. Seu uso é amplamente difundido em países da Europa, nos Estados Unidos e no Japão, onde é consumida como fibra alimentar.

A inulina tem papel de destaque nas pesquisas e na prática médica, visto ser considerada a substância ideal para a medida do ritmo de filtração glomerular. Tal propriedade decorre do fato de ser filtrada livremente pelos glomérulos, sem sofrer reabsorção ou secreção tubular (Brenner *et al.*, 1986), sendo por isso indicada na análise da função renal. No Brasil, a inulina comercial é importada e de custo elevado, inviabilizando seu uso rotineiro em pacientes nefropatas e nas pesquisas em fisiologia e farmacologia renal. Dias-Tagliacozzo *et al.* (1996) comprovaram que a inulina de *V. herbacea* pode ser utilizada, em substituição à inulina comercial, nas medidas do ritmo de filtração glomerular.

2.3.4. Influência de Fatores Ambientais e Condições Nutricionais

Além de atuarem como reserva de carbono, os frutanos têm sido considerados importantes reguladores osmóticos em plantas que passam por baixa temperatura temporária,

agindo como crioprotetores. Entretanto, Pollock *et al.* (1988) mostraram que os frutanos não seriam suficientes para reduzir o ponto de congelamento celular, permanecendo a dúvida sobre a real função dos frutanos na resistência ao frio. De fato, a maioria das espécies de clima temperado e resistente à baixa temperatura não acumula frutanos como polissacarídeo de reserva (Pollock & Chatterton, 1988).

Na fase de início de dormência, Dias-Tagliacozzo *et al.* (1999) observaram aumento de fruto-oligo e -polissacarídeos em rizóforos de plantas de *V. herbacea* mantidas em baixa temperatura. Sob essa mesma condição, a sacarose aumentou, sugerindo que baixas temperaturas favorecem a translocação desse dissacarídeo da parte aérea, estimulando o acúmulo de frutanos nos rizóforos. Análises qualitativas dos frutanos mostraram uma tendência à polimerização em condições de baixa temperatura (Dias-Tagliacozzo *et al.*, 1999), diferindo daqueles observados em outras espécies de Asteraceae de regiões temperadas, nas quais as baixas temperaturas promovem a despolimerização dos frutanos (Edelman & Jefford, 1968). Dias-Tagliacozzo *et al.* (1999) também mostraram que a ação da temperatura baixa tem efeito retardador no processo de despolimerização em plantas de *V. herbacea* na fase de brotação. Nessa fase fenológica, Carvalho & Dietrich (1993) verificaram grande mobilização dos frutanos e aumento da frutose livre, em função da demanda da parte aérea.

A hipótese de que os frutanos desempenham papel osmoregulador em condições de deficiência hídrica é sustentada por diversos autores (Thomas & Evans, 1989; Hendry & Wallace, 1993). A resistência de algumas plantas ao déficit hídrico parece estar relacionada ao acúmulo de carboidratos solúveis, incluindo frutanos de baixa massa molecular (Virgona & Barlow, 1991), além da sacarose e frutose, que reduzem o potencial osmótico (Thomas & Evans, 1989).

Freqüentemente, a atividade das enzimas envolvidas em reações de hidrólise de frutanos aumenta durante o déficit hídrico (Hsiao, 1973). Em *V. herbacea*, a ausência de água

parece ter provocado a hidrólise de fruto-polissacarídeos, uma vez que grandes proporções de frutose livre foram liberadas (Dias-Tagliacozzo, 1995). Essas informações indicam que os frutanos poderiam ter alguma função no processo de regulação osmótica nessa espécie.

Mais recentemente, a presença de frutanos também foi associada ao estresse nutricional. De modo geral, a baixa concentração de nitrogênio elevou o conteúdo de frutanos em raízes tuberosas de *C. intybus* (Van den Ende *et al.*, 1999) e em rizóforos de *V. herbacea* (Teixeira *et al.*, 1997), confirmando observações de Pollock & Jones (1979) de que o longo período de exposição à limitação de nitrogênio pode estimular o acúmulo de frutanos.

Alguns estudos mostraram que o efeito da deficiência nutricional no conteúdo de frutanos depende, também, do estágio de desenvolvimento vegetal. Para espécies de Asteraceae e Poaceae de regiões temperadas, a relação inversa entre o conteúdo de frutanos e nitrogênio ocorre, principalmente, na fase de maior acúmulo de frutanos (Tilberg, 1996; Améziane *et al.*, 1997a,b; Wang & McGrath *et al.*, 1997; Van den Ende *et al.*, 1999).

Em plantas adultas de *C. intybus*, a deficiência de nitrogênio reduziu a razão parte aérea:raiz e aumentou a proporção de ^{14}C translocado para as raízes tuberosas (Améziane *et al.*, 1995), simultaneamente ao aumento na capacidade de síntese de frutanos.

Considerando-se que a síntese de frutanos é mediada pelas enzimas SST e FFT, Améziane *et al.* (1997a,b) ressaltaram que a atividade dessas enzimas pode aumentar quando os níveis exógenos de nitrogênio são baixos. De fato, Van den Ende *et al.*, (1999) verificaram, em *C. intybus*, que as atividades da SST e da FFT foram maiores em plantas tratadas com baixo suprimento de nitrogênio; porém a atividade dessas enzimas diminuiu quando as plantas foram transferidas para meio enriquecido de nitrogênio. Améziane *et al.* (1995,1997a,b,c) também verificaram maior atividade da SST, em *C. intybus*, reduzindo a concentração de nitrato.

O mecanismo de ação do nitrato regulando a partição de carbono e a atividade das sintetases de frutanos ainda não é bem compreendido. Tem sido sugerido que o nitrato, em baixas concentrações, agiria diretamente como um sinalizador, modulando a expressão gênica das sintetases de frutanos (Améziane *et al.*, 1997a,b,c), ou indiretamente, alterando a partição de carboidratos entre parte aérea e parte subterrânea (Crawford, 1995).

Um modelo do mecanismo de ação do nitrato na partição de carbono foi apresentado por Chapin *et al.*, (1988). De acordo com esses autores, sob deficiência nutricional, a sacarose é pouca utilizada para o limitado crescimento vegetativo, vindo a se acumular nas folhas. Esse aumento na concentração de sacarose provoca o aumento na força da fonte e exerce o impulso necessário para o carregamento do floema, facilitando a translocação dos carboidratos em direção aos órgãos-dreno.

Portanto, nas condições em que o crescimento da parte aérea é afetado, mais carbono estará disponível para armazenamento em órgãos de reserva, principalmente nas fases mais adiantadas de senescência e acúmulo de frutanos.

O suprimento diferencial de nitrogênio também alterou as frações de frutanos em *C. intybus* (Van den Ende *et al.*, 1999), *V. herbacea* (Teixeira *et al.*, 1997) e *Polymnia sonchifolia* (Tsukinhashi *et al.*, 1991). Para essas espécies, a maior disponibilidade de nutrientes levou à diminuição na proporção de frutanos de cadeia longa, indicando que a degradação dos fruto-polissacarídeos ocorre para atender à demanda da parte aérea. Da mesma forma, Carvalho *et al.*, (1998) notaram uma diminuição nos fruto-polissacarídeos de GP>8 em relação aos fruto-oligofrutanos (GP 3-8) em plantas de *V. herbacea* com dois anos de cultivo sob adubação mineral. Tais resultados confirmam a hipótese de que fatores externos podem modificar a distribuição das classes moleculares de frutanos (Pollock, 1986).

3. OBJETIVOS

Considerando a importância econômica e ecológica dos frutanos mencionada anteriormente e a carência de informações sobre a fisiologia de crescimento em espécies nativas de cerrado, com enfoque no metabolismo de carboidratos de reserva, o presente estudo foi realizado tendo como principal objetivo avaliar, em *V. herbacea*, o efeito do nitrogênio no metabolismo de frutanos e nos processos fisiológicos de crescimento, de forma a fornecer subsídios para a utilização dessa espécie do cerrado.

4. CAPÍTULO 1

Artigo 1 - **SOLUÇÕES NUTRITIVAS PARA CULTIVO DE *Vernonia herbacea* (VELL.)**

RUSBY

SOLUÇÕES NUTRITIVAS PARA CULTIVO DE PLANTAS DE *Vernonia herbacea*
(VELL.) RUSBY

GERALDO ROGÉRIO FAUSTINI CUZZUOL¹

MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO²

LILIAN BEATRIZ PENTEADO ZAIDAN²

PEDRO ROBERTO FURLANI³

Título resumido: **Soluções Nutritivas em *V. herbacea***

1. Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Biológicas, 29060-900
Vitória, ES, Brasil.

2. Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil.

3. Instituto Agrônomo de Campinas, Caixa Postal 28, 13001-970 Campinas, SP, Brasil.

1. Autor para correspondência: cuzzuol@npf.ufes.br

RESUMO

Algumas espécies nativas de cerrado apresentam crescimento limitado ou não sobrevivem por longos períodos quando cultivadas em solução de Hoagland. Em plantas de *Vernonia herbacea*, a solução de Hoagland inibiu o crescimento dos rizóforos, órgãos subterrâneos que acumulam altas concentrações de frutanos do tipo inulina. Este resultado levou à formulação de uma solução nutritiva para o cultivo de *V. herbacea*, visando ao incremento da biomassa dos rizóforos e à produção de frutanos. Essa solução (denominada Vernonia), é constituída de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mmol/L, KNO_3 2,3 mmol/L, KH_2PO_4 0,52 mmol/L, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,7 mmol/L e Na_2SO_4 1,3 mmol/L, e seu efeito nas plantas foi comparado ao da solução de Hoagland. Ambas soluções foram ensaiadas em três forças iônicas: 50, 100 e 200%, com valores correspondentes de condutividade elétrica (mS/cm) de 1,93 para Hoagland 50%; 0,77 para Vernonia 50%; 3,46 para Hoagland 100%; 1,28 para Vernonia 100%; 5,68 para Hoagland 200% e 2,30 para Vernonia 200%. As plantas foram cultivadas em vasos (1L) contendo areia lavada e receberam, semanalmente, 50 ml das soluções nutritivas com pH ajustado para 5,5-6,0. Duas avaliações trimestrais foram realizadas para análise de crescimento e conteúdo de frutanos. As plantas que receberam solução de Hoagland 200% morreram antes de completar dois meses de idade. A solução Vernonia 50% foi a mais eficiente para o incremento da biomassa dos rizóforos e produção de frutanos por planta, após seis meses de cultivo. Por outro lado, maior crescimento da parte aérea ocorreu nas soluções de Hoagland 100% e de Vernonia 100%. Comparando a solução de Hoagland, com a de Vernonia, esta é mais pobre em macronutrientes. Os resultados obtidos reforçam a hipótese de que plantas adaptadas aos solos oligotróficos são menos exigentes quanto à disponibilidade de nutrientes minerais para seu crescimento.

ABSTRACT

Some species native to the cerrado show limited growth or can not survive for long periods of time when cultivated in Hoagland solution. In *V. herbacea*, Hoagland solution prevented growth of rhizophores, the underground organs that accumulate high concentrations of fructans of the inulin type. This result led us to define a nutrient solution specially formulated for the cultivation of *V. herbacea*, aiming the increase of the rhizophore biomass and fructan production. This solution, named Vernonia, is comprised of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.5 mmol/L, KNO_3 2.3 mmol/L, KH_2PO_4 0.52 mmol/L, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.7 mmol/L and Na_2SO_4 1.3 mmol/L, and its effect on plants was compared to that of Hoagland solution. Three different ionic strengths: 50, 100 and 200% solutions with corresponding conductivity values (mS/cm) of 1.93 for 50% Hoagland; 0.77 for 50% Vernonia; 3.46 for 100% Hoagland; 1.28 for 100% Vernonia; 5.68 for 200% Hoagland and 2.30 for 200% Vernonia were assayed. Plants were cultivated in 1L pots containing washed sand and received weekly 50 ml of growth solutions with the pH previously adjusted to 5.5-6.0. The effect of the solutions on plant growth and fructan content was evaluated twice in a six-month period. Plants did not survive up to two months when cultivated in 200% Hoagland solution. The 50% Vernonia solution was the most effective for rhizophore biomass increase and fructan production per plant after 6 months of cultivation. On the other hand, growth of aerial organs was promoted in 100% Hoagland solution and 100% Vernonia solution. Compared to Hoagland solution, the Vernonia solution contains less macronutrients. The data obtained give support to the hypothesis that plants adapted to the oligotrophic soils of the cerrado, as *Vernonia herbacea*, demand less mineral nutrients to achieve both growth and fructan production.

INTRODUÇÃO

Desde o século dezenove, as soluções nutritivas vêm sendo amplamente usadas em estudos de fisiologia vegetal, especialmente naqueles sobre metabolismo radicular (Parker & Norvell, 1999) e nos mecanismos que coordenam o crescimento vegetal (Hoagland & Arnon, 1938).

Diversas soluções nutritivas já foram propostas em pesquisas de nutrição mineral de plantas, havendo, em alguns casos, diferenças marcantes entre elas com respeito aos macronutrientes (Furlani *et al.*, 1999). Hewitt (1966, citado por Benton Jones, 1982), listou 160 fórmulas diferentes de soluções nutritivas. No entanto, grande parte dessas novas formulações são modificações introduzidas à solução original de Hoagland. Dentre todas, a solução de Hoagland é a que tem sido mais usada na investigação de problemas nutricionais de plantas, e configura-se como a base para a formulação de inúmeras soluções nutritivas comerciais (Furlani *et al.*, 1999).

Contudo, segundo Hoagland & Arnon (1938), não há uma composição nutritiva melhor do que outra, pois as plantas possuem grande capacidade de adaptação às diferentes condições nutricionais. Porém, novas composições têm surgido com intuito de melhorar a produção vegetal, principalmente em cultivo hidropônico. De modo geral, a maioria delas permitiu o crescimento adequado das plantas (Martinez, 1997).

Inicialmente, a composição química de uma solução nutritiva consistia em simular a constituição da solução do solo fornecendo água e nutrientes minerais para a planta (Parker & Norvell, 1999). Na atualidade, a composição da solução nutritiva tem-se baseado, preferencialmente, na composição química das folhas (Parker & Norvell, 1999) por serem elas os órgãos que melhor refletem o estado nutricional da planta (Malavolta *et al.*, 1997). Com isso, a concentração dos elementos químicos da solução passa a ser superior à do solo, e

menos sujeita ao esgotamento pela absorção radicular (Epstein, 1972). Segundo Martinez (1997), as maiores diferenças entre esses dois tipos de solução diz respeito ao N, P e K cujas concentrações numa solução elaborada a partir da composição química foliar são muito superiores em relação à da solução de um solo fértil, enquanto diferenças de menor amplitude são relatadas para os demais macronutrientes.

Embora os resultados, em sua grande maioria, sejam satisfatórios para os cultivares agrícolas tratados com a solução de Hoagland, cabe ressaltar que essa formulação foi desenvolvida a partir das exigências nutricionais do tomateiro, o que deve ser considerado em estudos nutricionais em espécies nativas, principalmente aquelas oriundas de solos pobres em nutrientes. Outro aspecto que merece atenção em trabalhos de nutrição mineral, é o tipo de planta, pois a constituição química é bastante divergente, tanto na vegetação de diferentes biomas como nos diversos grupos de cultivares agrícolas (tabela 2). De modo geral, plantas de ambientes oligotróficos como o de restinga, manguezal e cerrado acumulam menos nutrientes em relação aos cultivares agrícolas refletindo, desse modo, o estado nutricional do solo em que se encontram.

Buscando compreender o comportamento nutricional de espécies de cerrado na fase de crescimento inicial, estudos foram conduzidos adicionando-se solução de Hoagland ao solo de cerrado. Os resultados mostraram que essa prática não favoreceu o crescimento de arbóreas. Pelo contrário, quanto maior a força iônica da solução, uma redução no crescimento foi observada (Godoy-Aveiro & Felipe, 1992), chegando em alguns casos, a provocar toxidez das plantas. Solução de Hoagland em 100% de sua força iônica levou à morte a arbórea *Dalbergia miscolobium* (Sasaki & Felipe, 1998). Efeito similar também foi observado por Felipe & Dale, (1990) com plantas de *Qualea grandiflora* ao adicionarem solução nutritiva de Hoagland diluída 10 vezes, mas com o nível de fósforo superior ao do solo de cerrado. Em *D. miscolobium*, melhor crescimento foi obtido em solução de Hoagland diluída duas vezes

com partição preferencial de matéria seca para a parte aérea (Sasaki & Felipe, 1998), e em *Q. grandiflora* maiores taxas de crescimento foram observadas (Paulilo & Felipe, 1995).

Os escassos resultados com herbáceas de cerrado apontam para efeito promocional no crescimento da parte aérea quando solução nutritiva é aplicada. *Bidens gardneri* (Asteraceae) cresceu em resposta à adição da solução de Hoagland no solo, numa relação diretamente proporcional entre a força iônica da solução e as medidas de crescimento (Klein *et al.*, 1996). Embora em *Vernonia herbacea*, outra Asteraceae herbácea nativa de cerrado, a massa seca da parte aérea tenha sido maior em plantas que receberam solução de Hoagland completa, a massa seca de seus rizóforos não aumentou em relação às plantas destituídas de nutrientes (Teixeira *et al.*, 1997).

Rizóforos de *V. herbacea* são órgãos subterrâneos ricos em frutanos (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986; Carvalho & Dietrich, 1993). Frutanos são polímeros de frutose que parecem estar associados a mecanismos de resistência à baixa temperatura e/ou dessecação (Hendry & Wallace, 1993) e também à deficiência nutricional (Améziane *et al.*, 1997; McGrath *et al.*, 1997). Devido às suas propriedades nutricionais e medicinais, o uso de frutanos tem sido recomendado nas dietas de baixa caloria, na prevenção de doenças intestinais, e no tratamento da osteoporose (Tomomatsu, 1994).

A inibição do crescimento dos rizóforos de *V. herbacea* em solução de Hoagland (Teixeira *et al.*, 1997) levou à condução deste trabalho, com vistas ao incremento da biomassa dos rizóforos, e dos frutanos armazenados nesses órgãos de reserva. Para tanto, foi avaliado o efeito da solução elaborada especificamente para *V. herbacea*, em suas diferentes forças iônicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento - Plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) foram obtidas por propagação vegetativa a partir de fragmentos de rizóforos de plantas coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu, São Paulo (22° 35'S e 47° 44'W). Foram selecionadas plantas de tamanho uniforme (± 5 cm de altura) aos 50 dias após a brotação dos rizóforos cultivados em bandejas com areia lavada. As plantas foram transferidas para vasos plásticos (1L) contendo areia lavada como substrato, e submetidas às condições de luz, temperatura e fotoperíodo natural em casa de vegetação, com médias de temperatura mínima e máxima anual de 18°C e 31°C, respectivamente. O experimento teve início em outubro de 2000 e finalizou em março de 2001.

Conforme a análise química de plantas de *V. herbacea* (tabela 1) realizada pelo Laboratório do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e Recursos Ambientais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), São Paulo, foi elaborada uma solução nutritiva específica para essa espécie, de acordo com a sua constituição química foliar, onde os valores expressos em mg/L são: N-NO₃⁻ (150), P (16), K (102), Ca (87), Mg (40) e S (43). Para essa solução, denominada Vernonia, usaram-se os seguintes sais: Ca(NO₃)₂.4H₂O 2,5 mmol/L, KNO₃ 2,3 mmol/L, KH₂PO₄ 0,52 mmol/L, Mg(NO₃)₂.6H₂O 1,7 mmol/L e Na₂SO₄ 1,3 mmol/L. Os sais de micronutrientes foram acrescentados de acordo com a solução de Hoagland & Arnon (1938).

O efeito dessa solução no crescimento e no conteúdo de frutanos foi comparado com o da solução de Hoagland, utilizando-se 50%, 100% e 200% da força iônica de ambas as soluções. A condutividade elétrica de cada solução, determinada em mS/cm no condutivímetro

Digimed CD-20, foi a seguinte: 50% Hoagland: 1,93; 50% Vernonia: 0,77; 100% Hoagland: 3,46; 100% Vernonia: 1,28; 200% Hoagland: 5,68 e 200% Vernonia: 2,30.

O pH das soluções foi ajustado para 5,5-6,0 com KOH 1N. Cada planta recebeu, semanalmente, 50 ml da solução e, no dia anterior à aplicação dos tratamentos, as plantas foram regadas com água destilada para evitar a salinização do substrato e dessecação das plantas.

Análise de crescimento - Para as análises de crescimento, foram utilizadas seis plantas por tratamento para medidas de altura do maior ramo, massa de matéria seca dos órgãos aéreos e subterrâneos, número de folhas e área foliar total. A massa seca foi determinada após a secagem do material em estufa a 60°C até obtenção da massa constante. A área foliar foi calculada através do software “Area Leaf & Analysis” da Skye Instruments Ltd. (1993). As análises foram feitas após três e seis meses de cultivo. A partir desses dados, foram calculadas as taxas de crescimento de acordo com Hunt (1982). A taxa de crescimento relativo (TCR) foi calculada de acordo com a equação $(LnM_2 - LnM_1) / (t_2 - t_1)$, a taxa de assimilação líquida (TAL) pela fórmula $TAL = [(LnA_2 - LnA_1) / (A_2 - A_1)] \times [(M_2 - M_1) / t_2 - t_1]$, a razão de área foliar (RAF) pela relação entre área foliar e a massa seca total da planta ($RAF = A / M$) e a massa foliar específica (MFE) calculada pela razão M_{foliar} / A .

Onde, M = massa de matéria seca total, M_2 = massa de matéria seca total atual, M_1 = massa de matéria seca total inicial, M_{foliar} = massa foliar total, A = área foliar total, A_2 = área foliar atual, A_1 = área foliar inicial, $t_2 - t_1$ = intervalo de tempo entre duas coletas, Ln = logaritmo natural.

Com os dados de massa de matéria seca da parte aérea e da parte subterrânea foi determinada a razão parte aérea:parte subterrânea.

Extração e análise de carboidratos solúveis - Os carboidratos solúveis foram extraídos segundo o método descrito por Carvalho *et al.* (1998), a partir de seis amostras de rizóforos (1,0 g de matéria fresca para cada planta). As amostras foram fragmentadas, fervidas em etanol 80% por 3 minutos para desnaturação enzimática. Em seguida, foram maceradas em almofariz, aquecidas em banho-maria a 80°C por 15 minutos e centrifugadas a 1000 g por 10 minutos à temperatura ambiente. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes como descrito anteriormente e então submetido duas vezes a extração aquosa por 30 minutos a 60°C, homogenizados e filtrados à vácuo, em tecido algodão. Os sobrenadantes da fração etanólica e aquosa foram reunidos, constituindo o extrato de frutanos totais, o qual foi concentrado em rotoevaporador, a 40°C. O conteúdo de frutose livre e combinada presente nos extratos foi estimado pela reação de antrona, modificada para cetoses (Jermyn, 1956), usando-se frutose (Sigma) como padrão.

Análise estatística – Os efeitos dos tratamentos foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% e 5% no software Sanest (Zonta *et al.*, 1984).

RESULTADOS

Os resultados da composição química em plantas de *V. herbacea* encontram-se na tabela 1. Nota-se um gradiente de concentração de nitrogênio no sentido rizóforos-folha, sendo o conteúdo foliar correspondente a cerca de quatro vezes o valor encontrado nos rizóforos. O caule acumulou maior teor de K, entre os macronutrientes, e de Fe, entre os micronutrientes, chegando esse último ao valor de 1420 mg/kg. Para os demais elementos, as maiores concentrações foram observadas nas folhas. Em relação aos cultivares agrícolas (hortaliças, leguminosas, raízes e tubérculos), o teor de N e P foliar de *V. herbacea* foi inferior, mas superior ao encontrado em arbóreas de manguezal e de restinga (tabela 2).

A concentração de macronutrientes na solução Vernonia é inferior à de Hoagland, apresentando a metade dos valores de P, K, Ca e S (tabela 3). As soluções de Hoagland e Vernonia possuem as concentrações de elementos químicos muito superiores às encontradas na solução de um solo fértil. Maiores diferenças foram observadas no teor de P cujo valor foi cerca de 125 e 250 vezes maior na solução Vernonia e na solução de Hoagland, respectivamente.

Plântulas de *V. herbacea* cultivadas com solução de Hoagland em 200% de força iônica mostraram efeito tóxico seguido de morte antes de completar dois meses de idade, enquanto aquelas tratadas com as demais soluções sobreviveram até o final do experimento (180 dias).

O efeito das soluções nutritivas nas medidas foliares de *V. herbacea* é apresentado na fig. 1. Diferenças significativas só foram manifestadas aos 180 dias de cultivo quando as soluções de Hoagland e Vernonia mais enriquecidas, especialmente aquelas completas (100% de força iônica), elevaram o número de folhas e a área foliar total. No entanto, maior área

foliar por folha foi proporcionada pelas soluções mais pobres (50% da força iônica), destacando-se a solução Vernonia.

Efeito similar foi observado para a produção de matéria seca, com diferenças significativas ocorrendo aos 180 dias (fig. 2). Novamente, as soluções de Hoagland e Vernonia mais ricas em nutrientes elevaram a produção de massa seca da parte aérea não havendo diferenças significativas entre elas. Já para a raiz, essa diferença foi significativa, com maior valor observado em plantas submetidas à solução Vernonia completa. Soluções mais pobres em nutrientes minerais estimularam maior partição de biomassa para os rizóforos, especialmente a solução Vernonia em 50% de força iônica, em que as plantas chegaram a produzir 12 g de massa seca de rizóforos em 180 dias. Do mesmo modo, a razão rizóforo:parte aérea foi maior nas soluções mais diluídas, com destaque para a solução Vernonia em 50% de força iônica (fig. 3). Comportamento similar foi verificado na razão raiz:parte aérea, porém, aos 90 dias, essa razão apresentou valor maior na solução Vernonia mais enriquecida, apesar de não ser estatisticamente diferente das soluções de Hoagland e Vernonia diluídas 50%.

Esses resultados refletiram na TAL, e muito pouco na TCR (tabela 4). Valores mais elevados de TCR para caule e raiz foram obtidos em soluções completas de Hoagland e Vernonia, enquanto para folha, rizóforos e planta nenhuma diferença foi observada. O valor médio da TCR para plantas de *V. herbacea* foi cerca de 0,0230 g/g/d. Para a TAL, o valor mais elevado (0,0074 g/cm²/d) foi encontrado na solução Vernonia diluída à metade de sua força iônica.

Analisando o efeito das soluções nutritivas na altura (fig. 4), nota-se melhor desempenho das plantas quando receberam soluções mais ricas, principalmente na de Hoagland com 100% de força iônica.

A disponibilidade de nutrientes influenciou distintamente na massa foliar específica (MFE) somente aos 90 dias (fig. 5), quando soluções mais ricas em minerais elevaram os

valores da MFE. Quanto à RAF, nenhuma diferença significativa foi verificada entre as soluções nos dois períodos de análise. Uma relação inversa pode ser constatada entre essas duas medidas. Enquanto a MFE aumentou, expressivamente, aos 90 dias, a RAF diminuiu com a idade das plantas.

Uma nítida variação no conteúdo de frutanos foi verificada (fig. 6). Se por um lado, plantas tratadas com solução Vernonia em 200% de força iônica mostraram maior concentração de frutose aos 90 dias de cultivo, por outro, ocorreu aumento do conteúdo de frutose aos 180 dias nas plantas que receberam soluções mais pobres em nutrientes. Esses resultados refletiram na produção de frutanos por planta nas quais melhor rendimento foi registrado nos tratamentos com soluções mais pobres em nutrientes no final do experimento (fig. 6), especialmente, na solução Vernonia em 50% de força iônica.

DISCUSSÃO

Soluções nutritivas menos concentradas promoveram maior crescimento dos órgãos subterrâneos em detrimento dos órgãos aéreos, o que refletiu na razão órgãos subterrâneos:parte aérea (fig. 2 e 3). Desse modo, soluções mais diluídas, especialmente a Vernonia, proporcionaram maior ganho de massa de rizóforos e, conseqüentemente, maior razão rizóforo:parte aérea. Resultado similar foi observado no crescimento inicial da arbórea *D. miscolobium* em que a razão raiz:parte aérea aumentou com a diminuição da força iônica da solução nutritiva de Hoagland (Sasaki & Felipe, 1998), confirmando Chapin (1980) ao afirmar que essa razão é maior sob deficiência nutricional.

De acordo com Lambers *et al.* (1998), a TCR reflete a eficiência da planta em produzir matéria seca (TAL) e área assimilatória (RAF). Apesar dos baixos valores da TAL, verificados nas soluções mais ricas em nutrientes, e dos valores constantes da RAF, esses resultados não influenciaram a TCR da planta, pois nenhuma diferença foi observada nessa taxa entre as soluções testadas (tabela 4). Isso sugere que o status nutricional do solo parece não afetar a velocidade de crescimento em *V. herbacea*, e que a TAL, dessa espécie, seja o componente mais sujeito às variações ambientais. O baixo potencial de TCR em *V. herbacea* sustenta a hipótese de que espécies nativas adaptadas a solos pobres em nutrientes mostram baixa taxa de crescimento, mesmo quando a disponibilidade de nutrientes se torna maior (Lambers & Poorter, 1992; Marschner, 1995; Lambers *et al.*, 1998).

Diferentemente, Sasaki & Felipe (1998) relataram baixa taxa de crescimento em plantas jovens de *D. miscolobium* em deficiência nutricional e que isso não parece estar relacionado à baixa taxa fotossintética, uma vez que os valores da TAL foram maiores quando nenhum nutriente foi adicionado, mas sim aos baixos valores da RAF. Possivelmente, essas respostas estejam relacionadas às diferenças entre plantas arbóreas e herbáceas quanto às

exigências nutricionais. Comparadas às arbóreas de cerrado, o conteúdo de Mg e S, em *V. herbacea* foi cerca de quatro e oito vezes maior, respectivamente (tabela 1 e 2).

Como afirmado anteriormente, as condições nutricionais do solo parecem influir muito pouco na taxa de crescimento, mas sim na espessura da folha em *V. herbacea*, uma vez que a MFE foi maior, aos 90 dias, nas soluções mais ricas em nutrientes (fig. 5). Esse comportamento sugere uma eficiente adaptação das plantas de *V. herbacea* no sentido de otimizar o uso de nutrientes e carboidratos que são armazenados nas folhas quando a oferta de nutrientes se torna satisfatória para o crescimento, para posterior utilização quando às condições nutricionais forem deficitárias, à semelhança de outras plantas nativas (Chapin, 1980). Os carboidratos retidos na folha, aqui representados pela MFE, poderiam mostrar-se inibitórios à fotossíntese, como verificado em *V. herbacea*, dada à baixa TAL nas soluções de Hoagland e Vernonia, mais ricas em nutrientes.

É conhecido que a deficiência nutricional promove aumento na concentração de ácido abscísico (ABA), limitante da extensibilidade de parede celular e, conseqüentemente, da expansão foliar (Chapin, 1980, 1988). Segundo esse autor, o crescimento limitado da parte aérea sob restrição nutricional, reduziria o consumo de carbono que, ao se acumular nas folhas, agiria como inibidor da fotossíntese. No entanto, em *V. herbacea*, o que se verificou foi maior área foliar unitária nas soluções menos concentradas em nutrientes minerais (fig. 1), efeito esse também constatado por Gomes & Shepherd (2000) em plantas de *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae) cultivadas *in vitro*. Esse comportamento diferencial sugere um eficiente mecanismo fisiológico capaz de maximizar a interceptação luminosa para produção de fotossintatos em quantidade suficiente para atender à demanda do limitado crescimento da parte aérea sob restrição nutricional. Esse procedimento é indicativo da maior eficiência na utilização dos nutrientes em *V. herbacea* sob deficiência mineral, uma vez que, segundo Marschner (1995), um dos efeitos manifestado pelo nitrogênio é promover a expansão foliar.

Uma outra forma de *V. herbacea* contornar a deficiência mineral está na redução da emergência de novas folhas, o que refletiu na menor área foliar total.

Geralmente, a razão Ca:Mg está em torno de 2 a 4 na maioria das soluções nutritivas e em algumas soluções de solo (Parker & Norvell, 1999). No entanto, semelhante ao solo de cerrado (tabela 5), a solução Vernonia possui Ca:Mg menor que 2, indicando deficiência de Ca e/ou toxicidade de Mg (Proctor, 1970). Essa característica pode ser um indicativo das preferências ecológicas de *V. herbacea* por solos pobres em bases trocáveis.

A análise do solo de cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu (tabela 5) onde *V. herbacea* se desenvolve naturalmente, mostrou que, apesar de algumas variações para o P, Ca^{2+} e Mg^{2+} , a espécie cresce em solo ácido, pobre em P e bases trocáveis, características essas decorrentes da sua origem geológica e da ação do intemperismo e da lixiviação, que causam perda por dissolução de Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , PO_4 e N, resultando em um aumento da acidez do solo (Goodland & Ferri, 1979). Com a acidez, ocorre aumento da solubilidade de íons Al^{3+} (Malavolta & Kliemann, 1985), confirmado pelos elevados teores de Al^{3+} trocável (os valores são considerados altos quando acima de $10,0 \text{ mmol}_c/\text{dm}^3$). A baixa saturação de bases e a capacidade de troca catiônica (CTC) indicam que, provavelmente, a matéria orgânica seja a principal fração envolvida na formação de cargas negativas e troca de cátions neste solo (Gomes & Shepherd, 2000).

Se por um lado soluções mais ricas em nutrientes promoveram o crescimento da parte aérea, o conteúdo de frutanos foi menor, confirmando os resultados apresentados por Teixeira *et al.* (1997) em plantas de *V. herbacea* cultivadas em solução completa de Hoagland. Esses mesmos autores argumentaram que o crescimento dos órgãos aéreos estimulados pela maior disponibilidade de nutrientes poderia restringir os assimilados nas folhas, como indicado pelos maiores valores da MFE, aos 90 dias, em plantas submetidas às soluções mais ricas em nutrientes (fig. 5). Isto resultaria em baixa translocação de assimilados para os rizóforos e,

conseqüentemente, baixa síntese de frutanos. Pollock (1986) demonstrou que o acúmulo de frutanos é inibido pelas condições favoráveis ao crescimento, como a maior fertilidade do solo. Sob essas condições, a maior disponibilidade de nutrientes no substrato seria a causa da maior atividade de hidrólise de frutanos nos rizóforos, disponibilizando maior poder energético (sacarose) para o crescimento dos órgãos aéreos em *V. herbacea* (Teixeira *et al.*, 1997).

Embora muitas espécies adaptadas a solos oligotróficos respondam ao aumento da adição de nutrientes no solo (Chapin, 1980), elas possuem um baixo limite de tolerância aos níveis mais elevados de nutrientes, como verificado em *V. herbacea*, onde efeito letal foi manifestado em resposta à aplicação da solução de Hoagland concentrada, ainda na fase de crescimento inicial, e efeito inibitório no crescimento de rizóforos em soluções com força iônica acima da solução completa Vernonia (fig. 2).

O efeito tóxico da solução de Hoagland em 200% de força iônica sobre *V. herbacea* também foi observado em plantas jovens de *Q. grandiflora* por Felipe & Dale (1990) e de *D. miscolobium* (Sasaki & Felipe, 1998), porém na solução de Hoagland em 100% de força iônica, entre 60 e 90 dias de cultivo. Por outro lado, plantas de *B. gardneri*, uma espécie herbácea de cerrado, cresceram melhor na solução de Hoagland em 200% de força iônica (Klein *et al.*, 1996). A causa da mortandade nos casos acima referidos ainda é desconhecida. Possível efeito tóxico de elementos como o fósforo tem sido sugerido por Felipe & Dale (1990) em plantas de *Q. grandiflora* cultivadas com solução completa de Hoagland, uma vez que a concentração de fósforo nessa solução é de 1mmol/L, considerado bem acima à encontrada em solos agrícolas. A maior suscetibilidade das arbóreas de cerrado à solução de Hoagland é uma demonstração de que suas exigências nutricionais devam ser menores, pelo menos na fase de crescimento inicial, respondendo positivamente até um limite a partir do

qual os sais da solução de Hoagland podem ter elevado a salinidade até um nível deletério para aquelas plantas. Em *V. herbacea* este efeito ocorreu na solução concentrada de Hoagland.

Em comparação com a solução de Hoagland, a concentração de macronutrientes na solução Vernonia é menor (tabela 3), confirmando a característica oligotrófica dessa espécie. Comparando com a solução de um solo fértil, as soluções de Hoagland e Vernonia possuem concentrações de elementos químicos muito superiores (tabela 3), apresentando o P, valor cerca de 125 vezes maior na solução Vernonia e 250 vezes mais na solução de Hoagland. N e K aparecem em seguida, chegando a representar 28 vezes o conteúdo da solução do solo. Quanto aos micronutrientes, maior diferença está no Fe, cujo valor foi 18 vezes maior. De modo geral, o conteúdo dos elementos minerais na composição da solução Vernonia apresenta-se dentro da faixa de variação observada para outras formulações nutritivas.

O aumento no crescimento das plantas de *V. herbacea* em resposta à adição das soluções nutritivas foi efetivo a partir do terceiro mês de cultivo. Esse resultado é consistente com aqueles reportados para *Q. grandiflora* (Felippe & Dale, 1990) e *D. miscolobium* (Sasaki & Felippe, 1998) em que nenhuma diferença foi observada até o segundo mês do crescimento inicial em resposta à adição de nutrientes. No caso de *D. miscolobium*, as diferenças só vieram a ocorrer após o esgotamento das reservas dos cotilédones. Esses resultados sugerem que a idade da planta pode proporcionar diferentes respostas (Hoagland & Arnon, 1938) e que, no caso particular de plantas de cerrado, fases mais avançadas de crescimento sejam mais adequadas para avaliação dos efeitos dos tratamentos.

Conforme Parke & Norvell (1999), as conclusões sobre os efeitos de soluções nutritivas devem ser cuidadosas e devem levar em conta, também, as condições ambientais em que foram conduzidos os experimentos. Assim, quando duas soluções diferem em seus efeitos no crescimento de um tipo particular de planta sob uma determinada condição ambiental, não se deve generalizar o mesmo efeito para outras espécies, ou com a mesma, sob outras

condições ambientais. Segundo Hoagland & Arnon (1938), resultados diferentes poderiam ser obtidos caso o trabalho fosse conduzido em outras condições experimentais ou mesmo comparando diferentes espécies vegetais. Contudo, nas condições ambientais em que foi conduzido o presente trabalho, os resultados mostraram que a solução diluída Vernonia é mais eficiente para o crescimento de rizóforos e a produção de frutanos.

Agradecimentos – A FAPESP, pelo apoio financeiro (Biotasp proc. 98/05124-8), ao CNPq, pelas bolsas de Produtividade em Pesquisa de M.A.M.Carvalho, L.B.P.Zaidan, P.R.Furlani, à CAPES (PICDT proc. 23068.000024/99-20) pela concessão de bolsa de doutorado à G.R.F. Cuzzuol.

LITERATURA CITADA

- Améziane, R., Deléens, E., Noctor, G., Morot-Gaudry, J.-F. & Limami, M.A. 1997a. Stage of development is an important determinant in the effect of nitrate on photoassimilate (^{13}C) partitioning in chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of Experimental Botany* 48:25-33.
- Bento Jones, J. J. 1982. Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. *Journal of Plant Nutrition* 5:1003-1030.
- Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.C. 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123:735-740.
- Carvalho, M.A.M., Pinto, M.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21:275-280.
- Chapin, F.S. III. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:233-260.
- Chapin, F.S. III. 1988. Ecological aspects of plant mineral nutrition. IN: *Advances in Plant Nutrition* (B. Tinker and A. Läuchli, eds). Vol. 3, Praeger, New York, pp.161-191.
- Cuzzuol, G.R.F. & Campos, A. 2001. Aspectos nutricionais na vegetação do estuário do Rio Mucuri, Bahia, Brasil. *Revista brasileira de Botânica* 24:227-234.
- Epstein, E. 1972. *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. Wiley, New York.
- Felippe, G.M. & Dale, J.E. 1990. The effects of phosphate supply on growth of plants from the Brazilian Cerrado: experiments with seedlings of the annual weed, *Bidens gardneri* Baker (Compositae) and the tree, *Qualea grandiflora* (Mart.) (Vochysiaceae). *Oecologia* 82:81-86.
- 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. *Revista Brasileira de Botânica* 9:159-166.
- Furlani, P.R., Silveira, L.C.P., Bolonhezi, D. & Faquin, V. 1999. *Cultivo Hidropônico de Plantas*. Boletim Técnico 180. Instituto Agrônomo, Campinas, 52p.
- Godoy-Aveiro, S.M. & Felippe, G.M. 1992. Efeito da remoção de cotilédones no desenvolvimento inicial de *Qualea cordata*. *Hoehnia* 19:19-30.

- Goodland, R. & Ferri, M.G. 1979. Relações planta-solo. IN: Ecologia do cerrado (R. Goodland & M.G. Ferri, eds), EDUSP, São Paulo, pp.146-157.
- Gomes, M.A.N. & Shepherd, S.L.K. 2000. Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado. Revista Brasileira de Botânica 23:153-160.
- Hendry, G.A. & Wallace, R.K. 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. IN: Science and Technology of Fructans (M. Suzuki & N.J. Chatterton, eds), CRC Press, Boca Raton, p.119-139.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1938. The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil. California Agricultural Experimental Station. Circ. No. 347.
- Hunt, R. 1982. Plant Growth Curves: The functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold Publishers, London, 80p.
- Jermyn, M.A. 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. Nature 177:38-39
- Klein, A.L., Zaidan, L.B.P. & Felipe, G.M. 1996. Interaction between soil and photoperiod on development of *Bidens gardneri* Baker (Asteraceae), a herbaceous species from the Brazilian cerrado. Revista brasileira de Botânica 19:1-5.
- Lambers, J. & Poorter, H. 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. Advances in ecological Research 23:187-261.
- Lambers, J., Chapin, F.S. & Pons, T.L. 1998. Plant Physiological Ecology. Springer-Verlag, New York., 540p.
- Malavolta, E. & Kliemann, H.J. 1985. Deficiências e excessos. IN: Desordens Nutricionais no Cerrado. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, pp.05-65.
- Malavolta, E., Vitti, G.C. & Oliveira, S.A. 1997. Princípios, métodos e técnicas de avaliação. IN: Avaliação do Estado Nutricional das Plantas. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, p.55-114.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Edition, Academic Press, Orlando, 649p.
- Martinez, H.E.P. 1997. Formulações de Soluções Nutritivas para Cultivos Hidropônicos Comerciais. FUNEP, Jaboticabal, 31p.

- McGrhath, V.B., Blakeney, A.B. & Batten, G.D. 1997. Fructan to nitrogen ratio as an indicator of nutrient stress in wheat crops. *New Phytologist* 136:145-152.
- Moraes, R.M. & Domingos, M. 1997. Elementos minerais em folhas de espécies arbóreas de Mata Atlântica e Mata de Restinga, na Ilha do Cardoso, SP. *Revista Brasileira de Botânica* 20:133-138.
- Parker, D.R. & Norvell, W.A. 1999. Advances in solution culture methods for plant mineral nutrition research. IN: *Advances in Agronomy* (D.L. Sparks, ed.), Vol. 65, Academic Press, New York, p.151-213.
- Paulilo, M.T.S. & Felipe, G. 1995. Resposta de plântulas de *Qualea grandiflora* Mart., uma espécie arbórea de cerrado, à adição de nutrientes minerais. *Revista brasileira de Botânica* 18:109-112.
- Pollock, C.J. 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist* 104:1-24.
- Proctor, J. 1970. Magnesium as a toxic element. *Nature* 227:742-743.
- Rraij, B. van, Cantarella, H., Quaggio, J.A. & Furlani, A.M.C. 1997. Recomendações de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo. *Boletim Técnico* 100. Instituto Agrônomo, Campinas.
- Renó, N.B., Siqueira, J.O., Curi, N. & Vale, F.R. 1997. Limitações nutricionais ao crescimento inicial de quatro espécies arbóreas nativas em Latossolo Vermelho-Amarelo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32:17-25.
- Sasaki, R.M. & Felipe, G.M. 1998. Response of *Dalbergia miscolobium* Benth. seedlings, a cerrado tree species, to mineral nutrient supply. *Revista brasileira de Botânica* 21:65-72.
- Teixeira, P.G., Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Klein, A.L. 1997. Effect of mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 2:89-96.
- Tomomatsu, H. 1994. Health effects of oligosaccharides. *Food Technology* 48:61-65.
- Vilela, D.M.V. & Haridasan, M. 1994. Response of the ground layer community of a cerrado vegetation in central Brazil to limiting and irrigation. *Plant and Soil* 163:25-31.
- Zonta, E.P, Machado A. A. & Silveira Júnior, P. 1984. Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (SANEST). UFPel, Pelotas.

Tabela 1. Valores médios de macronutrientes e micronutrientes em plantas de *V. herbacea* cultivadas em condições naturais do cerrado na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu, SP. As análises foram realizadas no Laboratório do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e Recursos Ambientais do Instituto Agronômico de Campinas, SP.

Elemento	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	g/kg						mg/kg				
Folha	21,7	2,4	15,0	13,8	6,3	5,7	31	18	802	88	44
Caule	10,3	2,8	22,8	5,8	2,8	2,8	37	9	1420	26	52
Rizóforos	5,9	1,6	7,5	9,9	4,7	3,8	28	8	1237	8	22

Tabela 2. Concentrações de macronutrientes foliares (g/kg) encontradas em algumas formações vegetais e em alguns grupos de interesse agrícola.

Tipos de vegetais	N	P	K	Ca	Mg	S	Referências
Herbáceas de Cerrado	-	0,5	5,6	4,0	1,3	-	Villela & Haridasan (1994)
Arbóreas de Cerrado	29,0	2,0	14,3	10,3	1,5	0,7	Renó <i>et al.</i> (1997)
Arbóreas de Manguezal	15,3	1,3	5,9	4,8	5,1	1,9	Cuzzuol & Campos (2001)
Arbóreas de Mata Atlântica	31,7	1,0	10,8	10,2	4,7	3,3	Moraes & Domingos (1997)
Arbóreas de Restinga	13,0	0,6	3,5	6,3	4,0	2,0	"
Cereais	23,0-33,0	2,0-4,0	15,0-29,0	2,5-7,0	1,5-5,0	1,5-3,5	Raij <i>et al.</i> (1997)
Forageiras	23,0-35,0	1,4-3,0	13,0-30,0	4,8-14,0	1,9-4,8	1,3-3,0	"
Frutíferas	16,0-36,0	1,2-4,0	10,0-55,0	10,0-45,0	2,5-8,0	2,5-8,0	"
Hortaliças	30,0-60,0	2,0-12,0	20,0-70,0	10,0-45,0	5,0-12,0	2,0-10,0	"
Tomate	50,0	6,0	40,0	27,0	6,0	6,0	"
Leguminosas e oleaginosas	32,0-50,0	2,5-4,8	31,0-31,0	9,0-22,0	2,9-8,0	1,9-3,1	"
Raízes e tubérculos	39,0-45,0	2,5-5,0	27,0-55,0	7,3-15,0	3,0-7,3	3,2-5,3	"

Tabela 3. Concentrações de macro e micronutrientes encontradas nas soluções nutritivas Vernonia, de Hoagland, de solo fértil e variações encontradas em outras soluções nutritivas.

Soluções	N-NO ₃ ⁻	P-H ₂ PO ₄ ⁻	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺²	S-SO ₄ ⁻	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	mmol/L						μmol/L				
Vernonia	10,7	0,5	2,6	2,2	1,7	1,3	46	0,03	90	12,6	1,3
Hoagland	15,0	1,0	6,0	5,0	2,0	2,0	46	0,03	90	12,6	1,3
Solo fértil	0,5	0,004	0,091	1,13	0,26	0,13	10	0,3	5	5	0,4
Variações	6-27,9	0,5-2,7	4-11	1-9	1-4	1-4	20-50	0,1-0,8	22-100	7-40	0,5-5

Tabela 4. Efeito da adição de soluções nutritivas na taxa de crescimento relativo médio ($\overline{\text{TCR}}$) e na taxa assimilatória líquida média ($\overline{\text{TAL}}$) em plantas de *V. herbacea*. Letras diferentes indicam diferenças significativas ente os tratamentos no nível de 5% pelo teste de Tukey.

Tratamentos	$\overline{\text{TCR}}$ (g/g/d)					$\overline{\text{TAL}}$ (g/cm ² /d)
	Folha	Caule	Raiz	Rizóforo	Planta	
50% Hoagland	0,015	0,019ab	0,013b	0,019	0,023	0,0068a
50% Vernonia	0,015	0,017b	0,015ab	0,020	0,024	0,0074a
100% Hoagland	0,017	0,024a	0,022a	0,017	0,023	0,0052b
100% Vernonia	0,018	0,023a	0,022a	0,019	0,024	0,0068a
200% Vernonia	0,016	0,022a	0,011b	0,016	0,021	0,0052b

Tabela 5. Composição química do solo de cerrado da Reserva Biológica da Estação Experimental de Moji Guaçu apresentado por diferentes autores.

<i>P_{resina}</i> mg/dm ³	M.O. g/dm ³	pH CaCl ₂	K	Ca	Mg mmol _c /dm ³	H+Al	SB	CTC	V %	<i>Referência</i>
1,6	10	4,8	0,2	1,5	0,8	21	2,5	24	10	(1)
2,0	7	4,1	0,01	1,0	1,0	23	2,0	25	8	(2)
2,0	19	3,9	0,2	1,0	1,0	89	2,2	92	2	(3)

M.O. = matéria orgânica; H+Al = potencial de acidez; SB = soma das bases; CTC = capacidade de troca catiônica (SB + (H+Al)); V = saturação de bases: (SB/CTC)x100. (1) Análise obtida no presente trabalho, (2) Sasaki & Felipe (1998), (3) Gomes & Shepherd (2000).

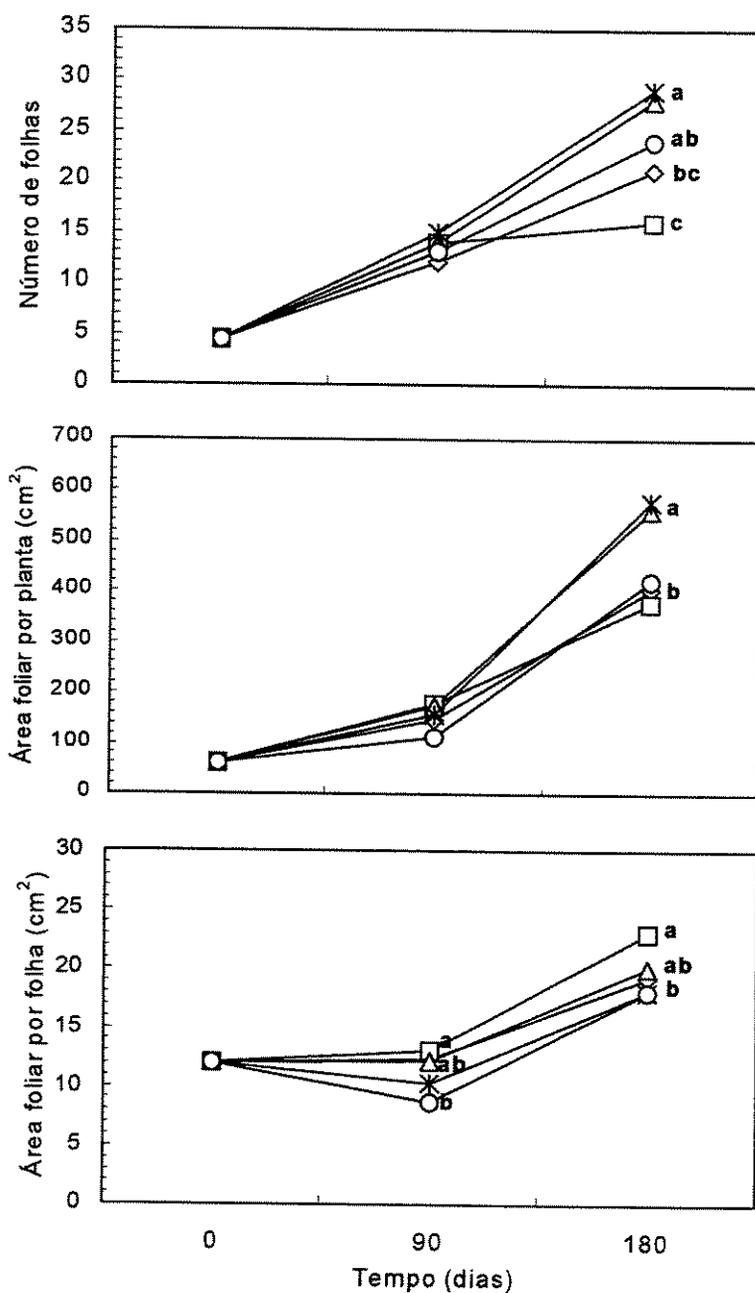


Figura 1. Efeito da aplicação de soluções nutritivas no crescimento de folhas de plantas de *V. herbacea* após 90 e 180 dias de cultivo. Tratamentos: 50% da força iônica da solução de Hoagland (◇), 50% da força iônica da solução Vernonia (□), 100% da força iônica da solução de Hoagland (Δ), 100% da força iônica da solução Vernonia (*), 200% da força iônica da solução Vernonia (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5% pelo teste de Tukey.

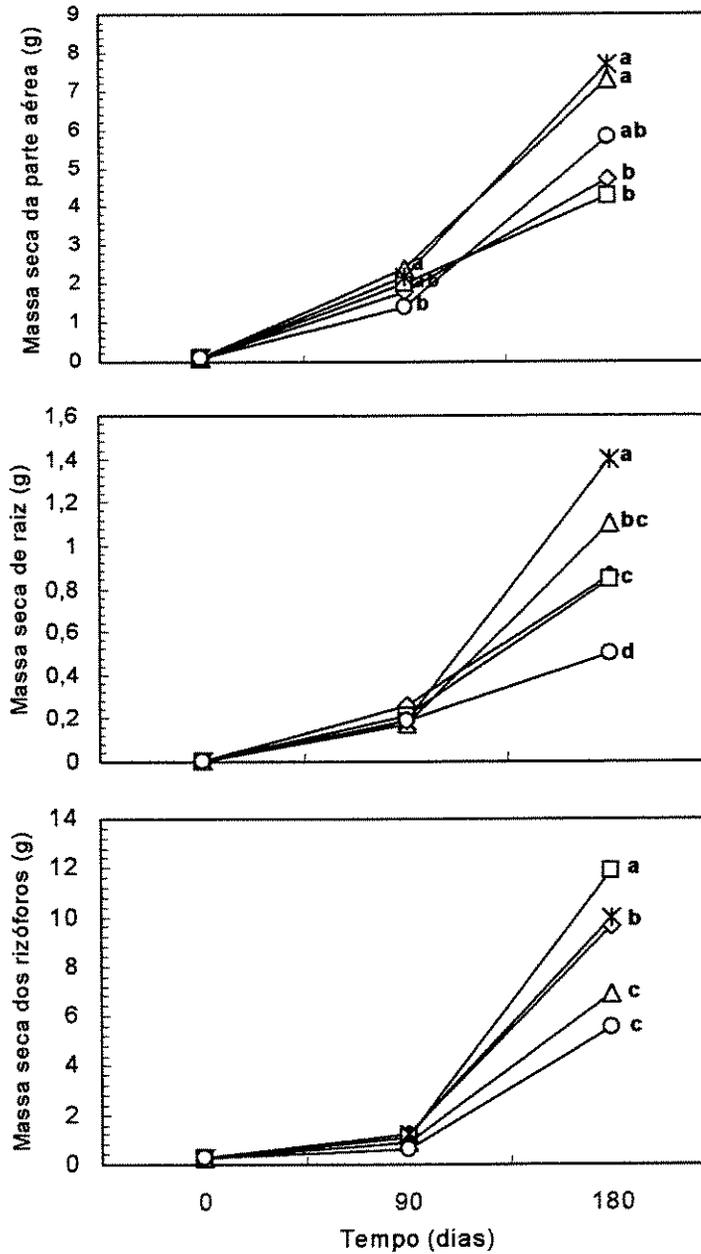


Figura 2. Efeito de soluções nutritivas na massa de matéria seca de plantas de *V. herbacea* após 90 e 180 dias de cultivo. Tratamentos: 50% da força iônica da solução de Hoagland (◇), 50% da força iônica da solução Vernonia (□), 100% da força iônica da solução de Hoagland (Δ), 100% da força iônica da solução Vernonia (*), 200% da força iônica da solução Vernonia (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5% pelo teste de Tukey.

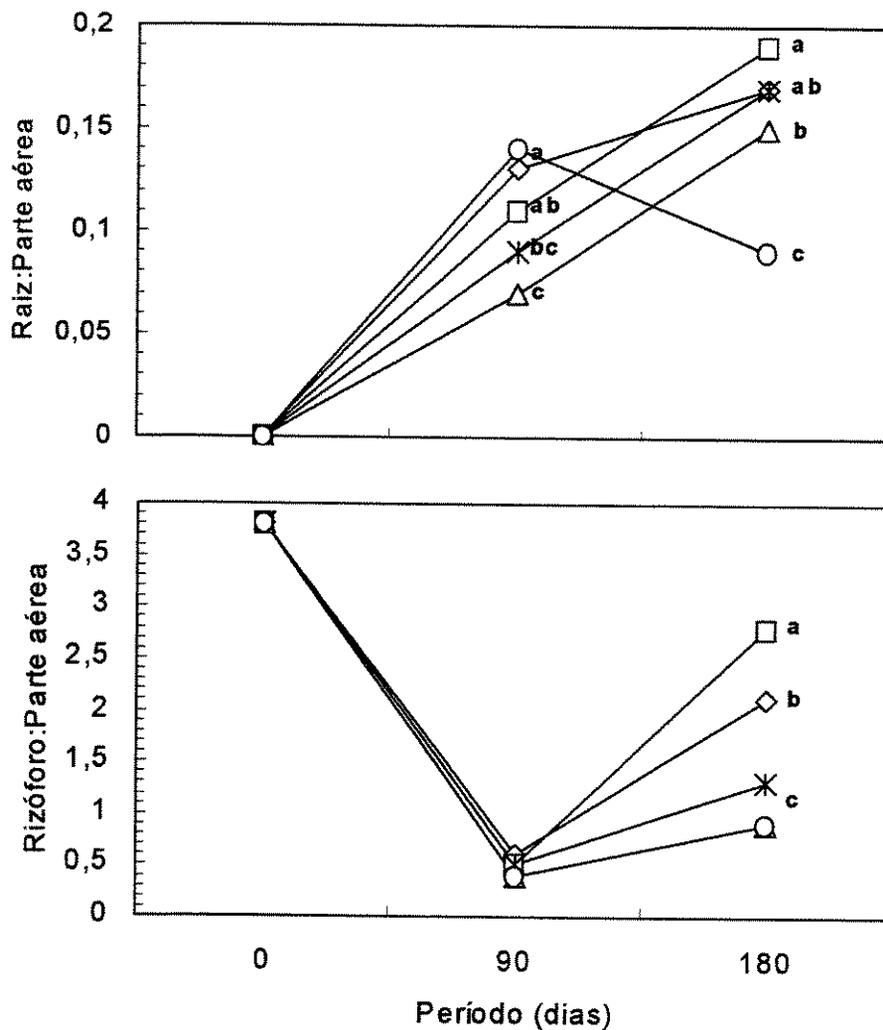


Figura 3. Efeito de soluções nutritivas na razão parte aérea e órgãos subterrâneos de plantas de *V. herbacea* após 90 e 180 dias de cultivo. Tratamentos: 50% da força iônica da solução de Hoagland (◇), 50% da força iônica da solução Vernonia (□), 100% da força iônica da solução de Hoagland (△), 100% da força iônica da solução Vernonia (*), 200% da força iônica da solução Vernonia (○). Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5% pelo teste de Tukey.

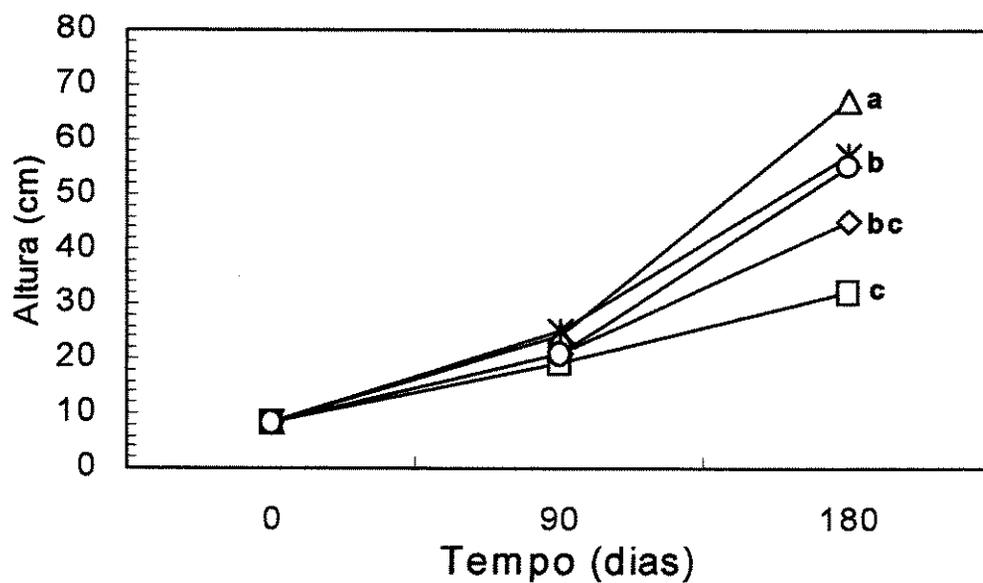


Figura 4. Efeito de soluções nutritivas na altura de plantas de *V. herbacea* após 90 e 180 dias de cultivo. Tratamentos: 50% da força iônica da solução de Hoagland (◇), 50% da força iônica da solução Vernonia (□), 100% da força iônica da solução de Hoagland (Δ), 100% da força iônica da solução Vernonia (*), 200% da força iônica da solução Vernonia (O). Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5% pelo teste de Tukey.

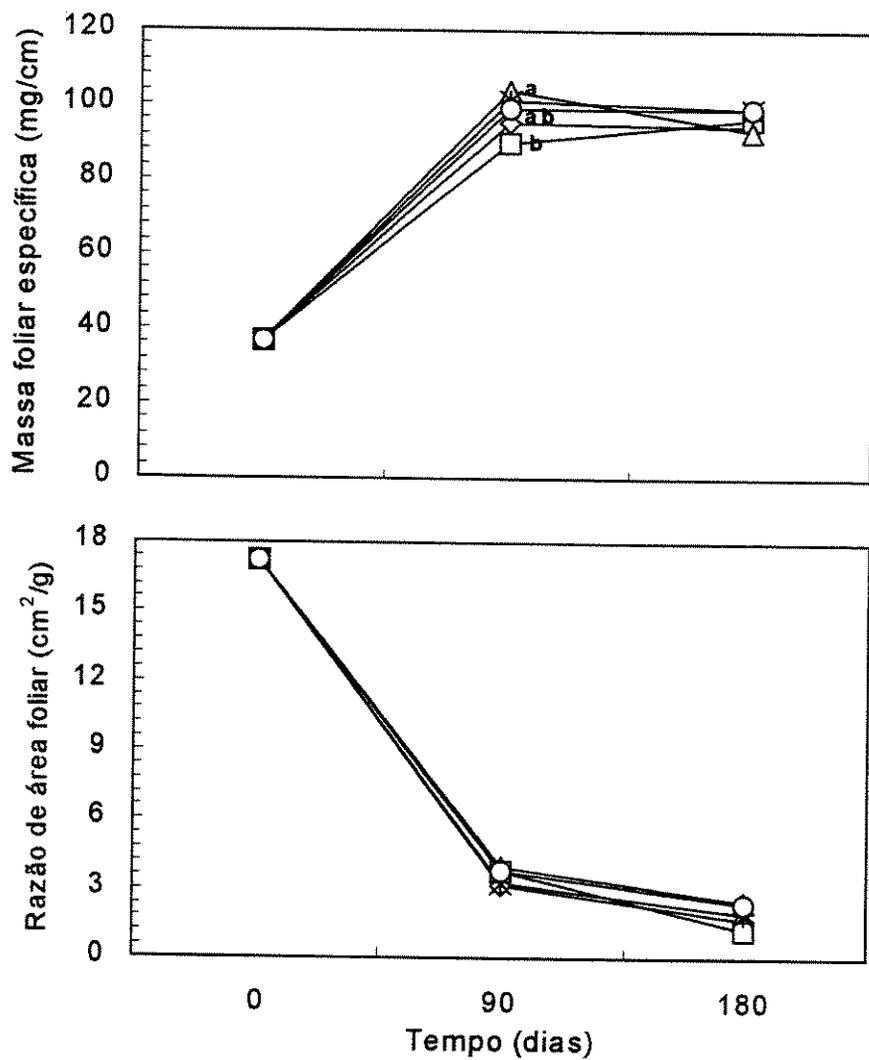


Figura 5. Efeito de soluções nutritivas na massa foliar específica (MFE) e na razão de massa foliar (RAF) em plantas de *V. herbacea* após 90 e 180 dias de cultivo. Tratamentos: 50% da força iônica da solução de Hoagland (◇), 50% da força iônica da solução Vernonia (□), 100% da força iônica da solução de Hoagland (Δ), 100% da força iônica da solução Vernonia (*), 200% da força iônica da solução Vernonia (○). Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5% pelo teste de Tukey.

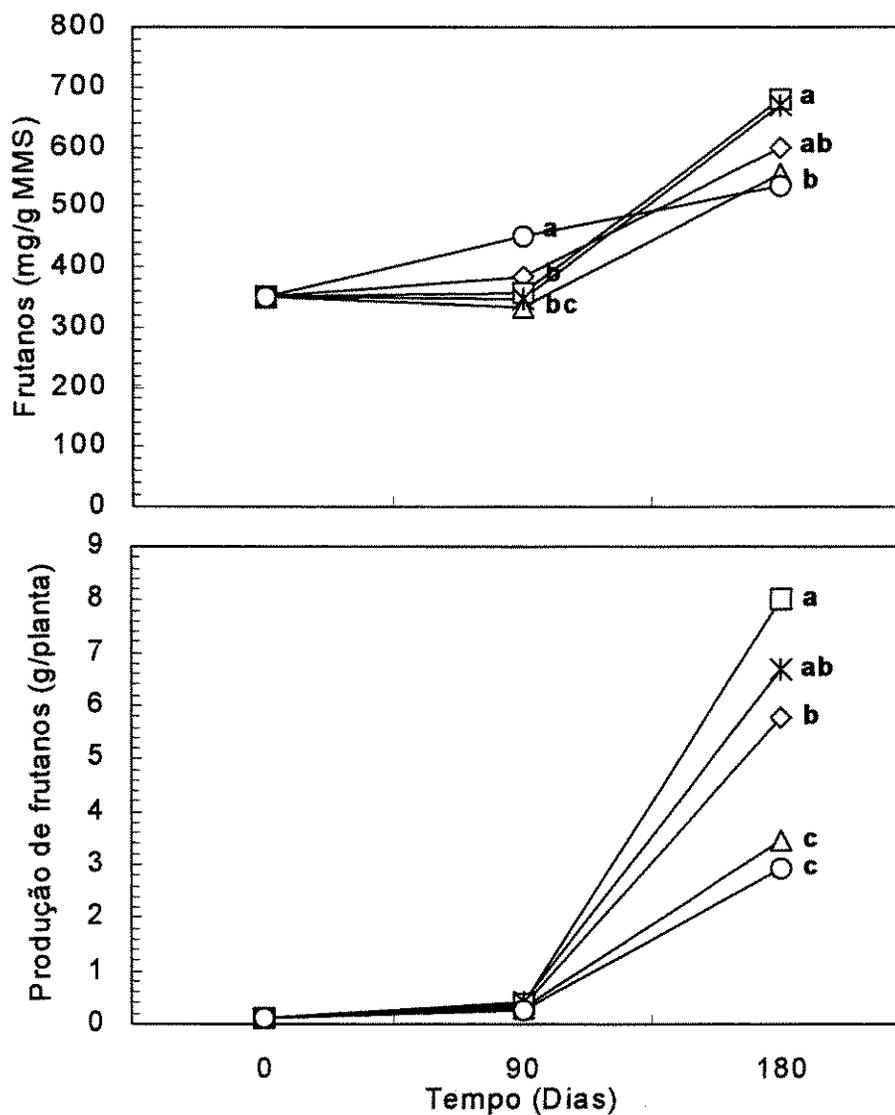


Figura 6. Efeito de soluções nutritivas na concentração e na produção de frutanos em rizóforos de plantas de *V. herbacea* após 90 e 180 dias de cultivo. Tratamentos: 50% da força iônica da solução de Hoagland (◇), 50% da força iônica da solução Vernonia (□), 100% da força iônica da solução de Hoagland (Δ), 100% da força iônica da solução Vernonia (*), 200% da força iônica da solução Vernonia (○). Letras diferentes indicam diferenças significativas no nível de 5% pelo teste de Tukey.

5. CAPÍTULO 2

Artigo 2 - EFEITO DO NITRATO NO CRESCIMENTO, NA PARTIÇÃO DE FOTOSSINTATOS E NA FORÇA DO DRENO EM PLANTAS DE *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY

**EFEITO DO NITRATO NO CRESCIMENTO, NA PARTIÇÃO DE FOTOSSINTATOS
E NA FORÇA DO DRENO EM PLANTAS DE *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY**

GERALDO ROGÉRIO FAUSTINI CUZZUOL¹

MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO²

LILIAN BEATRIZ PENTEADO ZAIDAN²

Título resumido: Nitrato no Crescimento e na Partição de Fotossintatos

1. Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Biologia, 29060-900 Vitória, ES,
Brasil

2. Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil

1. Autor para correspondência: cuzzuol@npd.ufes.br

RESUMO

O efeito do NO_3^- foi estudado em diferentes fases do crescimento de *Vernonia herbacea*. Plantas com 50 dias de idade foram cultivadas em casa de vegetação onde receberam, semanalmente, solução nutritiva com 1,3 mmol/L ou 10,7 mmol/L de NO_3^- . A partição de carbono entre parte aérea e parte subterrânea apresentou diferenças em resposta ao suprimento de nitrogênio. Plantas tratadas com solução N-enriquecida mostraram maior partição de biomassa para os órgãos aéreos, maior capacidade fotossintética (maior taxa de assimilação líquida), maior área foliar e maior concentração de açúcares solúveis e massa foliar específica. No tratamento N-limitado, a alocação de carbono para os órgãos subterrâneos foi maior, bem como a concentração de frutanos, especialmente, nos meses de junho e dezembro. A área foliar unitária em plantas sob estresse nutricional aumentou após a fase de rebrota enquanto efeito inverso foi observado em plantas sob maior suprimento de N. Desse modo, embora o enriquecimento com nitrogênio tenha estimulado o crescimento, a eficiência fotossintética e a força do dreno, esse tratamento causou decréscimo na concentração de frutanos nos rizóforos.

ABSTRACT

The effect of NO_3^- was studied in different growth phases of *Vernonia herbacea*. Fifty-day old plants were cultivated in glasshouse conditions and received weekly nutrient solutions containing 1.3 mmol/L or 10.7 mmol/L NO_3^- . Carbon partitioning between aerial and underground parts was modified in response to nitrogen supply. Plants treated with N-enriched solution showed higher biomass partitioning towards aerial organs, higher photosynthetic capacity (higher net assimilation rate), higher leaf area and higher soluble sugar concentration and specific leaf mass. In N-limited plants, carbon allocation to underground organs was higher, as well as fructan concentration, mainly in June and December. Individual leaf area in plants under nutritional stress increased after the sprouting phase while the opposite occurred in plants under higher nitrogen supply. The results showed that although nitrogen enrichment promoted plant growth, photosynthetic efficiency and sink strength, this treatment caused a decrease in fructan concentration in the rhizophores.

INTRODUÇÃO

A disponibilidade dos nutrientes minerais constitui-se em um dos elementos-chave que regulam o crescimento vegetal (Jeschke & Hartung, 2000). Semelhante aos outros fatores ambientais, os minerais inorgânicos essenciais são capazes de modificar a morfologia da planta, a partição e alocação de biomassa, a taxa de crescimento e o conteúdo de carboidratos de reserva (Lambers & Poorter, 1992; Gedroc *et al.*, 1996). Revisando o assunto, Ericsson (1985) apontou o nitrogênio como um dos principais modeladores da arquitetura vegetal, tanto em espécies nativas como em cultivares agrícolas.

O comportamento nutricional de espécies nativas parece ser similar ao descrito para cultivares agrícolas. Ambos os grupos respondem ao estresse nutricional alterando a alocação das reservas e reduzindo as taxas de fotossíntese e de crescimento relativo (Chapin, 1988; Marschner, 1995; Marschner *et al.*, 1996). Sintomas visuais de deficiência nutricional, e ciclagem de nutrientes foliares, especialmente em folhas mais velhas, também foram relatados por esses autores. Outras adaptações em resposta à restrição de nutrientes foram consideradas por Chapin (1980, 1988) tais como, aumento na longevidade foliar, acúmulo de açúcares não estruturais e inibição do processo de reprodução.

Comparando com espécies de solos férteis, plantas de ambientes oligotróficos exibem baixa taxa de absorção radicular que pode aumentar em resposta à elevação da fertilidade do solo, porém com capacidade inferior de absorção à das espécies de ambientes mais férteis (Marschner, 1995). Desse modo, espécies nativas adaptadas a solos pobres em nutrientes apresentam baixa taxa de crescimento e baixa razão parte aérea:raiz, mesmo quando a disponibilidade de nutrientes for maior (Marschner, 1995).

Dentre os minerais essenciais, o nitrogênio é o elemento que mais limita o crescimento vegetal, e a sua baixa disponibilidade tem sido associada à redução da divisão e expansão

celular, da área foliar e da fotossíntese (Chapin, 1980). Além dessas, a carência de nitrogênio pode causar redução da biomassa total e da razão parte aérea:raiz (Rufty *et al.*, 1984).

A maioria dos estudos sobre comportamento nutricional concentrou suas observações em medidas de crescimento, ou partição de fotossintatos, ou fotossíntese (Chapin, 1988; Marschner, 1995), sem uma interação mais abrangente dos processos de crescimento e do metabolismo vegetal. Assim, uma visão integrada das respostas morfológicas e metabólicas, faz-se necessária para melhor compreensão dos mecanismos de adaptação quando determinado nutriente é fornecido diferencialmente, em especial nas plantas nativas.

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby é uma Asteraceae perene, nativa do cerrado. Possui órgãos-dreno subterrâneos, denominados rizóforos, que acumulam frutanos do tipo inulina (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986; Carvalho & Dietrich 1993). Esses carboidratos foram associados a mecanismos de resistência ao déficit hídrico (Hendry & Wallace, 1993) e mais recentemente, ao estresse nutricional (Améziane *et al.*, 1995, 1997a). A importância econômica dos frutanos é grande, pois podem ser utilizados em substituição a gordura e açúcar reduzindo o valor calórico do alimento (Niness, 1999) e na análise da função renal (Dias-Tagliacozzo *et al.*, 1996).

O melhoramento vegetal visando o aumento da força do dreno em órgãos acumuladores de frutanos é desejável do ponto de vista econômico. Frequentemente, a força do dreno é apresentada como resultante do tamanho do dreno e da atividade do dreno (Warren Wilson, 1972, citado por Marcelis, 1996). A atividade do dreno, que reflete as condições fisiológicas das plantas (Ho, 1988), é determinada em função da atividade das enzimas relacionadas à síntese de frutanos, sacarose:sacarose futosil transferase (SST) e frutano:frutano futosil transferase (FFT) conforme Améziane *et al.* (1995). Contudo, a taxa de produção de frutanos pode ser empregada para determinar a atividade do dreno (Schubert & Feuerle, 1997). Segundo Ho (1988) o tamanho do dreno refere-se às condições físicas sendo que medidas de

volume do vacúolo, número de células ou biomassa seca do dreno são, geralmente, utilizadas como estimativas do tamanho do dreno. Apesar disso, o número de células pode permanecer inalterado mesmo ocorrendo crescimento do órgão-dreno. No caso de *Cucumis sativus*, o aumento da massa de seu fruto foi acompanhado pelo alongamento celular sem alterações no número de células (Marcelis, 1993), indicando que medidas ao nível celular podem ser, em alguns casos, inadequadas para a avaliação do tamanho do dreno (Marcelis, 1996). Para Schubert & Feuerle (1997) a produção de massa seca do órgão-dreno é a medida mais adequada para determinar o tamanho do dreno. Como o carbono consumido na respiração do dreno pode ser significativo e não é mensurado, isso impede de medir a verdadeira capacidade do dreno (carbono importado + carbono respirado), diferindo da força do dreno aparente (carbono importado) determinada pela taxa de crescimento absoluto (Ho, 1988)

Além dos fatores intrínsecos, determinados geneticamente, variações ambientais podem modificar a força do dreno (Pollock, 1986). Dentre os fatores externos já estudados, a manipulação do nitrogênio tem sido a estratégia mais recomendada para modelar a força do dreno (Brouwer, 1983; Rufty *et al.*, 1984; Farrar, 1993, Améziane *et al.*, 1995, 1997a). Nos poucos trabalhos realizados sobre esse assunto, verificou-se que a baixa concentração de nitrogênio causou aumento no conteúdo de frutanos em raízes tuberosas de *Cichorium intybus* (Van den Ende *et al.*, 1999) e em dreno e fonte de *Hordeum vulgare* (Wang & Tilberg, 1996; 1997). Sob essa condição de estresse nutricional, Améziane *et al.* (1997a) verificaram aumento na força de dreno em *C. intybus*.

A importância ecológica e econômica dos frutanos, aliada à carência de informações sobre o comportamento nutricional de espécies herbáceas do cerrado, determinaram a realização do presente trabalho que teve como objetivo principal investigar o efeito da disponibilidade do $N-NO_3^-$ na plasticidade fenotípica e na força do dreno em plantas de *V. herbacea*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento – Plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) foram obtidas por propagação vegetativa a partir de fragmentos de rizóforos de plantas coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu, São Paulo (22° 35'S e 47° 44'W). Foram selecionadas plantas de tamanho uniforme (± 5 cm de altura contendo cerca de 4 folhas) aos 50 dias após a brotação dos rizóforos cultivados em bandejas com areia lavada. As plantas foram transferidas para vasos plásticos (3 L) contendo areia lavada como substrato, e submetidas às condições de luz, temperatura e fotoperíodo natural em casa de vegetação onde a média da temperatura mínima e máxima anual foi de 18°C e 29°C, respectivamente. O experimento foi conduzido no período de dezembro de 1999 a dezembro de 2001.

Conforme a análise da constituição química de plantas de *V. herbacea* (Capítulo 1) realizada pelo Laboratório do Centro de Solos e Recursos Agroambientais do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), São Paulo, foi elaborada uma solução nutritiva específica para essa espécie, de acordo com as suas exigências nutricionais foliares. Um lote de plantas recebeu, semanalmente, 100 ml da solução nutritiva/planta com N-limitado (1,3 mmol/L de N-NO_3^-) contendo KNO_3 1,3 mmol/L, KH_2PO_4 5,2 mmol/L, KCl 0,9 mmol/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,17 mmol/L e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mmol/L. Outro lote foi tratado com solução nutritiva de N-enriquecido (10,7 mmol/L de N-NO_3^-) composta de $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mmol/L, KNO_3 2,3 mmol/L, KH_2PO_4 0,52 mmol/L, $\text{Mg(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,7 mmol/L e Na_2SO_4 1,3 mmol/L. Ambas as soluções foram suplementadas com os sais de micronutrientes da solução de Hoagland & Arnon (1938). O pH foi ajustado para 5,5-6,0 com KOH 1N. Quando necessário, as plantas foram regadas com água destilada para evitar o dessecamento, principalmente nos meses quentes do ano.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 6 repetições e 2 tratamentos. Trimestralmente, foram tomadas medidas de crescimento e quantificados a frutose total e os açúcares totais em rizóforos, caule e folha. Investigação preliminar revelou a existência de um gradiente de concentração de frutanos que aumentou no sentido do ápice para a base das novas ramificações dos rizóforos. Por isso, optou-se pela realização das análises dos açúcares solúveis na região mediana desses órgãos visando a padronização das amostras. O mesmo critério foi adotado para a análise dos carboidratos do caule. No entanto, para as medidas foliares, decidiu-se pela primeira folha apical completamente expandida (cerca de 5 cm de comprimento e 4 cm de largura), uma vez que esse tipo de folha apresenta maior conteúdo de clorofila e taxa fotossintética, quando comparada com as folhas basais, conforme observações preliminares. Além dessas características, verificou-se que essas folhas permanecem mais tempo ligadas à planta.

Análise de crescimento – Os termos partição e alocação de biomassa adotados no presente trabalho são os mesmo definidos por Poorter & Nagel (2000) onde partição significa a quantidade de carbono presente nos diferentes órgãos vegetais e alocação indica a quantidade de biomassa localizada nos diversos órgãos relativa à massa total da planta.

Para as análises de crescimento, foram utilizadas 6 plantas por tratamento para medidas de altura do maior ramo, massa de matéria fresca e seca dos órgãos aéreos e subterrâneos, número de folhas e área foliar unitária e total. A massa seca foi determinada após a secagem do material em estufa 60°C até obtenção da massa constante. A área foliar foi calculada através do software “Area Leaf & Analysis” da Skye Instruments Ltd. (1993). A partir desses dados, foram calculadas as taxas básicas de crescimento de acordo com Hunt (1982). A taxa de crescimento relativo (TCR), que mostra o incremento de produção de massa de matéria seca em determinado tempo, foi calculada de acordo com a equação $(LnM_2 - LnM_1) / (t_2 - t_1)$.

A taxa de assimilação líquida (TAL), que expressa a eficiência fotossintética em termos de incremento da massa de matéria seca total produzida por área foliar e por unidade de tempo, foi determinada segundo a fórmula $TAL = [(LnA_2 - LnA_1) / (A_2 - A_1)] \times [(M_2 - M_1) / t_2 - t_1]$. A razão de área foliar (RAF), que mostra a área foliar utilizada para produzir uma unidade de massa de matéria seca total, foi obtida pela relação entre área foliar e a massa seca total da planta ($RAF = A / M$). A taxa fotossintética (TF) foi calculada tendo como base a TAL (Beadle 1986), utilizando a fórmula $TF = TAL \times K/H$, onde K é o fator de conversão da quantidade de matéria seca em quantidade de carbono absorvido e equivale a 1,65 (Salisbury & Ross, 1992), e H é o fotoperíodo, considerado de 12h para os cálculos, que seria aproximadamente o valor médio para São Paulo (Vianello & Alves, 1991). A massa foliar específica (MFE), que indica a quantidade de fotossintatos retida nas folhas, foi calculada pela razão M_{foliar} / A . A área foliar específica (AFE), que mostra a área foliar fotossinteticamente ativa para produzir uma unidade de matéria seca foliar, foi calculada pelo inverso da MFE. Com os dados de massa de matéria seca da parte aérea e da parte subterrânea foi determinada a razão parte aérea:parte subterrânea. A força do dreno aparente, que mede a capacidade potencial do órgão em atrair e armazenar fotoassimilados, foi calculado em função da taxa de incremento de massa seca dos rizóforos $(M_{2rizóforos} - M_{1rizóforos}) / (t_2 - t_1)$ conforme Shubert & Feuerle (1997). De acordo com esses autores, a atividade de dreno, que expressa a capacidade do dreno em estocar frutanos, foi calculada pela taxa de acúmulo de frutanos em rizóforos $(F_2 - F_1) / (t_2 - t_1)$.

Onde, M = massa de matéria seca, M_2 = massa de matéria seca atual, M_1 = massa de matéria seca inicial, F_2 = produção de frutanos atual por plantas, F_1 = produção de frutanos inicial por planta, A_2 = área foliar atual, A_1 = área foliar inicial, $t_2 - t_1$ = intervalo de tempo entre duas coletas, Ln = logaritmo natural.

Conteúdo de Clorofila - Discos foliares foram retirados da primeira folha apical completamente expandida, sendo um macerado em gral contendo 10 ml de solução acetônica a 80% (v/v) para extração de clorofila e outro, utilizado para a determinação da massa de matéria seca em estufa a 60°C. A operação foi realizada sob baixa temperatura e luminosidade para impedir a degradação da clorofila pela luz ou por ação enzimática. O extrato foi centrifugado a 600 g por 5 minutos e a leitura realizada, sob penumbra, em espectrofotômetro (UV-160A Shimadzu) para estimativa da clorofila *a* e *b*. Os comprimentos de onda utilizados foram 645 (clorofila *b*) e 663 (clorofila *a*). O conteúdo de clorofila foi expresso em mg g⁻¹ de massa de matéria seca aplicando-se a equação apresentada por Lichtenthaler & Wellburn (1983):

$$\text{Clorofila } a = 12,25A_{662} - 2,79A_{645} \cdot V/1000M$$

$$\text{Clorofila } b = 21,50A_{665} - 5,10A_{661} \cdot V/1000M$$

$$\text{Clorofila } a+b = 7,15A_{662} + 18,71A_{645} \cdot V/1000M$$

Onde,

A é absorvância, V é o volume da amostra (mL) e M é a massa seca da amostra (g).

Com esses valores foi calculada, também, a razão clorofila *a:b*.

Extração dos carboidratos solúveis – Amostras de 2 g de rizóforos, 1 g de caule e 1 g de folha foram submetidas à extração de oligossacarídeos e polissacarídeos solúveis, seguindo-se o método de Carvalho *et al.* (1998). Amostras da porção mediana dos rizóforos foram fragmentadas, fervidas em etanol 80% por 3 minutos para desnaturação enzimática. O material foi macerado em gral e almofariz, aquecido em banho-maria a 80°C por 15 minutos e centrifugado a 1000 g por 10 minutos. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes como descrito anteriormente e então submetido duas vezes a extração aquosa por 30 minutos a 60°C, homogenizados e filtrados à vácuo, em tecido algodão. Os sobrenadantes da fração etanólica e

aquosa foram reunidos, constituindo o extrato de carboidratos totais solúveis, o qual foi concentrado em rotoevaporador, a 40°C. Para a análise dos oligo- e polifrutanos, o extrato total foi precipitado com três volumes de etanol comercial sendo a mistura mantida a 5°C “overnight” e centrifugada a 9.000 g por 10 min a 5°C. O precipitado foi ressuscitado com água destilada e constituiu a fração de polifrutanos. O sobrenadante foi concentrado a vácuo e ressuscitado em água destilada representando a fração de oligofrutanos.

Análise dos carboidratos – A frutose livre e combinada e os açúcares totais foram estimadas pela reação de antrona, modificada especialmente para cetoses (Jermyn, 1956), usando frutose (Sigma) como padrão. A leitura foi realizada em duplicata em espectrofotômetro (Coleman) a 620nm. Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (Somogyi 1945), usando-se frutose como padrão. Glicose, frutose e sacarose do extrato total de folha, caule e rizóforos foram quantificadas por HPLC comparando as áreas dos picos com padrões externos.

Após a deionização em resina catiônica (Dowex-50W, Na⁺) e aniônica (Dowex-1, Cl⁻) segundo Carvalho & Dietrich (1993), os carboidratos solúveis neutros foram analisados em coluna de troca aniônica 4x250 mm CarboPac PA-1 usando o cromatógrafo de íons Dionex DX-300 acoplado a um detector amperométrico pulsado (HPAEC/PAD). O gradiente foi estabelecido de acordo com Shiomi (1993). O eluente A (NaOH 150 mM) e o eluente B (acetato de sódio 500 mM em NaOH 150 mM) foram combinados da seguinte forma: 0-2 min, 25 mM; 2-8 min, 25 a 150 mM; 8-28 min, 150 a 500 mM e 28-30,1 min, 25 mM. A taxa de fluxo através da coluna foi de 1,0 cm³/min. Os potenciais aplicados ao T1(480 ms), T2 (120 ms) e T3 (60 ms) foram de +0,05, +0,60 e -0,60 V, respectivamente.

Análise estatística – Os efeitos dos tratamentos foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% e 5% no software Sanest (Zonta *et al.*, 1984).

RESULTADOS

Partição de biomassa. Plantas de *V. herbacea* mostraram alta plasticidade fenotípica na partição de biomassa em resposta às condições nutricionais. Em ambos os tratamentos de nitrogênio houve ganho de biomassa tanto nos rizóforos quanto na parte aérea, sendo que no N-enriquecido a resposta foi superior (fig. 1) principalmente no mês de dezembro (360 dias) quando as plantas se encontravam em estágio mais avançado de desenvolvimento. Por essa mesma figura, nota-se, também, redução da biomassa dos rizóforos e da parte aérea no mês de setembro em plantas tratadas com maior disponibilidade de nitrogênio. Tais perdas foram decorrentes da senescência dos órgãos aéreos que acontece naturalmente em julho (indicada pela seta na fig. 1) e da redução do conteúdo de frutanos dos rizóforos no final de agosto até setembro (fig. 2). Após a fase de senescência, seguiu-se o período de brotação e, a partir de setembro, ocorreu a retomada do crescimento até o final do experimento, intensificando a diferença entre os tratamentos.

Embora a parte aérea das plantas tratadas com N-limitado também tenha entrado em senescência em julho, não foram registradas perdas de biomassa no mês de setembro (fig. 1), pois essas plantas rebrotaram antes do que aquelas que receberam solução com N-enriquecido (dados não mostrados). Desse modo, enquanto a recuperação da biomassa da parte aérea das plantas sob N-limitado, em setembro, representou 100% da medida tomada em junho, essa diferença foi de 61% no regime de N-enriquecido. Os órgãos que detiveram maior partição de biomassa foram os rizóforos indiferente da concentração de nitrogênio, chegando a representar 60% da massa seca total da planta, com algumas variações, em função do ciclo de vida da planta. No entanto, após um ano de experimentação, a biomassa seca da parte aérea e dos rizóforos foram equivalentes em plantas cultivadas com N-enriquecido.

De modo geral, a razão parte aérea:parte subterrânea foi maior sob N-enriquecido (fig. 1), exceto no mês de setembro. O decréscimo dessa razão pode estar associado, em parte, à senescência dos órgãos aéreos (julho) e à baixa velocidade da retomada do crescimento dessas plantas, em relação àquelas sob N-limitado. O desmembramento dos componentes da parte subterrânea mostrou que a relação parte aérea:raiz aumentou com a maior disponibilidade do nitrogênio. Essa relação caiu em setembro nos dois tratamentos, porém, de forma mais acentuada no regime de N-enriquecido que se igualou ao de N-limitado. Quanto à razão parte aérea:rizóforos, plantas tratadas com N-enriquecido apresentaram aumento dessa medida em março e dezembro, e decréscimo em junho e setembro. Essa redução da parte aérea em relação aos rizóforos no início do inverno (junho), decorreu do aumento significativo da biomassa dos rizóforos em resposta a maior disponibilidade do nitrogênio (fig. 1).

Alocação de biomassa. Alterações no padrão de alocação do carbono entre parte aérea e parte subterrânea ocorreram em função da disponibilidade do N. A fração de massa seca de rizóforos e de raiz foi maior sob N-limitado (fig. 3), apesar de não ter havido diferença na massa seca de raiz entre os tratamentos (dados não mostrados). A maior alocação para os órgãos subterrâneos foi confirmada, também, pela razão parte aérea:parte subterrânea que permaneceu baixa sob restrição de nitrogênio (fig. 1). Independente dos tratamentos, os órgãos que detiveram maior alocação de biomassa foram os rizóforos seguidos pelas folhas. Os resultados mostraram ainda que, a maior disponibilidade do nitrogênio estimulou maior alocação de biomassa para os órgãos aéreos.

Análise de crescimento. Semelhante à partição de biomassa, *V. herbacea* mostrou alterações morfológicas em resposta às diferentes condições de nutrição nitrogenada. Até o final do experimento, as medidas do crescimento vegetativo aumentaram em quase todos os

parâmetros analisados para as duas situações nutricionais (tabela 1). Em comparação ao N-limitado, a maior disponibilidade desse elemento proporcionou aumento em todas as medidas do crescimento sendo que valores mais expressivos foram encontrados em dezembro do segundo ciclo de vida. Nessa ocasião, o N-enriquecido elevou 2,8 vezes o número de ramos, 1,2 vez a altura do ramo principal, 4,3 vezes o número de folhas e 2,7 vezes a área foliar total em relação aos valores obtidos no N-limitado.

As alterações morfológicas na fase de senescência afetaram as medidas do crescimento observadas no início da fase de rebrota (setembro), principalmente em plantas submetidas ao N-enriquecido. Nesse tratamento, a redução de altura, número de folhas e área foliar total e unitária foram marcantes. No segundo ciclo de vida, as plantas apresentaram um número maior de ramos aéreos em relação ao primeiro, quando apenas um ramo se desenvolveu. Após a rebrota (setembro), esse número aumentou 4 vezes em relação ao primeiro ciclo de vida no tratamento N-enriquecido. Diferente das outras medidas, a área foliar unitária em plantas suplementadas com nitrogênio diminuiu após a rebrota permanecendo baixa até o final do experimento. Efeito contrário foi observado em plantas cultivadas com baixa concentração de nitrogênio. Nesse tratamento, a área foliar unitária, em dezembro, aumentou 2 vezes em relação às medidas tomadas em junho e 1,4 vezes das plantas tratadas com N-enriquecido, nessa mesma época do ano.

Avaliando ainda os resultados da tabela 1, diferenças expressivas nas medidas de crescimento em junho e setembro em plantas sob N-limitado, só foram encontradas quanto ao número de folhas cujo valor em setembro foi 25% menor em relação ao mês de setembro. Já para área foliar total esse decréscimo foi desprezível. Distintamente do que foi observado nas plantas sob N-enriquecido, as medidas de altura e área foliar unitária das plantas sob N-limitado aumentaram em setembro quando comparadas àquelas tomadas em junho. A

diminuição da área foliar unitária a partir de setembro em plantas com N-enriquecido coincidiu com o grande número de folhas formadas nesse período.

Sintomas de deficiência nutricional foram visualizados na forma de clorose marginal nas folhas basais seguida de murchamento e de morte nas plantas sob N-limitado. A senescência dos órgãos aéreos, em julho, não aconteceu simultaneamente nos dois tratamentos. Plantas tratadas com N-enriquecido senesceram posteriormente às plantas com N-limitado (dados não apresentados). Quanto à floração, N-enriquecido induziu o desenvolvimento de inflorescências em 50% das plantas, enquanto sob N-limitado as plantas permaneceram em estado vegetativo.

Em relação às taxas de crescimento, plantas que receberam maior concentração de nitrogênio mostraram maior capacidade fotossintética indicada pelas maiores TCR, TAL e TF, principalmente na fase de crescimento rápido do primeiro (0 – 90 dias) e do segundo (270 – 360 dias) ciclos de vida (tabela 2). Os valores baixos da TCR, TAL e TF no período de 180 – 270 dias, em ambos os tratamentos, coincidiram com a época de senescência dos órgãos aéreos, redução da biomassa dos rizóforos nessa mesma época (fig. 1), e queda na concentração dos frutanos (fig. 2). Nesse mesmo período, a TCR, TAL e TF foram mais baixas atingindo valores negativos em plantas sob N-enriquecido.

Os efeitos do nitrogênio na RAF, AFE e MFE são apresentados na tabela 3. Em todas as medidas, os valores sofreram variações sazonais associadas ao ciclo de vida da espécie. Até os 270 dias, a RAF, que representa a área foliar útil para produzir uma unidade de massa seca, foi maior em plantas submetidas ao N-limitado. Aos 360 dias, a RAF foi maior em plantas sob N-enriquecido, mostrando uma queda na eficiência fotossintética nas plantas desse tratamento após um ano de cultivo. Em ambos os tratamentos, maiores valores de RAF foram encontrados no final do primeiro e do segundo ciclos de crescimento (90 e 360 dias). Com respeito ao índice de AFE, as folhas das plantas sob N-limitado apresentaram maior área foliar por

unidade de massa seca. Para as duas concentrações de nitrogênio, foi registrado decréscimo da AFE durante o período experimental, exceção feita no mês de setembro, que coincide com a época de aparecimento de novas folhas. Quanto à MFE, folhas de plantas submetidas ao N-enriquecido mostraram maior conteúdo de massa seca por área foliar. Variações sazonais também ocorreram com essa medida para as duas condições nutricionais sendo que, de modo geral, maiores valores foram encontrados aos 180 dias (junho) e aos 360 dias (dezembro), principalmente em folhas de plantas tratadas com maior disponibilidade de nitrogênio.

Clorofila. Folhas de *V. herbacea* apresentaram maior conteúdo de clorofila *a* e *b* em plantas cultivadas com maior concentração de nitrato (fig. 4). No mês de junho, as concentrações de clorofila *a* (± 4 mg/g MMS) e *b* (± 2 mg/g MMS) foram semelhantes para os dois tratamentos. Esses resultados refletiram na razão clorofila *a:b* que nessa fase foi próximo de 1, e de forma geral, foi maior no tratamento enriquecido pelo nitrato, especialmente em março e setembro.

Em ambos os tratamentos ocorreram variações com maior conteúdo de pigmentos registrado no mês de março (90 dias). Em junho, ocorreu decréscimo da clorofila *a* seguido de um pequeno aumento em setembro, permanecendo nessa concentração até o término do experimento. As plantas sob tratamento N-limitado apresentaram diminuição da concentração de clorofila *b* anterior à registrada para as plantas tratadas com N-enriquecido.

Os valores dos pigmentos clorofilianos refletiram no conteúdo de clorofila total que apresentou perfil similar ao da clorofila *a*. Nesse aspecto, maiores diferenças entre os tratamentos ocorreram no mês de março e junho onde o conteúdo de clorofila total no tratamento N-enriquecido apresentou valores 23% e 50% maiores em março e junho, respectivamente, quando comparados com as plantas sob restrição de nitrato.

Frutose total e açúcares solúveis totais. A concentração de açúcares solúveis em rizóforos aumentou nos meses de junho e dezembro, nas duas concentrações de N, sendo este aumento significativamente superior no regime de N-limitado, em especial, aos 360 dias (fig. 2). Por outro lado, declínio na concentração dos açúcares em setembro foi observado.

O conteúdo de frutose total em caule e folha foi inferior ao encontrado para rizóforos, sem diferenças significativas entre os tratamentos. Enquanto a concentração de frutose total representou apenas 1% da matéria seca de folha e 2,5% de caule, para os rizóforos, esse valor foi de 80% no N-limitado e 50% no N-enriquecido. Dessa forma, pode-se constatar a existência de um gradiente de concentração de frutose no sentido folha-caule-rizóforo, refletindo claramente a natureza do órgão de reserva dos rizóforos.

Os teores equivalentes de frutose total e de açúcares totais em rizóforo, indicam a natureza do material de reservas, constituída principalmente de frutanos, independente da concentração de nitrogênio aplicado. Já caule e folha apresentaram maiores concentrações de açúcares totais do que de frutose total, revelando sua baixa capacidade em reter esse tipo de hexose. Exceto no mês de março, folhas de plantas submetidas ao N-enriquecido apresentaram maior retenção de fotossintatos, representada pelo elevado teor de açúcares solúveis totais, em especial, nos meses de junho e dezembro. Após um ano de experimentação, a produção de frutanos por planta foi de 3,7 g no N-limitado e 4,1 g no N-enriquecido.

Não foi identificada a presença de frutanos em folhas e caules de *V. herbacea* em ambos os tratamentos nutricionais (fig. 9).

Fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos. Aos 360 dias, quando maiores diferenças na concentração de frutanos foram observadas entre os dois regimes de nitrogênio (fig. 2), verificou-se que o conteúdo de fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos nos rizóforos de plantas mantidas em N-limitado, foi superior ao observado em rizóforos das plantas cultivadas

com N-enriquecido (fig. 5). A concentração de fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos representaram, respectivamente, 36% e 50% da massa seca dos rizóforos das plantas tratadas com restrição de nitrato. Enquanto a concentração de polifrutanos foi maior do que a dos oligofrutanos em plantas tratadas com N-limitado, não foi observada diferença no conteúdo dessas duas frações de frutanos em plantas cultivadas com maior concentração de nitrogênio.

Açúcares redutores. A concentração dos açúcares redutores em plantas sob N-enriquecido foi superior ao do N-limitado (fig. 6), principalmente nos meses de março e setembro. Enquanto a menor concentração desses açúcares foi observada no inverno (junho), o seu conteúdo aumentou significativamente na primavera (setembro), intensificando a diferença entre os tratamentos.

Glicose, frutose livre e sacarose. Rizóforos e folhas foram os órgãos mais influenciados pelos tratamentos (fig. 8). Folhas apresentaram maior conteúdo de glicose e frutose livre quando submetidas ao N-enriquecido. Maior teor de sacarose foi encontrado nos rizóforos, principalmente naqueles mantidos em solução nutritiva enriquecida pelo nitrato. Embora as concentrações das hexoses analisadas tenham sido muito baixas nos rizóforos, mesmo assim, houve diferença significativa no teor de frutose livre, que foi maior sob o N-enriquecido. Para o caule, nenhuma diferença foi constatada no conteúdo dos açúcares entre os tratamentos aplicados. Semelhante ao que foi observado em rizóforos, maiores teores de hexoses e sacarose foram encontrados em folhas de plantas submetidas ao N-enriquecido, porém com diferenças significativas somente para as hexoses cujos valores mostraram-se superiores aos de caule.

Força do dreno. A força do dreno aparente, indicado pela taxa de incremento da biomassa seca dos rizóforos, foi maior em plantas tratadas com N-enriquecido (fig. 7), exceto no período correspondente à fase de senescência da parte aérea e de rebrota (180 – 270 dias). Nesse período, o tamanho do dreno diminuiu bastante em ambos os tratamentos, sendo que essa redução foi mais acentuada no tratamento N-enriquecido. Efeito similar foi verificado quanto à atividade do dreno, que mostrou maior taxa de depósito de frutanos em plantas sob N-enriquecido na fase de maior estocagem de frutanos do primeiro ciclo de vida (90-180 dias).

DISCUSSÃO

Crescimento. Plantas de *V. herbacea* responderam ao N-enriquecido crescendo mais em altura, área foliar e matéria seca, principalmente quando atingiram um estágio de maturidade mais avançado, mostrando assim, a importância da fase de crescimento na resposta ao tratamento nutricional (Marschner, 1995; Améziane *et al.*, 1997a). Por se tratar de um caule subterrâneo de reserva, poder-se-ia esperar que a tuberização em *V. herbacea* fosse inibida pelo maior suprimento de nitrogênio, igualmente ao verificado em *Solanum tuberosum* (Marschner, 1995) e em *Sinningea allagophylla*, uma herbácea do cerrado (Almeida, 1994). No entanto, o que se verificou foi o aumento de biomassa dos rizóforos, tanto na menor quanto na maior concentração de nitrogênio, confirmando o que foi descrito anteriormente por Teixeira *et al.*, (1997) em *V. herbacea*, sugerindo que a tuberização de rizóforos não esteja sob controle direto do nível do nitrogênio, mas de fatores intrínsecos. A diferenciação de órgãos é um processo determinado geneticamente, e é influenciado por fatores ambientais (Thomas & Vince-Prue, 1997). Em *V. herbacea*, os níveis exógenos de nitrogênio parecem alterar apenas o crescimento dos rizóforos, evidenciado pelas medidas de massa seca.

Conforme relatado para outras espécies cultivadas em meio enriquecido pelo nitrogênio (Lambers *et al.*, 1998), *V. herbacea* também mostrou maior partição de biomassa para órgãos aéreos (fig. 1). Tal resultado refletiu na razão parte aérea:parte subterrânea, em especial, parte aérea:raiz que foi maior no primeiro e segundo ciclos de vida. O aumento na razão parte aérea:raiz em resposta ao maior suprimento de nitrato é amplamente documentado na literatura (1993; Marschner 1995 e referências ali contidas), e é mais expressivo em plantas de maior idade (Ingestad, 1979; Améziane *et al.*, 1997a), como verificado em *V. herbacea* onde maior crescimento da parte aérea ocorreu no final do primeiro e segundo ciclos de vida.

A possibilidade da alteração na razão órgãos aéreos:órgãos subterrâneos através da manipulação de nutrientes é de particular interesse em plantas que apresentam órgãos subterrâneos de reserva. Em *C. intybus*, por exemplo, a baixa razão parte aérea:raiz induzida pela deficiência de nitrogênio é uma estratégia adotada para produção de raízes tuberosas, ricas em frutanos, viabilizando o seu cultivo sem a necessidade de aplicação de nutrientes (Améziane *et al.*, 1997b; Schittenhelm 1999).

A disponibilidade de nitrogênio também interfere na alocação de matéria seca entre parte aérea e raiz (Rufty *et al.*, 1984; Bastow-Wilson, 1988). De maneira geral, as plantas alocam menos biomassa para folhas e mais para raiz quando o nitrogênio está em deficiência (Lambers *et al.*, 1998) como verificado em *V. herbacea* (fig. 3). Considerando-se que a alocação na folha mostra a fração de matéria seca não exportada para os demais órgãos, conclui-se que o poder de exportar assimilados da fonte para o dreno foi maior em plantas de *V. herbacea* cultivadas sob N-limitado. Isto indica que, mesmo sendo uma característica genética, o padrão da alocação está sujeito a influência de variáveis ambientais (Poorter & Nagel, 2000). Embora a biomassa seca dos rizóforos tenha sido menor sob N-limitado, a sua alocação foi maior, mostrando que a partição de matéria seca para determinado órgão pode diminuir sem necessariamente ser acompanhada pelo declínio da alocação, como salientaram Poorter & Nagel (2000).

O mecanismo que controla a partição de biomassa entre parte aérea e raiz foi postulado por Brower (1983) através do modelo denominado “equilíbrio funcional”. De acordo com este princípio, o crescimento da raiz está sob controle dos fotoassimilados, e o crescimento da parte aérea, limitado pelos nutrientes disponíveis para a raiz. Esse balanço pode ser modificado pelo estresse ambiental, em destaque, a deficiência de nitrogênio (Thornley, 1995). Nesse aspecto, tem sido proposto que a limitação do nitrogênio leva à baixa utilização do carbono fixado nas folhas e, conseqüentemente, aumenta o fluxo de carbono para os órgãos subterrâneos,

disponibilizando maior energia para a absorção radicular e divisão celular, e favorecendo, desse modo, o crescimento da raiz (Rufty *et al.*, 1984; Tolley & Raper, 1991). Améziane *et al.* (1995, 1997a) demonstraram, mais recentemente, que o maior fluxo de fotossintatos para raízes tuberosas de *C. intybus* é controlado pela atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo de frutanos (SST e FFT), cujas atividades foram estimuladas pela baixa disponibilidade do nitrogênio.

Outro efeito marcante observado em plantas cultivadas sob maior suprimento de nitrogênio refere-se ao aumento da área foliar (Gastal *et al.*, 1992, citado por Lambers *et al.*, 1998), também observada de forma acentuada em *V. herbacea* após um ano de cultivo (tabela 2), coincidindo com o aumento do número de folhas. Por outro lado, a área foliar unitária decresceu, revelando uma relação inversa entre número de folhas e área foliar unitária em plantas enriquecidas com nitrogênio. Já em plantas tratadas com restrição de nitrogênio, a área foliar unitária aumentou no segundo ciclo de vida. Essa estratégia sugere um eficiente mecanismo fisiológico capaz de maximizar a interceptação luminosa para produção de fotossintatos em quantidade suficiente para atender a demanda do limitado crescimento sob restrição de nitrogênio. Esse procedimento é indicativo da maior eficiência na utilização dos nutrientes em *V. herbacea* sob deficiência mineral na fase de rebrota, uma vez que um dos efeitos manifestado pelo nitrogênio é o de promover a expansão foliar (Marschner, 1995). Revisando o assunto, esse autor alegou que espécies restritas a ambientes pobres em nutrientes desenvolveram estratégias adaptativas no sentido de garantir a necessária atividade metabólica para manter o seu crescimento. Isso pode ocorrer por meio de um aumento na eficiência da absorção do sistema radicular através da maior liberação de H^+ , de ácidos orgânicos e de substâncias formadoras de quelatos pela raiz, facilitando a absorção dos nutrientes, em especial a do ferro (Larcher, 2000).

Há referências de que o estresse ambiental causado por déficit hídrico e nutricional antecipa alguns processos fisiológicos como a senescência (Marschner, 1995; Larcher 2000). Em *V. herbaceae*, a senescência dos órgãos aéreos, que ocorreu no mês de julho, aconteceu antes nas plantas sob N-limitado. O mesmo se verificou quanto à rebrotação, sugerindo que o estresse nutricional seja um fator considerável para a quebra de dormência das gemas vegetativas dos rizóforos na fase de rebrota. Esse ajuste no ciclo fenológico configura-se numa estratégia adaptativa para garantir a sobrevivência em condições de restrição nutricional, como é comum em espécies que se desenvolvem em ambientes estressantes (Larcher, 2000).

Em sua revisão, Lambers *et al.* (1998) ponderaram que a maior disponibilidade de nitrogênio estimula a síntese de citocininas, e que a maior concentração desse hormônio nas folhas promove a divisão celular, a expansão celular e a integridade da clorofila, retardando a senescência foliar. Em plantas de *V. herbacea*, N-enriquecido elevou o conteúdo de clorofila e a razão clorofila *a:b* (fig. 4), indicando investimento preferencial na estrutura das antenas do fotossistema II, ricas em clorofila *a* (Lambers *et al.*, 1998). Estas alterações podem ter elevado a capacidade fotossintética em *V. herbacea*, pois, conforme relatado por Hesketh *et al.* (1983), existe alta correlação entre a fotossíntese e teor de clorofila. Concentrações ótimas de nitrogênio têm sido associadas ao aumento na eficiência fotossintética por estimular a síntese de Rubisco e proteínas estruturais em nível das membranas dos tilacóides, pigmentos fotossintetizantes e de compostos da cadeia transportadora de elétrons (Marschner, 1995). Sintomas de deficiência de nitrogênio, como clorose e morte de folhas podem ser visualizadas em folhas basais (Larcher, 2000), também observados em plantas de *V. herbacea* cultivadas sob N-limitado.

Ainda que fatores ambientais estressantes tais como seca, temperaturas extremas e deficiência de nutrientes possam antecipar a transição da fase vegetativa para a reprodutiva em muitas espécies (Marschner, 1995; Larcher, 2000) isso não ocorreu em plantas de *V. herbacea*

sob restrição de nitrogênio. Embora continuassem a crescer, de forma limitada, essas plantas não floresceram, indicando que o nitrogênio é elemento essencial para o ciclo de vida dessa asterácea. A maior concentração de nitrato estimulou a floração, confirmando a hipótese de que, além de outros fatores ambientais, a aplicação do nitrogênio também influi, consideravelmente, na indução de gemas florais (Chapin *et al.*, 1990; Marschner, 1995; Larcher, 2000).

Além dos elementos minerais, os carboidratos são os compostos orgânicos mais requisitados pelos órgãos reprodutivos (Bernier *et al.*, 1993). O consumo de assimilados para a reprodução pode ser bastante significativo, chegando a representar de 5% a 40% dos assimilados translocáveis (Larcher, 2000). Carvalho & Dietrich (1993) relataram que 45% das reservas de carboidratos dos rizóforos foram requeridos para a floração em *V. herbacea*. Resultado similar foi observado em plantas *V. herbacea* cultivadas sob N-enriquecido (fig. 2), onde cerca de 54% dos carboidratos solúveis dos rizóforos foram consumidos na fase de rebrota e de floração (setembro).

Ainda que seja uma espécie bem adaptada ao bioma cerrado, pobre em nutrientes minerais, a maior oferta de nitrato elevou a TCR e a TAL em plantas de *V. herbacea* na fase de crescimento rápido do primeiro (0 – 90 dias) e do segundo (270 – 360 dias) ciclos de vida (tabela 2). Essa pequena elevação na TCR e na TAL, em plantas tratadas com N-enriquecido, indica que essa espécie possui baixo potencial de TCR, sustentando o conceito de que espécies nativas adaptadas a solos pobres em nutrientes mostram baixa taxa de crescimento, mesmo quando a disponibilidade de nutrientes é maior (Lambers & Poorter, 1992; Marschner, 1995; Lambers *et al.*, 1998).

Com base nas características adaptativas para a disponibilidade de nutrientes no solo, Chapin (1980, 1988) classificou as espécies nativas em dois grupos: Tipo I, compreendendo espécies de crescimento lento e Tipo II, espécies ruderais com características nutricionais

semelhantes às das espécies agrícolas (crescimento rápido). De acordo com essa classificação, plantas do Tipo I crescem lentamente mesmo quando cultivadas com maior suprimento nutricional. Em situações de maior fertilidade, espécies do Tipo I acumula os nutrientes que podem ser utilizados quando as condições nutricionais forem limitantes (“luxury consumption”). Para espécies do Tipo II, a taxa de crescimento é sensivelmente reduzida em períodos de limitada oferta de nutrientes e sintomas visuais de deficiência podem ser observadas. Essas plantas respondem rapidamente ao maior suprimento de nutrientes, aumentando a taxa de crescimento, especialmente a da parte aérea. No caso de *V. herbacea*, apesar de ter sido visualizada a clorose nas folhas basais em plantas sob restrição do nitrogênio, os valores de TCR e TAL foram muito baixos, mesmo em plantas que receberam maior concentração de nitrogênio, o que permitiu classificá-la como espécie de crescimento lento ou Tipo I.

Em geral, a TAL não tem correlação com a TCR em dicotiledôneas, mas sim nas monocotiledôneas (Lambers *et al.*, 1998). No entanto, em *V. herbacea*, essa correlação foi significativa ($r^2 = 0,973$, $P = 5\%$), mostrando que a TAL, junto com a área foliar, são as principais variáveis determinantes da TCR (Lambers & Poorter, 1992). A TAL está relacionada ao balanço do carbono ganho na fotossíntese e do consumido por toda a planta na respiração (Lambers *et al.*, 1998) e, portanto, as variações na TAL observada em *V. herbacea*, em ambos os tratamentos, são reflexos das alterações na fotossíntese e/ou na respiração. Contudo, parece que *V. herbacea*, bem como outras espécies de crescimento lento, emprega relativamente mais carbono na respiração, principalmente para o crescimento de raízes (Chapin, 1980, 1988).

A queda da TAL observada do outono até a primavera (180 – 270 dias, tabela 2) nos dois tratamentos, também pode estar associada à redução da atividade fotossintética em junho, quando a concentração de clorofila *a* caiu sensivelmente (fig. 4), e ao aumento da respiração no início do segundo ciclo de crescimento (setembro), quando o consumo das reservas de

carbono dos rizóforos (fig. 2), requerido pela demanda do crescimento dos novos ramos aéreos, foi relativamente mais intenso nas plantas que receberam maior suprimento de nitrato.

A maior TAL verificada no verão do primeiro e do segundo ciclos de crescimento, em plantas submetidas ao N-enriquecido, mostra que o saldo de carbono ganho na fotossíntese em relação ao consumido na respiração foi maior do que o de plantas sob restrição de nitrato. Por outro lado, no início da fase de rebrota, a TAL atingiu valores negativos, com destaque para plantas que receberam N-enriquecido, indicando que no início do segundo ciclo de crescimento as plantas consumiram mais e produziram menos. Com efeito, essa característica já foi observada por Carvalho *et al.* (1997) em plantas de *V. herbacea* cultivadas em condições naturais.

A baixa TCR verificada do outono até a primavera pode ser associada à menor TAL, mas não à RAF, que foi maior em plantas sob N-limitado (tabela 3). Em suma, a limitação do crescimento sob restrição de nitrogênio foi decorrente da menor eficiência fotossintética (TAL) e não da produção de área fotossintetizante em relação à massa total da planta (RAF). Em junho, mês que antecede a senescência dos órgãos aéreos, a RAF decresceu, sinalizando alterações metabólicas que irão se refletir nas taxas de crescimento e na fenologia da planta. Esse declínio pode ser devido às reduções na AFE e na alocação de biomassa em folhas, componentes da RAF.

Por tratar-se de um componente morfo-anatômico da RAF, a AFE se correlaciona significativamente com essa razão e, por isso, é uma variável fortemente associada com a TCR (Lambers & Poorter, 1992), como observado em *V. herbacea* (tabela 3). As diferenças na AFE, em resposta às concentrações de nitrato, concordam com Hunt (1982) quando afirma que a AFE é muito sensível às mudanças ambientais. Essa medida é inversamente relacionada à constituição da parede celular (MFE) e indicativa do escleromorfismo, do tamanho do parênquima paliçádico e do conteúdo de lignina (Lambers & Poorter, 1992; Lambers *et al.*,

1998). Sob intensa deficiência de nitrogênio, as células são menores e possuem parede celular mais espessa, sintomas conhecidos como peinomorfismo ou esclerose por deficiência de nitrogênio (Larcher, 2000). No entanto, a MFE foi maior em plantas de *V. herbacea* tratadas com N-enriquecido. Isso pode ser atribuído ao maior conteúdo de clorofila e de açúcares solúveis encontrados em folhas de *V. herbacea* sob esse tratamento e, presumivelmente, ao aumento em espessura da camada do parênquima paliçádico e ao conteúdo dos cloroplastos, considerados os maiores componentes da massa do citoplasma das células do mesofilo (Lambers *et al.*, 1998).

Apesar das variações fenológicas que apresenta no decorrer do ano, *V. herbacea* respondeu ao N-enriquecido com aumento de matéria seca, número de folhas e área foliar, elevando a taxa de crescimento relativo. A principal razão para isso foi a maior taxa de fotossíntese líquida (TAL). Segundo Grime & Hunt (1975), valores de TCR inferiores a 0,150 g/g/d são considerados baixos e as taxas mais elevadas, da ordem de 0,300 g/g/d, tem sido encontradas em herbáceas. O valor máximo de TCR (23,6 mg/g/d) em *V. herbacea* confirma sua característica de espécie de crescimento lento ou Tipo I. Os valores de RAF em *V. herbacea* (1,5 a 4,8 cm²/g) encontram-se muito abaixo daqueles relatados para outras herbáceas (75 a 280 cm²/g) conforme relatado por Lambers *et al.* (1998) e devem ter contribuído, também, para sua baixa taxa de crescimento. Baixa TCR é considerada por Grime & Hunt (1975) como uma estratégia de sobrevivência de plantas em ambientes menos férteis. Essas plantas são menos passíveis de exaurir as reservas do ambiente, o que lhes possibilita, quando sob maior suprimento de nutrientes, armazená-los ao invés de aproveitá-los para o rápido crescimento, vindo a utilizá-los mais tarde quando as condições nutricionais forem deficitárias (Chapin, 1980).

Carboidratos solúveis. Além de limitar o crescimento, a deficiência nutricional altera a alocação de fotossintatos (Ruffy *et al.*, 1984; Bastow-Wilson, 1988). Nesse contexto, plantas de *V. herbacea* sob N-limitado apresentaram maior conteúdo de frutanos em rizóforos nos meses de junho e dezembro, quando as plantas se encontravam em estágio mais avançado do crescimento (fig. 2). Améziane *et al.* (1997a) também mostraram que as maiores diferenças do efeito do nitrato sobre os carboidratos de reserva ocorreram em plantas adultas de *C. intybus* caracterizadas pela fase de maior acúmulo de frutanos. Nessa fase do desenvolvimento, a deficiência do nitrogênio reduziu a razão parte aérea:raiz, e aumentou a proporção de ^{14}C translocado para as raízes tuberosas de *C. intybus* (Améziane *et al.*, 1995) e para tubérculos de *Solanum tuberosum* (Oparka *et al.*, 1987).

De acordo com a hipótese de Münch, o carregamento e o descarregamento do floema é dependente do gradiente de turgor entre a fonte e o dreno (Farrar, 1996). Sendo assim, o aumento no conteúdo de fotossintatos em folhas (força da fonte) exerceria o impulso necessário para a exportação dos carboidratos em direção ao dreno. Ao invés disso, em plantas de *V. herbacea* sob N-enriquecido, a força da fonte nos meses de junho e de dezembro foi maior do que no outro tratamento sem ser acompanhada de aumento na atividade metabólica do dreno, evidenciada pela menor concentração de frutanos nos rizóforos (fig. 2). Embora a taxa de exportação de fotossintatos possa ser controlada pela força da fonte, o fluxo de massa pode variar independente da força da fonte (Améziane *et al.*, 1995), sugerindo que o dreno seja o fator intrínseco limitante no transporte de carbono no sistema fonte-dreno (Ho, 1988; Marcelis 1996), e que o carregamento e o descarregamento do floema, em *V. herbacea*, estariam mais relacionados ao dreno, e esse influenciado pelas condições nutricionais.

Considerando-se que a síntese de frutanos é dependente da ação conjunta das enzimas SST e FFT, Améziane *et al.* (1997a, b) ressaltaram que a capacidade em atrair e acumular fotossintatos em dreno esteja sob o controle das enzimas relacionadas à síntese de frutanos

cujas atividades podem aumentar quando os níveis de nitrogênio são baixos. Assim, um aumento na atividade de SST e FFT também pode ter ocorrido em plantas de *V. herbacea* que apresentaram maior concentração de frutanos sob N-limitado, confirmando o conceito de que o dreno é o fator limitante no fluxo de fotossintatos (Ho, 1988; Marcelis, 1996).

Além dos fatores externos, o nível endógeno de carboidratos pode também influir na atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo de sacarose (Farrar, 1996). Nesse sentido, concentrações elevadas de sacarose estimulam a síntese e a atividade da SST e FFT, aumentando a capacidade do dreno em atrair e armazenar fotossintatos (Pollock & Cairns, 1991; Améziane *et al.*, 1997a; Van den Ende *et al.*, 1999). No entanto, comparando as duas condições nutricionais aplicadas em *V. herbacea*, a maior concentração de frutanos encontrada sob N-limitado (fig. 2) não pode ser relacionada ao conteúdo de sacarose que foi menor nesse tratamento (fig. 8). Os resultados sugerem que a maior síntese de frutanos sob deficiência de nitrogênio poderia levar à rápida remoção da sacarose do meio, assegurando, dessa maneira, o gradiente de concentração de sacarose entre o floema e o dreno (Améziane *et al.*, 1995), necessário para o descarregamento do floema.

O suprimento diferencial de nitrogênio alterou as frações de frutanos em *V. herbacea* (fig. 5). Resultado similar foi constatado em *C. intybus* (Van den Ende *et al.*, 1999), *V. herbacea* (Teixeira *et al.*, 1997) e *Polymnia Sonchifolia* (Tsukinhashi *et al.*, 1991). Para essas espécies, condições favoráveis ao crescimento levaram à diminuição na proporção de frutanos de cadeia longa, indicando que a degradação dos fruto-polissacarídeos ocorre para atender à demanda da parte aérea. Da mesma forma, Carvalho *et al.* (1998) notaram uma diminuição nos fruto-polissacarídeos de GP>8 em relação aos fruto-oligofrutanos (GP 3-8) em plantas de *V. herbacea* com dois anos de cultivo sob adubação mineral. Tais resultados confirmam a hipótese de que fatores externos modificam a distribuição das classes moleculares de frutanos (Pollock, 1986).

O declínio no conteúdo de frutanos ocorrido em setembro (fig. 2) foi acompanhada de aumento na concentração de açúcares redutores que foi maior em N-enriquecido (fig. 6). Essas alterações indicam a ocorrência de hidrólise de frutanos pela enzima frutano exohidrolase (FEH) cuja atividade é estimulada por ocasião da rebrota dos ramos aéreos (Asega & Carvalho, 1999). O aumento dos açúcares redutores, entretanto, não foi tão acentuado quanto a diminuição ocorrida no conteúdo de frutanos, evidenciando a translocação dos açúcares liberados para a parte aérea da planta na fase de brotação e floração (Carvalho & Dietrich, 1993).

A força do dreno aparente e a atividade do dreno foram influenciadas pelas concentrações de nitrato em *V. herbacea* (fig. 7). A atividade do dreno mostrou-se um componente determinante da força do dreno aparente, em ambos os tratamentos. Um outro fator associado à força do dreno pode ser atribuído à partição de biomassa para os rizóforos, que foi maior sob N-enriquecido sustentando a afirmação de que a força do dreno pode aumentar em tratamentos que promovam ganho da massa seca do dreno (=tamanho do dreno, conforme definido por Wardlaw, 1990). Portanto, em *V. herbacea* os resultados mostraram que a força do dreno aparente refletiu na biomassa seca, corroborando Marcelis (1996) ao afirmar que quando a força do dreno de um órgão é maior, sua taxa de crescimento será maior, resultando em aumento do tamanho do dreno.

Considerando-se que a força do dreno mostra a capacidade do órgão de reserva em importar e armazenar assimilados (Farrar, 1993), tem sido proposto que o tamanho do dreno pode ser determinado pelo volume do vacúolo, tamanho da célula e número de células (Ho, 1988). Esses parâmetros foram intimamente relacionados ao número, comprimento e diâmetro dos tubérculos de *H. tuberosus* (Schubert & Feuerle, 1997). Logo, a divisão celular e a expansão celular são eventos que caracterizam a capacidade de síntese de frutanos em células

de órgão-dreno. No entanto, sob N-enriquecido, a força do dreno aparente em plantas de *V. herbacea* foi maior, mas a concentração de frutanos foi menor.

Para explicar esse comportamento, tem sido demonstrado que a restrição de nitrogênio pode reduzir a fonte de auxinas da parte aérea para os órgãos de armazenamento (Sachs, 1993; Cline, 1994), e que baixas concentrações desse hormônio diminuem o volume do vacúolo, a expansão celular e a taxa de crescimento, conforme descrito para os tubérculos de batata (Marschner *et al.*, 1984). Contudo, embora o maior suprimento do nitrogênio possa ter elevado o nível endógeno de auxina, promotora da divisão e expansão celular, eventos relacionados à capacidade do dreno (Schubert & Feuerle, 1997), o que se verificou foi uma menor concentração de frutanos em *V. herbacea* sob N-enriquecido. Ou seja, se por um lado o N-enriquecido, possa ter elevado a capacidade do dreno (divisão e expansão celular) e a força do dreno aparente em *V. herbacea*, por outro lado, essa condição favorável ao crescimento pode ter restringido a atividade da SST e FFT, resultando numa menor concentração de frutanos.

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que, embora o maior suprimento de nitrogênio tenha estimulado o crescimento de órgãos aéreos e rizóforos, a eficiência fotossintética e a força do dreno aparente em *V. herbacea*, este tratamento levou ao menor acúmulo de frutanos, confirmando o conceito de que condições favoráveis ao crescimento levam à redução da concentração de frutanos (Pollock, 1986). Os resultados sugerem ainda que, a atividade da SST e da FFT, enzimas relacionadas na síntese de frutanos, possa ser estimulada quando os níveis de nitrogênio são baixos, especialmente em plantas de idade mais avançadas caracterizadas pela fase de maior estocagem de frutanos. Sob essa deficiência nutricional, *V. herbacea* acumulou, preferencialmente, mais fruto-polissacarídeos em relação aos fruto-oligossacarídeos, independente da força da fonte.

Agradecimentos – A FAPESP, pelo apoio financeiro (Biotasp proc. 98/05124-8), ao CNPq, pelas bolsas de Produtividade em Pesquisa de M.A.M Carvalho e L.B.P. Zaidan e à CAPES (PICDT proc. 23068.000024/99-20) pela concessão de bolsa de doutorado à G.R.F. Cuzzuol.

LITERATURA CITADA

- Almeida, V. P. 1994. Tuberação em *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae), uma espécie do cerrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Améziane, R., Limami, M.A., Noctor, G. & Morot-Gaudry, J.-F. 1995. Effect of nitrate concentration during growth on carbon partitioning and sink strength in chicory. *Journal of Experimental Botany* 46:1423-1428.
- Améziane, R., Deléens, E., Noctor, G., Morot-Gaudry, J.-F. & Limami, M.A. 1997a. Stage of development is an important determinant in the effect of nitrate on photoassimilate (¹³C) partitioning in chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of Experimental Botany* 48:25-33.
- Améziane, R., Cassan, L., Dufossé, C., Rufty Jr., T.W. & Limami, A.M. 1997b. Phosphate availability in combination with nitrate availability affects root yield and chicon yield and quality of Belgian endive (*Cichorium intybus*). *Plant and Soil* 191:269-277.
- Asega, A.F. & Carvalho, M.A.M. 1999. Sprouting and fructan exohydrolase activity in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. IN: XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Celular (SBBq), Caxambú, Brasil, resumos.
- Bastow-Wilson, J. 1988. A review of evidence on the control of shoot:root ratio, in relation to models. *Annals of Botany* 61:433-439.
- Beadle, C.L. 1986. Plant growth analysis. IN: *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis* (J. Coombs & D.O. Hall, eds), Pergamon Press, Oxford, pp.20-25.
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. & Lejeune, P. 1993. Physiological signals that induce flowering. *American Society of Plant Physiologists* 5:1147-1155.
- Brower, R. 1983. Functional equilibrium: sense or nonsense? *Netherlands Journal of Agricultural Science* 31:335-348.
- 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 ¹²CO₂ feeding. *New Phytologist* 109:399-405.

- Carvalho; M.A.M & Dietrich, S.M.C. 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123:735-740.
- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C. 1997. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. *New Phytologist* 136:153-161.
- Carvalho, M.A.M., Pinto, M.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21:275-280.
- Chapin, F.S. III. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:233-260.
- Chapin, F.S. III. 1988. Ecological aspects of plant mineral nutrition. IN: *Advances in Plant Nutrition* (B. Tinker and A. Läuchli, eds), Vol. 3, Praeger, New York, pp.161-191.
- Chapin, F.S.III, Walter, C.H.S. & Clarkson, D.T. 1988. Growth response of barley and tomato to nitrogen stress and its control by abscisic acid, water relations and photosynthesis. *Planta* 173:352-366.
- Chapin, F.S.III, Schulze, E.D. & Mooney, H.A. 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21:423-447.
- Cline, M.C. 1994. The role of hormones in apical dominance. *New approaches to an old problem in plant development. Physiologia Plantarum* 90:230-237.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Dietrich, S.M.C. & Mello-Aires, M. 1996. Measurement of glomerular filtration rate using inulin prepared from *Vernonia herbacea*, a Brazilian native species. *Brazilian Journal Medicinal Biology Research* 29:1393-1396.
- Ericsson, T. 1995. Growth and shoot: root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. *Plant and Soil* 168-169:205-214.
- Farrar, J.F. 1993. Sink strength: what is it and how do we measure it? *Plant Cell and Environment* 16:1047-1057.
- Farrar, J.F. 1996. Sinks – integral parts of a whole plant. *Journal of Experimental Botany* 47:1273-1279.
- 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. *Revista Brasileira de Botânica* 9:159-166.

- Gerdoc, J.J., McCONNAUGHAY, K.D.M. & Coleman, J.S. 1996. Plasticity in root/shoot partitioning: optimal, ontogenetic, or both? *Functional Ecology* 10:44-50.
- Grime, J.P. & Hunt, R. 1975. Relative growth-rate: Its range and adaptive significance in a local flora. *Journal Ecology* 63:393-422.
- Hendry, G.A. & Wallace, R.K. 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. IN: *Science and Technology of Fructans* (M. Suzuki & N.J. Chatterton, eds), CRC Press, Boca Raton, pp.119-139.
- Hesketh, J.D., Larson, E.M., Gordon, A.J. & Peters, D.B. 1983. Internal factors influencing photosynthesis and respiration. IN: *The Growth and Functioning of Leaves* (J.E. Dale & F.L. Milthorpe, eds), 2nd Edition, Cambridge University Press, Cambridge, pp.381-411.
- Ho, L.C. 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:355-378.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1938. *The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil*. California Agricultural Experimental Station. Circ. No. 347.
- Hunt, R. 1982. *Plant Growth Curves: The Functional Approach to Plant Growth Analysis*. Edward Arnold Publishers, London.
- Ingestad, T. 1979. Nitrogen stress in birch seedlings. *Physiologia Plantarum* 45:149-157.
- Jermyn, M.A. 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature* 177:38-39
- Lambers, J. & Poorter, H. 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecological Research* 23:187-261.
- Lambers, J., Chapin, F.S. & Pons, T.L. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, New York, 540p.
- Larcher, W. 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. RiMa, São Carlos, 529p.
- Lichtenthaler, H.K. & Wellburn, A.R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11:591-592.
- Marcelis, L.F.M. 1993. Effect of assimilate supply on the growth of individual cucumber fruits. *Physiologia Plantarum* 87:321-328.
- Marcelis, L.F.M. 1996. Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. *Journal of Experimental Botany* 47:1281-1291.

- Marschner, H., Sattelmacher, B. & Bangerth, F. 1984. Growth rate of potato tubers and endogenous contents of indolyacetic acid and abscisic acid. *Physiologia Plantarum* 60:16-20.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd Edition, Academic Press, Orlando, 649p.
- Marschner, H., Kirkby, E.A. & Cakmak, I. 1995. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany* 47:1255-1263.
- Niness, K.R. 1999. Inulin and oligofructose: what are they? *The Journal of Nutrition* 129:1402-1406.
- Oparka, K.J., Davies, H.V. & Prior, D.A.M. 1987. The influence of applied nitrogen on export and partitioning of current assimilate by field-grown potato plants. *Annals of Botany* 56:311-232.
- Pollock, C.J. 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist* 104:1-24.
- Poorter, H. & Nagel, O. 2000. The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* 27:595-607.
- Rufty, T.W., Raper, C.D. & Huber, S.T. 1984. Alterations in internal partitioning of carbon in soybean plants in response to nitrogen stress. *Canadian Journal of Botany* 62:503-507.
- Sachs, T. 1993. The role of auxin in the polar organization of apical meristems. *Australian Journal of Plant Physiology* 20:541-553.
- Salisbury, F.B. & Ross, C.W. 1992. *Plant Physiology*. 4th Edition, Wardsworth Publishing Company, Belmont, 682p.
- Shiomi, N. 1993. Structure of fructopolysaccharide (Asparagosin) from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *New Phytologist* 123:263-270.
- Schittenhelm, S. 1999. Agronomic Performance of root Chicory, Jerusalem Artichoke, and Sugarbeet in stress and nonstress environments. *Crop Science* 39:1815-1823.
- Schubert, S. & Feuerle, R. 1997. Fructan storage in tubers of Jerusalem artichoke: characterization of sink strength. 1997. 136:115-122.
- Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160:61-63.

- Teixeira, P.G., Carvalho, M.A.M, Zaidan, L.B.P. & Klein, A.L. 1997. Effect of mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 2:89-96.
- Thomas, B. & Vince-Prue, D. 1997. *Photoperiodism in Plantas*. Academic Press, London pp.317-334.
- Thornley, J.H.M. 1995. Shoot:root allocation with respect to C, N and P: an investigation and comparison of resistance and teleonomic models. *Annals of Botany* 75:391-405.
- Tolley, H.L. & Raper, C.D. 1991. Soluble carbohydrate allocation to roots, photosynthetic rate of leaves, and nitrate stress and irradiance. *Botanical Gazette* 152:23-33.
- Tsukinhashi, T., Asami, T., Minasawa, K. & Kubota, M. 1991. Effect of nitrogen and potassium fertilizer on the growth and yield of yacon (*Polysmnia sanchifolia*). *Vocacional Agriculture* 38:50-56.
- Van den Ende, W., Roover, J.De & Van Laere, A. 1999. Effect of nitrogen concentration of fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 105:2-8.
- Vianello, R.L. & Alves, A.R. 1991. *Metereologia Básica e Aplicações*. Imprensa Universitária, Viçosa.
- Wang, C. & Tilberg, J.-E. 1996. Effects of nitrogen deficiency on accumulation of fructan and fructan metabolizing enzyme activities in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* 97:339-345.
- Wang, C. & Tilberg, J.-E. 1997. Effects of short-term phosphorus deficiency on carbohydrate storage in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *New Phytologist* 136:131-135.
- Wardlaw, I.F. 1990. The control of carbon partitioning in plants. *New Phytologist* 116:341-381.
- Zonta, E.P, Machado A. A. & Silveira Júnior, P. 1984. *Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (SANEST)*. UFPel, Pelotas.

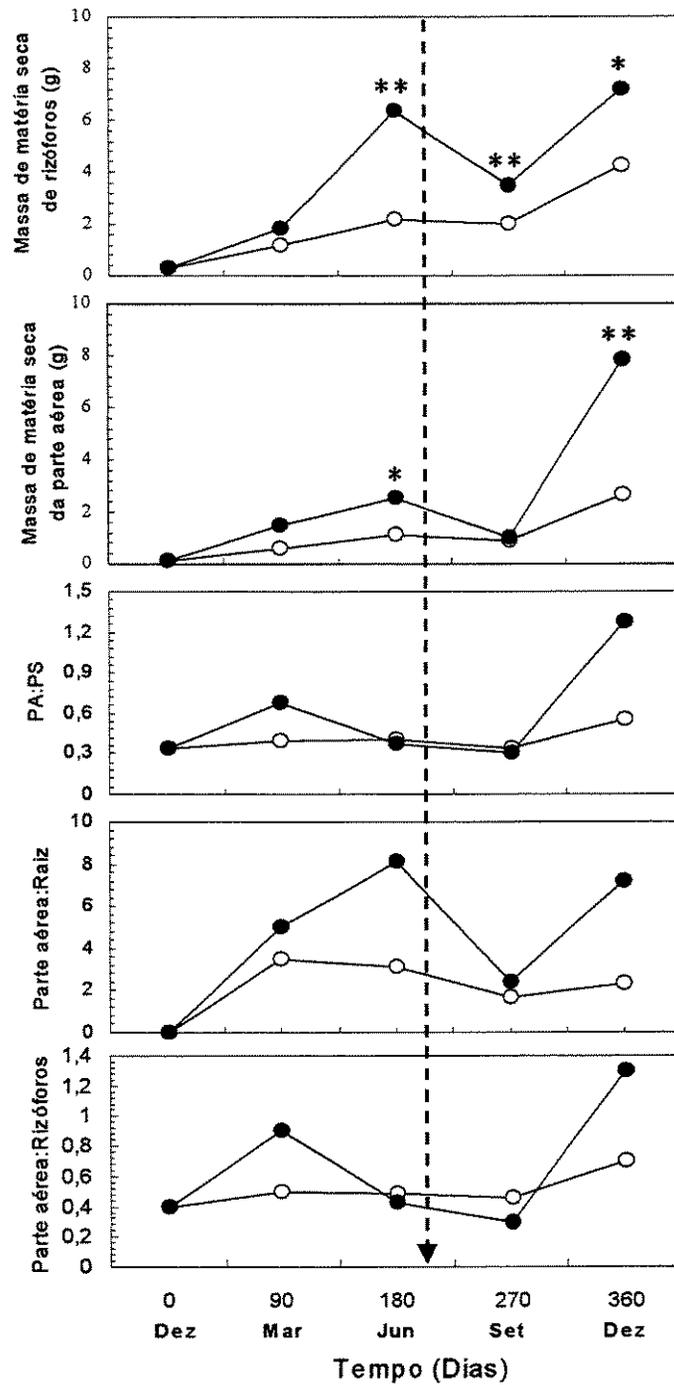


Figura 1. Efeito de nitrato na partição de biomassa seca e na relação parte aérea e órgãos subterrâneos em plantas de *V. herbacea*. Tratamentos: 1,3 mmol/L (O), 10,7 mmol/L (●) de $N-NO_3^-$. Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5%, **P = 1%. A época de senescência dos órgãos aéreos é indicada pela seta.

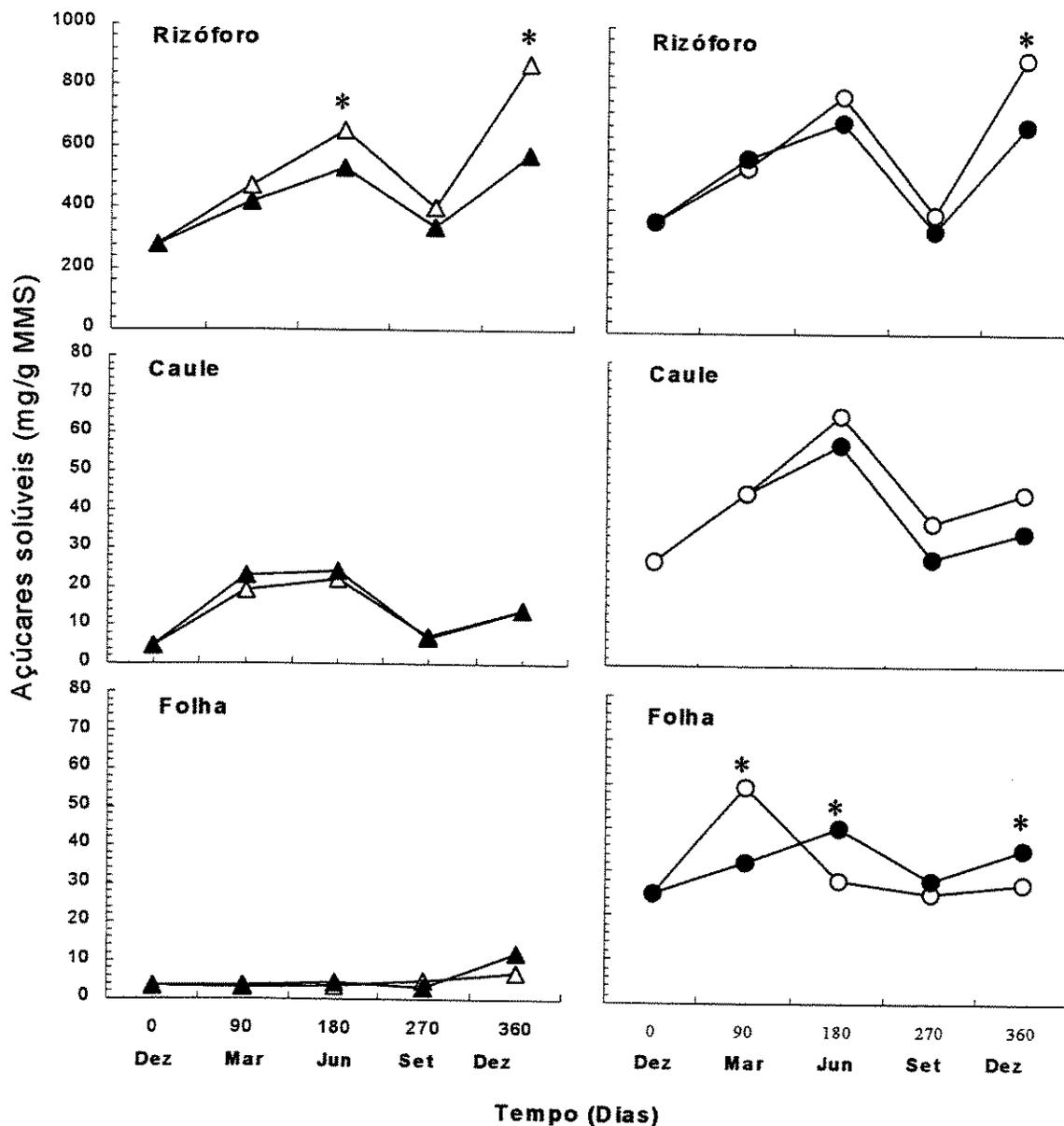


Figura 2. Efeito de nitrato na concentração dos carboidratos solúveis em rizóforos, caule e folhas de *V. herbacea*. Tratamentos: 1,3 mmol/L (Δ frutose total; \circ açúcares totais), 10,7 mmol/L (\blacktriangle frutose total; \bullet açúcares totais) de $N-NO_3^-$. Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5%, **P = 1%.

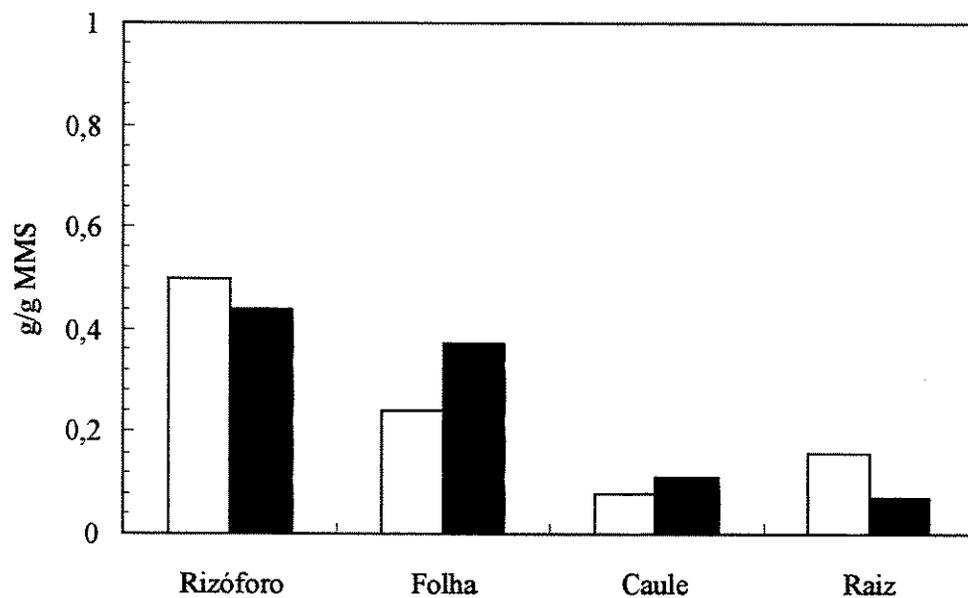


Figura 3. Efeito de nitrato na alocação de massa seca em rizóforo, folha, caule e raiz em plantas de *V. herbacea* aos 360 dias de cultivo. Tratamentos: 1,3 mmol/L (□), 10,7 mmol/L (■) de N-NO₃⁻.

Tabela 1. Efeito de nitrato no crescimento e na floração em plantas de *V. herbacea* tratadas com N-limitado (N-NO₃⁻ 1,3 mmol/L) e N-enriquecido (N-NO₃⁻ 10,7 mmol/L). Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5%, **P = 1%.

Tempo (Dias)	N-NO ₃ ⁻ 1,3 mmol/L						N-NO ₃ ⁻ 10,7 mmol/L					
	No. Ramos	Altura (cm)	Floração (%)	No. Folhas	Área Foliar (cm ²)		No. Ramos	Altura (cm)	Floração (%)	No. Folhas	Área Foliar (cm ²)	
					Planta	Folha					Planta	Folha
0 (Dez)	1	13,4	0	5,3	0,78	0,14	1	13,4	0	5,3	0,78	0,14
90 (Mar)	1	*13,5	0	*6,8	**6,38	*0,93	1	19,8	0	11,0	14,88	1,35
180 (Jun)	1	*20,1	0	*10,8	**10,83	*1,00	1	26,3	0	14,6	21,25	1,45
270 (Set)	1,5	21,3	**0	*8	*10,1	**1,26	2,3	18,3	50	12,0	7,39	0,62
360 (Dez)	**1,4	*27,5	0	**11	**22,3	*2,03	4	32,8	0	47,6	60,86	1,27

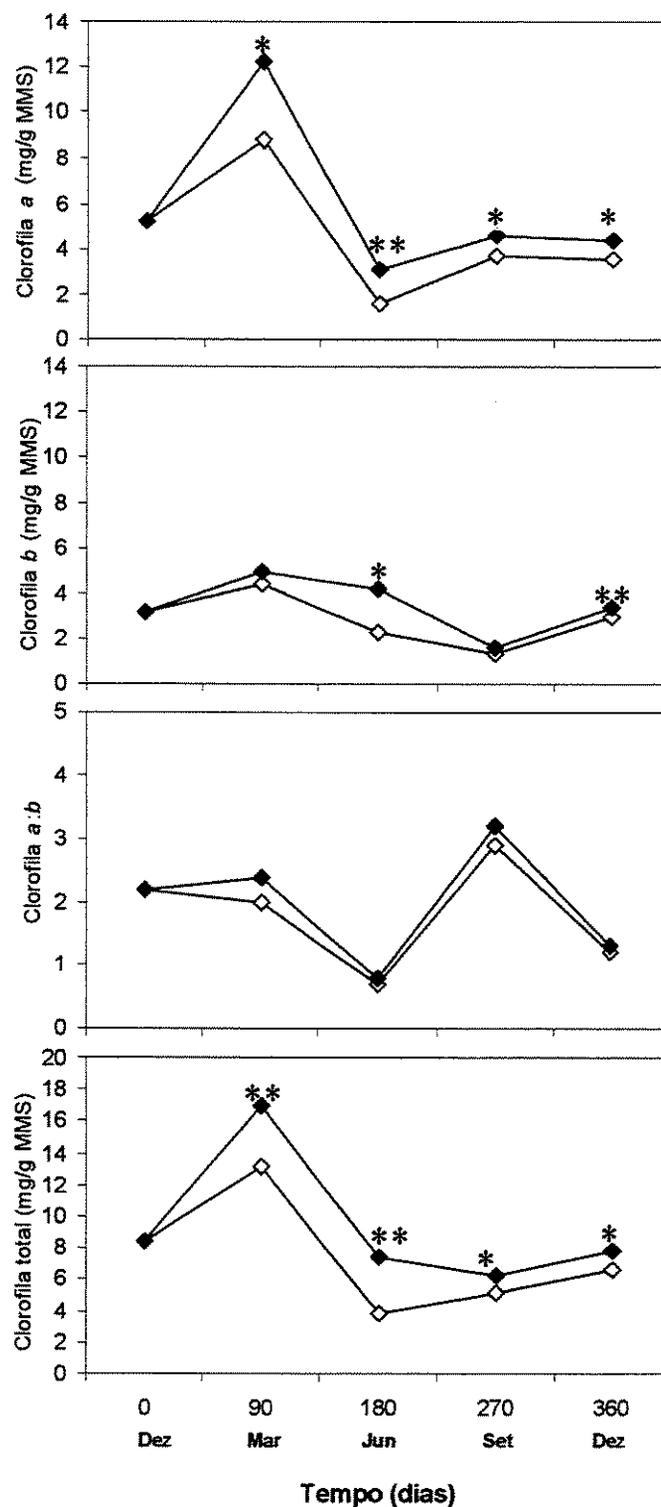


Figura 4. Efeito de nitrato na concentração de clorofila a , b , total e na razão clorofila $a:b$ em folhas de plantas de *V. herbacea*. Tratamentos: 1,3 mmol/L (\diamond), 10,7 mmol/L (\blacklozenge) de $N\text{-NO}_3^-$. Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de * $P = 5\%$, ** $P = 1\%$.

Tabela 2. Efeito de nitrato na taxa de crescimento relativo (TCR) e na taxa assimilatória líquida (TAL) em plantas de *V. herbacea* tratadas com N-limitado (N-NO_3^- 1,3 mmol/L) e N-enriquecido (N-NO_3^- 10,7 mmol/L). Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5%, **P = 1%.

Período (Dias)	N-NO_3^- 1,3 mmol/L			N-NO_3^- 10,7 mmol/L		
	TCR g/g/d	TAL g/cm ² /d	TF mgCO ² /cm ² /h	TCR g/g/d	TAL g/cm ² /d	TF mgCO ² /cm ² /h
0-90 (verão)	*0,013	*0,0038	0,6	0,024	0,0073	1,0
90-180 (outono)	0,011	0,0028	0,5	0,011	0,0035	0,6
180-270 (inv/prim)	*0,005	*0,0002	*0,03	-0,007	-0,0036	-0,04
270-360 (prim/ver)	0,010	0,0031	0,4	0,013	0,0047	0,7

Tabela 3. Efeito de nitrato na razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) e massa foliar específica (MFE) em plantas de *V. herbacea* tratadas com N-limitado (N-NO_3^- 1,3 mmol/L) e N-enriquecido (N-NO_3^- 10,7 mmol/L). Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5%, **P = 1%.

Tempo Dias	N-NO ₃ ⁻ 1,3 mmol/L			N-NO ₃ ⁻ 10,7 mmol/L		
	RAF cm ² /g	AFE cm ² /g	MFE g/cm ²	RAF cm ² /g	AFE cm ² /g	MFE g/cm ²
0 (Dez)	1,84	12,4	0,080	1,84	12,4	0,080
90 (Mar)	4,79	14,1	0,072	4,17	12,4	0,079
180 (Jun)	3,14	12,4	*0,075	2,31	10,6	0,102
270 (Set)	*2,92	*15,1	*0,061	1,51	11,0	0,090
360 (Dez)	*2,87	12,2	0,084	3,87	10,3	0,096

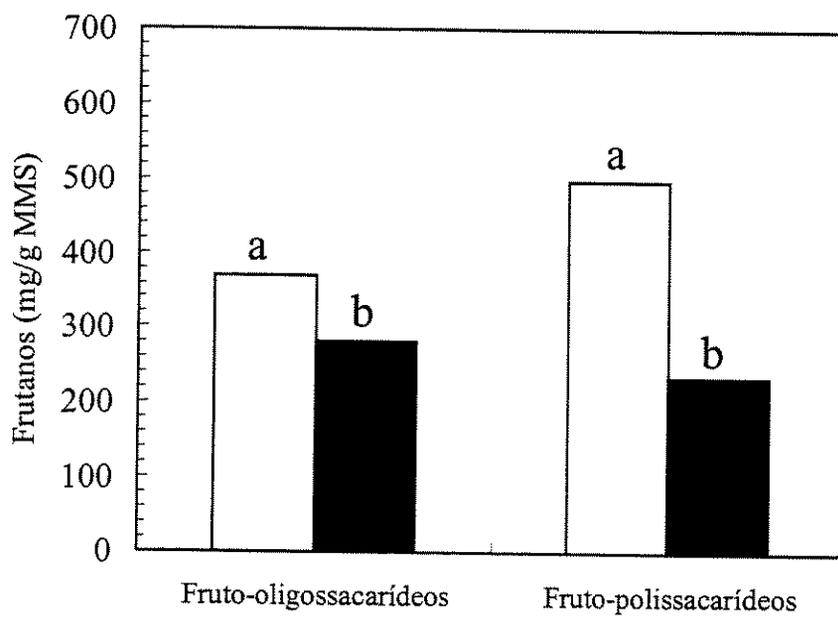


Figura 5. Efeito de nitrato na concentração de fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos em rizóforos de *V. herbacea* após 360 dias de cultivo. Tratamentos: 1,3 mmol/L (□), 10,7 mmol/L (■) de $N-NO_3^-$. As letras comparam as médias entre os tratamentos em cada fração de frutanos ($P = 5\%$).

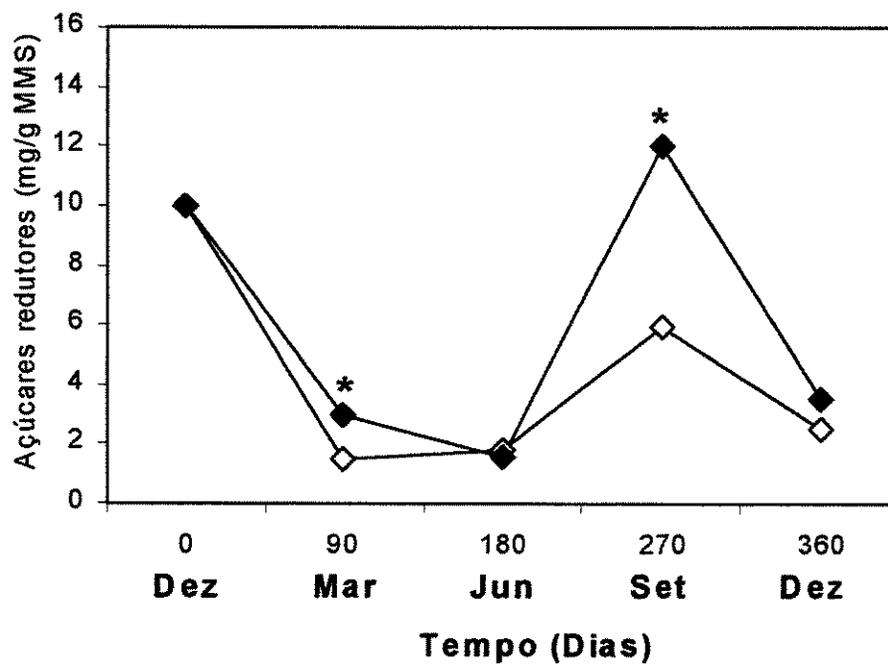


Figura 6. Efeito de nitrato na concentração dos açúcares redutores em rizóforos de *V. herbacea*. Tratamentos: 1,3 mmol/L (◇), 10,7 mmol/L (◆) de N-NO_3^- . Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5%, **P = 1%.

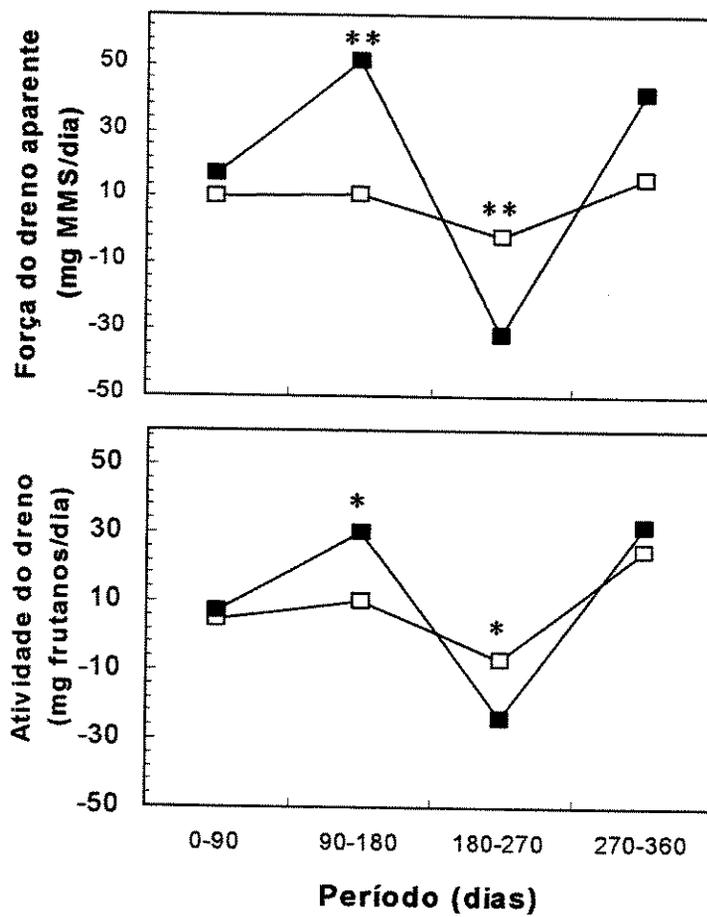


Figura 7. Efeito de nitrato na força do dreno aparente e na atividade do dreno em rizóforos de *V. herbacea*. Tratamentos: 1,3 mmol/L (□), 10,7 mmol/L (■) de $N-NO_3^-$. Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5%, **P = 1%.

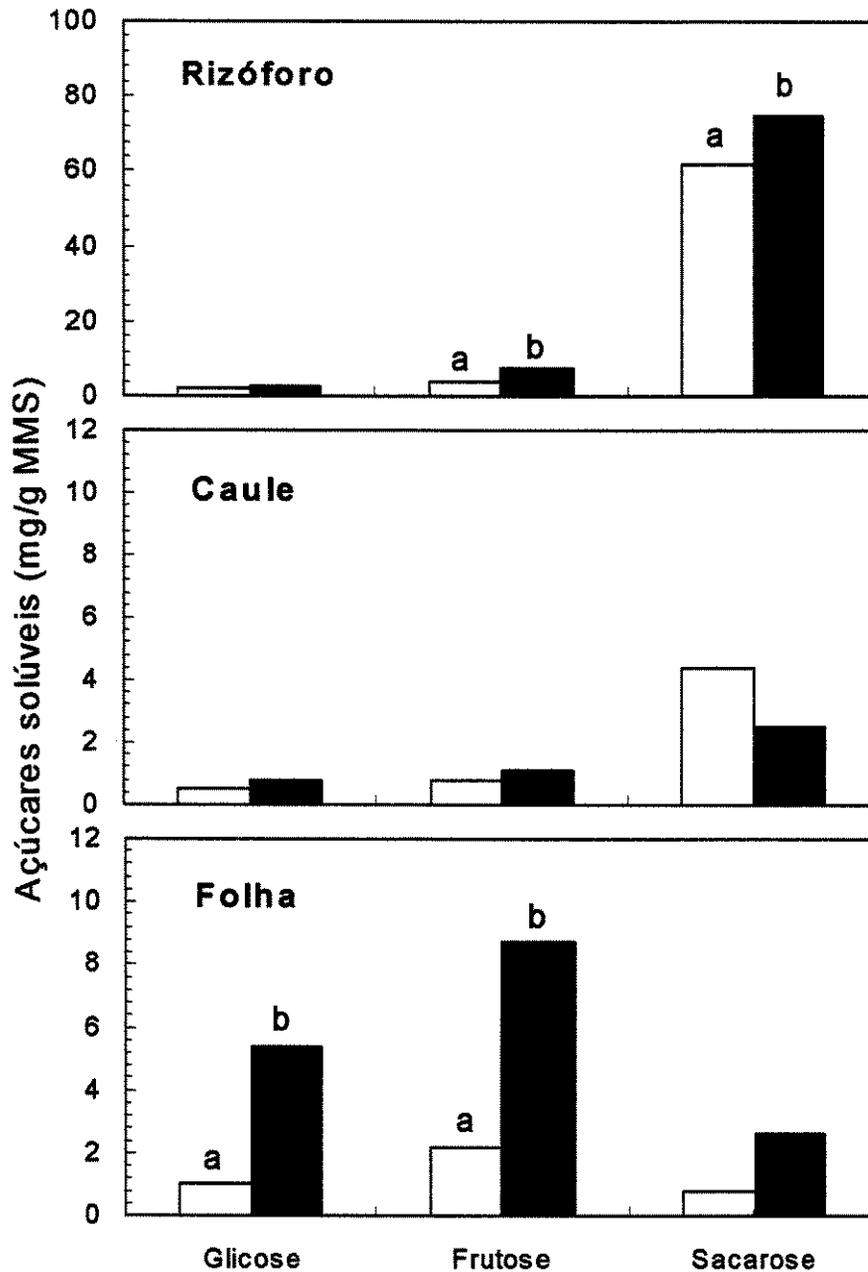


Figura 8. Efeito de nitrato na concentração de glicose, frutose, sacarose e frutose total em rizóforos, caule e folhas de *V. herbacea* aos 360 dias de cultivo. Tratamentos: 1,3 mmol/L (□), 10,7 mmol/L (■) de N-NO_3^- . As letras comparam as médias entre os tratamentos para cada composto ($P = 5\%$).

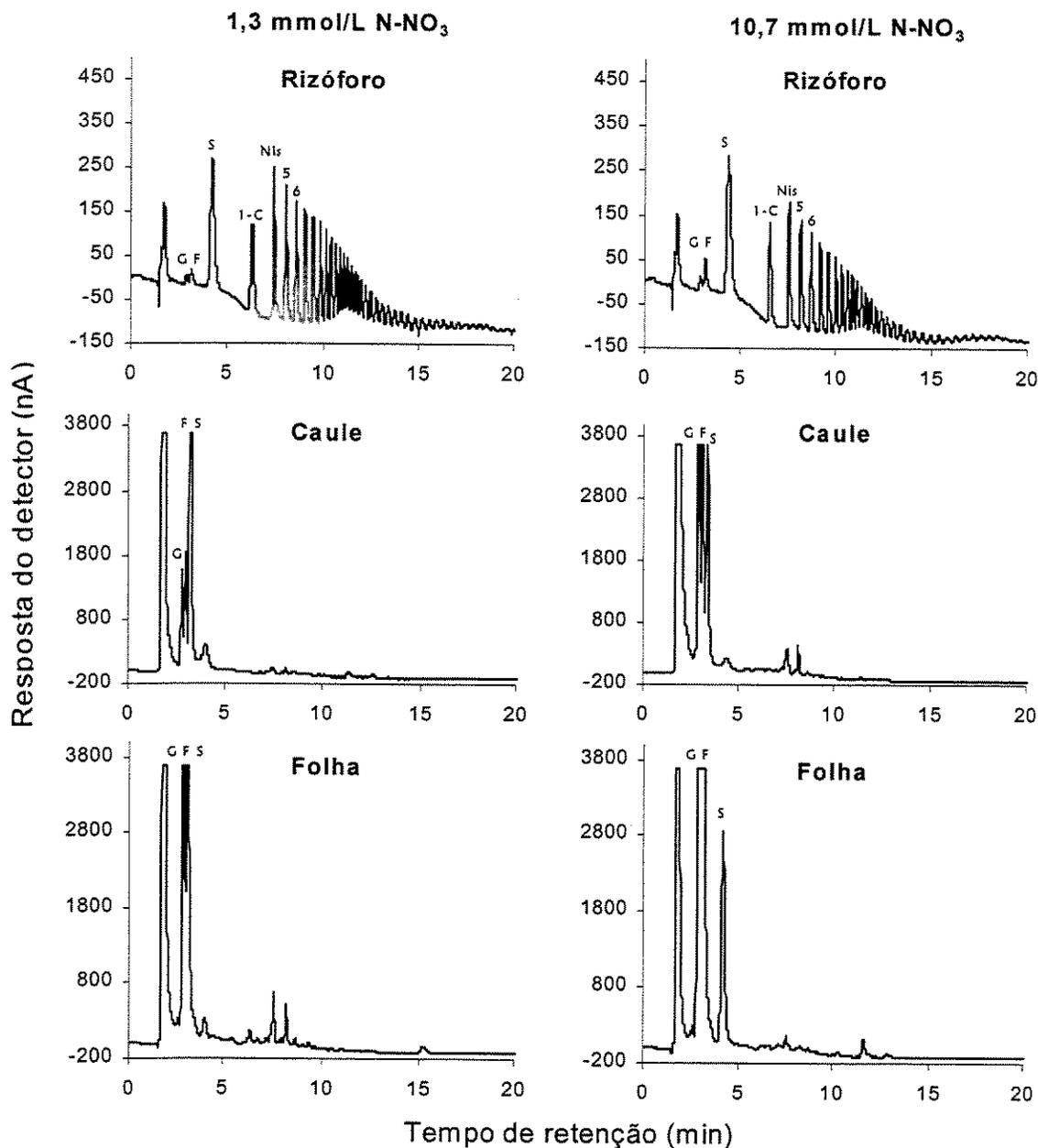


Figura 9. Análise por cromatografia de troca aniônica de alta resolução dos extratos de açúcares totais solúveis de rizóforos, caule e folhas de plantas de *Vernonia herbacea* após 360 dias de cultivo em duas concentrações de nitrato. G = glicose, F = frutose, S = sacarose, 1-C = 1-kestose; Nis = nistose. Os números 5 e 6 referem-se a fruto-oligosacarídeos de grau de polimerização 5-6.

6. CAPÍTULO 3

Artigo 3 - RESPOSTAS DE *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY AO ESTRESSE DE NITROGÊNIO

**RESPOSTAS DE *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY AO ESTRESSE DE
NITROGÊNIO**

GERALDO ROGÉRIO FAUSTINI CUZZUOL¹

MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO²

LILIAN BEATRIZ PENTEADO ZAIDAN²

Título resumido: **Respostas ao estresse de nitrogênio**

1. Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Biológicas, 29060-900 Vitória, ES
2. Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01061-970, SP
3. Autor para correspondência: cuzzuol@npd.ufes.br

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar o comportamento de *V. herbacea* à restrição de nitrogênio. Para tanto, foi avaliado o efeito da maior disponibilidade de nitrogênio (N-NO_3^- 10,7 mmol/L) seguido de sua redução (N-NO_3^- 1,3 mmol/L) no crescimento e no conteúdo de carboidratos e proteínas solúveis de *V. herbacea*. Após doze meses de cultivo em solução N-enriquecido (N-NO_3^- 10,7 mmol/L) composta de $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mmol/L, KNO_3 2,3 mmol/L, KH_2PO_4 0,52 mmol/L, $\text{Mg(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,7 mmol/L e Na_2SO_4 1,3 mmol/L, metade das plantas continuou a receber solução com 10,7 mmol/L de N-NO_3^- (controle; N-enriquecido), e a outra metade passou a ser tratada com N-limitado (1,3 mmol/L de N-NO_3^-) contendo KNO_3 1,3 mmol/L, KH_2PO_4 5,2 mmol/L, KCl 0,9 mmol/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,17 mmol/L e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mmol/L. As análises foram realizadas aos 0, 30, 60, 90 e 180 dias, utilizando-se seis plantas por tratamento. Os resultados mostraram que o estresse de nitrogênio provocou um rápido incremento na biomassa da parte aérea em função da emissão de novos ramos e folhas 30 dias após o início do tratamento. Esse efeito ocorreu simultaneamente à diminuição (33%) das reservas de frutanos dos rizóforos. Na fase de maior acúmulo de frutanos (90 e 180 dias) a concentração desses compostos em plantas sob N-limitado foi maior em relação ao controle, confirmando a existência da relação inversa entre o conteúdo de frutanos e a disponibilidade de nitrogênio. O conteúdo foliar de proteínas totais solúveis diminuiu, gradativamente, à medida que se aproximou a fase de senescência e, de forma mais acentuada, nas plantas sob estresse nutricional. Esses resultados sugerem maior mobilização de nitrogênio orgânico para os rizóforos onde ocorreu, simultaneamente, aumento no conteúdo de proteínas e acúmulo de frutanos. Aos 30 dias, a menor fotossíntese e condutância estomática em plantas sob estresse nutricional foi relacionada ao maior conteúdo

de sacarose e menor de proteínas solúveis sustentando a hipótese de que a fotossíntese é regulada pelo conteúdo dos carboidratos solúveis.

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the behavior of *V. herbacea* in response to nitrogen restriction. The effect of a higher nitrogen availability (10.7 mmol/L N-NO₃⁻) followed by a period of nitrogen restriction (1.3 mmol/L N-NO₃⁻) on plant growth and on soluble carbohydrate and protein contents was analysed. Plants were cultivated during one year, receiving N-enriched (10.7 mmol/L N-NO₃⁻) nutrient solution consisting of Ca(NO₃)₂·4H₂O 2.5 mmol/L, KNO₃ 2.3 mmol/L, KH₂PO₄ 0.52 mmol/L, Mg(NO₃)₂·6H₂O 1.7 mmol/L and Na₂SO₄ 1.3 mmol/L. After this period half of the plants continued to receive the same solution (N-enriched, control plants) while the second half received a N-limited solution (1.3 mmol/L N-NO₃⁻) consisting of KNO₃ 1.3 mmol/L, KH₂PO₄ 5.2 mmol/L, KCl 0.9 mmol/L, CaCl₂·2H₂O 2.17 mmol/L and MgSO₄·7H₂O 1.5 mmol/L. Samplings were made on days 0, 30, 60, 90 and 180, using 6 plants per treatment. N-limited treatment caused a rapid increase in the biomass of the aerial organs due to bud sprouting and growth of new shoots and leaves 30 days after the transfer of plants. At the same time there was a 33% decrease of fructan contents in the rhizophores. Between 90 and 180 days, fructan accumulation occurred more intensively, when compared to plants growing under N-enriched solution. This result substantiates the existence of an inverse relationship between fructan content and nitrogen supply. Total soluble leaf protein decreased slowly close to the senescence phase and this decrease was more intense in plants under nutritional stress. These results suggest the occurrence of mobilization of organic nitrogen towards the rhizophores, reflected by the increase in protein and fructans. Photosynthesis was reduced at day 30 in plants cultivated in both nitrate solutions and this reduction could be related to an increase of leaf carbohydrate concentration. This fact points to the hypothesis that photosynthesis is regulated by soluble carbohydrate content.

INTRODUÇÃO

O estresse em plantas é definido como qualquer condição desfavorável que afeta ou reduz o metabolismo, o crescimento ou o desenvolvimento vegetal, podendo ser induzido por variações naturais ou ações antropogênicas (Lichtenthaler, 1996). A deficiência hídrica e nutricional, elevada salinidade e temperaturas extremas são alguns dos estressores mais abordados em estudos de ecofisiologia vegetal (Lambers *et al.*, 1998).

Depois da disponibilidade da água, o estado nutricional do solo é o fator de maior impacto no metabolismo e desenvolvimento vegetal (Marschner, 1995; Lambers *et al.*, 1998; Larcher, 2000). O déficit nutricional, em especial o do nitrogênio, desencadeia um complexo de respostas que se manifestam na razão parte aérea:parte subterrânea e no metabolismo em folhas e em órgãos de reserva. Diminuição da divisão e expansão celular, produção de folhas e taxa de fotossíntese são outros efeitos mais evidentes em resposta à deficiência de nitrogênio (Chapin, 1980; Chapin *et al.*, 1988). Em algumas espécies das famílias Asteraceae e Poaceae, a restrição do nitrogênio elevou o conteúdo de carboidratos solúveis do tipo frutanos (Farrar, 1993; Améziane *et al.*, 1995, 1997a; Wang & Tilberg, 1996; Van den Ende *et al.*, 1999).

Os trabalhos mais recentes sobre a deficiência nutricional em ecossistema de cerrado salientam os aspectos de baixa disponibilidade de nutrientes no solo e sua relação com a partição de carbono e o escleromorfismo. Paulilo & Felipe (1995) e Sasaki & Felipe (1998) alegaram que a vegetação de cerrado acumula maior teor de carboidratos em detrimento de proteínas devido à baixa disponibilidade de nutrientes no solo. Essa elevada razão C:N em folhas é apontada como causa da esclerofilia de plantas nativas sob deficiência de nutrientes minerais (Chapin, 1980; Chapin *et al.*, 1988), como diagnosticado no bioma cerrado cuja vegetação é predominantemente esclerófila (Felippe & Dale, 1990).

Para compensar o efeito deletério ao estresse, as plantas recorrem a diversos mecanismos os quais operam sob diferentes escalas de tempo dependendo da natureza do estresse e do processo fisiológico afetado (Lambers *et al.*, 1998).

Uma seqüência de fases características ocorre na planta em resposta à ação prolongada de um estímulo estressor. Na fase de alarme, manifestada no início do estresse, ocorre redução generalizada das funções que mantêm as atividades vitais, onde o catabolismo predomina em relação ao anabolismo. Se a intensidade do estímulo externo for contínua, a restituição do processo fisiológico (fase de resistência) será rapidamente iniciada em poucos dias. Esse ajustamento morfológico e fisiológico compensa os danos causados na fase de alarme, e pode permanecer elevado por algum tempo após o distúrbio ter ocorrido (Lichtenthaler, 1996; Lambers *et al.*, 1998; Larcher, 2000). Caso a planta continue exposta ao estresse agudo ou crônico, ocorrerão injúrias irreversíveis (fase de exaustão).

Essas reações frente ao estresse são extensamente documentadas em plantas cultivadas, porém são escassas as informações sobre as estratégias adaptativas de espécies nativas de cerrado em relação à deficiência nutricional (Haridasan *et al.*, 1997).

O solo de cerrado é deficiente em nutrientes cuja disponibilidade tende a diminuir nos meses frios do ano, quando a precipitação e a temperatura diminuem. Em virtude das condições desfavoráveis ao crescimento, a vegetação de cerrado apresenta crescimento reduzido, maior alocação de biomassa para os órgãos subterrâneos (Felippe & Dale, 1990) e baixa capacidade fotossintética (Prado & Moraes, 1997). Além dessas particularidades, algumas espécies acumulam elevados teores de carboidratos não-estruturais do tipo frutanos (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986, 1991; Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Frutanos são oligo- e polissacarídeos solúveis armazenados nos vacúolos quando o produto da fotossíntese excede a demanda da planta (Pollock & Cairns, 1991). Esses polímeros de frutose estariam relacionados à tolerância a deficiência hídrica, baixa

temperatura e deficiência nutricional (Vijn & Smeekens, 1999). O longo período de exposição à limitação do nitrogênio estimula o acúmulo de frutanos (Pollock, 1986). As espécies acumuladoras dessa classe de carboidratos pertencem, especialmente, as famílias Asteraceae e Poaceae, principalmente de regiões temperadas, como anteriormente mencionado.

Vernonia herbacea é uma Asteraceae de cerrado, que acumula frutanos do tipo inulina (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986; Carvalho & Dietrich, 1993) em seus órgãos subterrâneos denominados rizóforos. No inverno, quando as partes aéreas das plantas de *V. herbacea* senescem, o conteúdo de inulina nos rizóforos alcança elevados valores, chegando a representar 80% de sua massa seca (Carvalho & Dietrich, 1993).

Em estudos de ecofisiologia, o efeito do estresse em uma determinada situação, somente pode ser determinado tendo como referência o comportamento da planta em condições ideais de crescimento (Larcher, 2000). A abordagem de um fator específico de estresse e os mecanismos de respostas correspondentes são de importância especial para o estudo da ecofisiologia de espécies herbáceas de cerrado. Resultados anteriores obtidos com *V. herbacea* (Capítulo 2), mostraram que a concentração ideal de nitrogênio para o crescimento dessa espécie é de N-NO_3^- 10,7 mmol/L e a condição sub-ótima, de N-NO_3^- 1,3 mmol/L o que satisfaz o critério de estabelecimento de uma determinada condição ambiental para o estudo de um fator específico de estresse.

Visto que ocorrência de estiagem no outono e inverno em áreas de cerrado é fator limitante na disponibilidade de nutrientes e do crescimento vegetal, o presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de investigar o comportamento de *V. herbacea* em resposta à restrição de nitrogênio. Para tanto, foi avaliado o efeito da maior disponibilidade de nitrogênio seguido de sua subsequente redução nas respostas de crescimento e no metabolismo em plantas dessa espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e condições de crescimento - Plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby foram cultivadas, individualmente, em vasos com areia lavada, em casa de vegetação, onde receberam, semanalmente, 100 ml da solução nutritiva de N-enriquecido (10,7 mmol/L de N-NO_3^-) composta de $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mmol/L, KNO_3 2,3 mmol/L, KH_2PO_4 0,52 mmol/L, $\text{Mg(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,7 mmol/L e Na_2SO_4 1,3 mmol/L suplementada com os sais de micronutrientes da solução de Hoagland & Arnon (1938); o pH foi ajustado para 5,5-6,0 com KOH 1N.

Após doze meses de cultivo, um lote de plantas continuou a receber a mesma solução (controle; N-enriquecido), e outro lote passou a ser tratado com solução contendo 1,3 mmol/L de N-NO_3^- (N-limitado) composta por 1,3 mmol/L de N-NO_3^- contendo KNO_3 1,3 mmol/L, KH_2PO_4 5,2 mmol/L, KCl 0,9 mmol/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,17 mmol/L e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mmol/L. Para evitar a salinização e a dessecação, as plantas foram irrigadas, abundantemente, com água destilada no dia anterior à aplicação da solução. As plantas foram submetidas às condições de luz, temperatura e fotoperíodo natural em casa de vegetação onde a média da temperatura mínima e máxima anual foi de 18°C e 29°C, respectivamente. O experimento foi iniciado em dezembro de 2000 e concluído em junho de 2001. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 6 repetições e 2 tratamentos.

Análise de crescimento - As análises de crescimento foram realizadas aos 0, 30, 60, 90 e 180 dias após a instalação do experimento, utilizando-se seis plantas por tratamento. Os parâmetros de crescimento utilizados foram: altura do maior ramo de cada planta, massa de matéria fresca e seca dos órgãos aéreos e subterrâneos, número de folhas e área foliar unitária e total da planta. A massa seca foi determinada após a secagem do material em estufa a 60°C

até obter massa constante. A área foliar foi calculada através do programa “Area Leaf & Analysis” da Skye Instruments Ltd. (1993).

Extração dos carboidratos solúveis - Amostras de 2 g de rizóforos e 1 g de folha foram submetidas à extração de oligo- e polissacarídeos solúveis, seguindo-se o método descrito por Pollock & Jones (1979) e adaptado por Carvalho *et al.* (1998). Para padronização das amostras, foram utilizados fragmentos de rizóforos da região mediana das ramificações e folha apical completamente expandida (**Capítulo 2**). As amostras foram fervidas por 5 minutos para desnaturação enzimática e o material foi macerado em almofariz, aquecido em banho-maria a 80°C por 15 minutos e centrifugado a 1000 g por 10 minutos. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes como descrito anteriormente e então submetido duas vezes a extração aquosa por 30 minutos a 60°C, homogenizados e filtrados à vácuo, em tecido algodão. Os sobrenadantes da fração etanólica e aquosa foram reunidos, constituindo o extrato de carboidratos totais solúveis, o qual foi concentrado em rotoevaporador, a 40°C. Os extratos concentrados foram armazenados a -20°C para posterior análise quantitativa e qualitativa.

Análise dos carboidratos – A frutose total foi estimada pela reação de antrona, modificada especialmente para cetoses (Jermyn, 1956) usando frutose (Sigma) como padrão. As determinações foram feitas em duplicata e as leituras a 620nm em espectrofotômetro (Coleman). Glicose, frutose livre e sacarose do extrato total de folha e rizóforos foram quantificados por cromatografia líquida de alta resolução (HPAEC/PAD) onde as áreas dos picos foram comparadas com padrões externos.

Após a deionização em resina catiônica (Dowex-50W, Na⁺) e aniônica (Dowex-1, Cl) segundo Carvalho & Dietrich (1993), os carboidratos solúveis neutros foram analisados em coluna de troca aniônica 4x250 mm CarboPac PA-1 usando o cromatógrafo de íons Dionex

DX-300 acoplado a um detector amperométrico pulsado (HPAEC/PAD). O gradiente foi estabelecido de acordo com Shiomi (1993). O eluente A (NaOH 150 mM) e o eluente B (acetato de sódio 500 mM em NaOH 150 mM) foram combinados da seguinte forma: 0-2 min, 25 mM; 2-8 min, 25 a 150 mM; 8-28 min, 150 a 500 mM e 28 -30 min, 25 mM. O fluxo através da coluna foi de 1,0 cm³/min. Os potenciais aplicados ao T1(480 ms), T2 (120 ms) e T3 (60 ms) foram de +0,05, +0,60 e -0,60 V, respectivamente.

Proteínas totais solúveis – Amostras de 1g de matéria fresca de rizóforos da região mediana das ramificações e de folha apical completamente expandida foram maceradas em almofariz, sob baixa temperatura, em NaCl 0,5 M adicionado em solução tampão de acetato de sódio 50 mM e pH 5,0 conforme Silva (2000). Após 30 minutos em repouso, o macerado foi filtrado e centrifugado a 12.000 g por 20 minutos. O conteúdo de proteína do sobrenadante foi analisado pelo método de Bradford (1976) a 592 nm em espectrofotômetro (UV-160A/Schimidzu) usando-se albumina do soro bovino (BSA) como padrão (1µg/µl).

Medidas de fotossíntese - Medidas de fotossíntese líquida, condutância estomática, transpiração e concentração interna de CO₂ foram feitas na primeira folha apical completamente expandida. As medidas foram tomadas no horário das 9:00 às 11:00 quando o aparato fotossintético desta espécie alcança máxima atividade, conforme avaliação preliminar. As análises foram realizadas em sistema fechado, com analisador de gases infravermelho portátil (IRGA), modelo LI-6400 (LI-COR, Inc.) equipado com câmara de luz (LI-6400-02B) fixando a radiação em 500 µmol/m²/s, temperatura da folha em 25°C e concentração de CO₂ natural, em casa de vegetação.

Análise estatística – Os Dados obtidos foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% e 5% no programa Sanest (Zonta *et al.*, 1984).

RESULTADOS

Em ambos os tratamentos de NO_3^- , as plantas cresceram em altura até o final do verão (90 dias), vindo a perder os órgãos aéreos, por senescência, no final do outono (180 dias) (fig. 1). A deficiência de nitrogênio proporcionou maior incremento no número de ramos (fig. 1), número de folhas e área foliar total (fig. 2) 30 dias após o início do tratamento. No entanto, logo após a esse período, as plantas apresentaram decréscimo nas medidas foliares, mantendo valores bem abaixo do controle até o final do verão (março).

Esses resultados refletiram na partição de massa seca da parte aérea (fig. 3), apresentando comportamento análogo às medidas foliares, com rápido incremento de massa seca da parte aérea aos 30 dias, seguido de posterior declínio de sua biomassa. Mais uma vez, os valores de massa seca da parte aérea aos 60 e 90 dias foram menores em relação ao controle.

Quanto aos rizóforos, observou-se uma pequena diminuição na massa seca 30 dias após o início do tratamento de restrição do nitrogênio (fig. 3); em seguida, a massa seca passou a apresentar valores semelhantes ao inicial (6,1 g) até 180 dias. Nessa mesma ocasião, a massa dos rizóforos das plantas em N-enriquecido dobrou em relação à massa inicial. A massa foliar específica (fig. 2) ficou em torno de 90 mg/cm, sem apresentar diferenças significativas entre as duas condições nutricionais. Em função do rápido crescimento vegetativo observado aos 30 dias após a transferência das plantas da condição ótima para sub-ótima de nitrogênio, a TCR média nessas plantas (10 mg/g/d) dobrou em comparação ao controle.

A concentração de frutose total dos rizóforos foi 30% menor em relação ao inicial aos 30 dias em plantas sob N-limitado (fig. 4), aumentando durante o verão atingindo valor máximo aos 180 dias (final do outono) quando chegou a representar 80% da massa seca dos

rizóforos. Nas plantas controle, esse valor foi de cerca de 60%, na mesma época. De maneira geral, a concentração de frutanos no controle não variou até aos 90 dias de cultivo, vindo a apresentar pequeno aumento no mês de junho. Apesar de N-limitado ter promovido aumento da concentração de frutanos aos 180 dias, a produção de frutanos por planta foi sempre maior no N-enriquecido, alcançando a marca de 8 g, enquanto nas plantas transferidas para N-limitado esse valor ficou em torno de 5 g (fig. 4).

As análises de glicose, frutose e sacarose em folhas e em rizóforos das plantas controle e daquelas que foram transferidas para baixa disponibilidade de nitrogênio podem ser verificadas na fig. 5. Em relação às folhas, a concentração dos carboidratos solúveis foi menor que nos rizóforos em todas as fases de crescimento, principalmente nas plantas cultivadas em N-limitado. Os resultados mostraram também, que não houve diferenças significativas no conteúdo das hexoses e da sacarose foliares entre N-limitado e N-enriquecido.

Nos rizóforos, houve aumento na concentração de glicose e principalmente da frutose aos 30 dias, em especial nas plantas transferidas para restrição de nitrogênio, declinando em seguida (fig. 5). Aos 90 e 180 dias, a concentração de glicose volta a aumentar, chegando ao valor máximo de 20 mg/g MMS em plantas sob N-limitado; enquanto a frutose continuou a diminuir até os 180 dias. Quanto à sacarose, verificou-se uma diminuição progressiva, em ambas as concentrações de nitrato, e um pequeno aumento aos 180 dias em plantas sob deficiência de nitrogênio.

As hexoses e a sacarose das folhas aumentaram aos 30 dias, em ambas as condições nutricionais, vindo a decrescer logo em seguida e mantendo valores baixos até a completa senescência da parte aérea, aos 180 dias (fig. 5).

Variações no conteúdo de proteínas ocorreram em função do tratamento (fig. 6). O conteúdo de proteínas totais solúveis declinou nas folhas, em ambas condições nutricionais ainda na fase vegetativa (janeiro), diminuindo, gradativamente, à medida que se aproximava a

fase de senescência, onde a redução no conteúdo de proteínas foi maior. Em comparação ao controle, o declínio das proteínas foliares foi mais acentuado em plantas sob estresse nutricional, sendo estimado um valor de 25% menor em relação ao controle. Com relação aos rizóforos, o conteúdo de proteínas totais diminuiu aos 30 dias, sendo maior no tratamento controle e mantendo-se depois estável até os 90 dias. Aos 180 dias, maior teor de proteínas totais foi observado nas plantas do controle. Apesar dessas diferenças entre as condições nutricionais, o conteúdo de proteínas totais solúveis em folha de *V. herbacea* correspondeu a cerca de 1,75% de sua massa seca e 0,75% da massa seca de rizóforos, mostrando que, independente da disponibilidade de nitrato, o conteúdo de proteína nas folhas é maior do que em rizóforos.

Os resultados da análise de fotossíntese em resposta às concentrações de NO_3^- são apresentados na fig. 7. Variações sazonais podem ser observadas nas diferentes fases de crescimento e épocas do ano. As taxas de fotossíntese, condutância estomática, transpiração e concentração interna de CO_2 declinaram aos 30 dias nos dois tratamentos, apresentando aumento aos 60 dias, e posterior redução aos 90 dias. Diferenças significativas ocorreram aos 60 dias, com maiores taxas de fotossíntese, condutância e transpiração em plantas sob N-enriquecido, e maior concentração interna de CO_2 em N-limitado. Uma correlação positiva entre fotossíntese e condutância ($r^{2*} = 0,657$) e fotossíntese e transpiração ($r^{2*} = 0,843$) foram constatadas.

DISCUSSÃO

Análise de crescimento - O estresse de nitrogênio provocou um rápido incremento na biomassa da parte aérea em função da emissão de novos ramos e folhas (fig.s 1, 2 e 3), 30 dias após o início do tratamento. A antecipação de processos de crescimento que garantem a sobrevivência da planta é comum em certas espécies quando passam por deficiência nutricional (Lambers *et al.*, 1998; Lichtenthaler, 1996; Larcher, 2000). Embora há referências de que o estresse ambiental causado por déficit hídrico e nutricional estimule a floração prematura (Marschner, 1995; Larcher, 2000), isso não ocorreu em *V. herbacea* quando submetidas ao estresse nutricional. Entretanto, vale ressaltar, que nessa espécie a reprodução vegetativa por meio de rizóforos predomina em relação à reprodução sexuada (Carvalho *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1999).

O pequeno aumento de crescimento pela emissão de ramos e novas folhas observado nas plantas transferidas para N-limitado é característico da fase que antecede a floração em *V. herbacea* (Carvalho & Dietrich, 1993). Estes resultados sugerem que o estresse nutricional possa ser considerado um fator promotor da brotação dos rizóforos. O aumento no crescimento da parte aérea 30 dias após a transferência das plantas para N-limitado refletiu também na TCR que foi de 11,8 mg/g/d contra 2,3 mg/g/d em N-enriquecido.

Levando-se em conta as fases definidas por Lichtenthaler (1996), Lambers *et al.* (1998) e Larcher (2000) em plantas sob estresse ambiental, pode-se sugerir que esse ajuste no crescimento caracteriza-se como a fase de resistência, e configura-se como uma estratégia para garantir a sobrevivência e compensar os possíveis danos causados na fase de alarme em decorrência da restrição nutricional. Porém, o sucesso da restituição dos processos fisiológicos em *V. herbacea* foi parcial, uma vez que o ciclo de vida não foi completado antes de serem manifestados os sintomas de deficiência nutricional.

De acordo com Chapin (1980, 1988), em situação de maior fertilidade, espécies nativas de crescimento lento acumulam os nutrientes nos vacúolos, podendo vir a utilizá-los mais tarde quando as condições nutricionais forem limitantes (“luxury consumption”). Nesse caso, deveria ocorrer uma redução na massa foliar específica nas plantas de *V. herbacea* submetidas à deficiência de nitrogênio. Porém, a MFE das plantas sob N-limitado não sofreu alteração quando comparada ao controle. Isto sugere que se os nutrientes tenham participação inexpressiva na massa celular foliar de *V. herbacea*.

O rápido crescimento da parte aérea na fase de resistência (30 dias) em plantas sob déficit nutricional, ocorreu em detrimento das reservas de frutanos dos rizóforos. De fato, ocorreu uma diminuição de 13% na massa desses órgãos e de 33% na concentração de frutanos (fig. 4). É bem conhecido que os carboidratos em órgãos de reserva são requisitados para atender a parte aérea nas fases de maior demanda (Chapin *et al.*, 1990), como ocorre em *V. herbacea* quando os frutanos são mobilizados na fase de rebrota e de floração (Carvalho & Dietrich, 1993). Essa diminuição no conteúdo de frutanos indica a ocorrência de hidrólise desses carboidratos pela enzima frutano exohidrolase (FEH) cuja atividade é estimulada por ocasião da rebrota dos ramos aéreos (Asega & Carvalho, 1999).

As variações sazonais na massa de rizóforos refletiram na produção de frutanos por planta que foi crescente nos dois regimes nutricionais, porém, significativamente maior em N-enriquecido cuja produção final foi cerca de 8 g de frutanos por planta. Trabalhando em condições de campo, Carvalho *et al.* (1998) mostraram que resultado semelhante foi obtido só após 2 anos de cultivo aplicando-se fertilização mineral.

Metabolismo de carboidratos e proteínas solúveis - O aumento expressivo no conteúdo das hexoses, e diminuição da sacarose nos rizóforos, na fase de resistência, em plantas sob deficiência de nitrogênio (fig. 5), pode ser resultante da maior atividade de invertase (Paul &

Stitt, 1993), liberando compostos ricos em energia requeridos na fase de restituição, caracterizada pela emissão de novos ramos e novas folhas e diminuição dos frutanos aos 30 dias em plantas sob N-limitado. A elevação no teor de frutose pode ser devido a maior atividade da FEH (Asega & Carvalho, 1999). Quanto ao aumento da glicose, ela pode ser produto da invertase ou da SST.

A fase de maior acúmulo de frutanos em plantas sob deficiência de nitrogênio começou aos 90 dias, aumentando essa diferença aos 180 dias (fig. 4) quando a concentração de frutanos foi 21% superior em relação ao controle. Esses resultados são consistentes com os obtidos em outros trabalhos, mostrando que há uma relação inversa entre o conteúdo de frutanos e nitrogênio, principalmente na fase de maior acúmulo de frutanos (Améziane *et al.*, 1997a,b; Wang & Tilberg, 1997; McGrath *et al.*, 1997; Van den Ende *et al.*, 1999). Considerando-se que a síntese de frutanos é dependente da ação conjunta das enzimas SST e FFT, Améziane *et al.* (1997a,b) ressaltaram que as atividades dessas enzimas podem aumentar quando os níveis exógenos de nitrogênio são baixos.

Ainda no período de maior síntese de frutanos em *V. herbacea* (90 e 180 dias), ocorreu aumento no conteúdo de glicose, e redução de frutose nos rizóforos em ambas as condições nutricionais, porém, de forma mais expressiva em plantas sob N-limitado. Tais resultados indicam que na fase de maior acúmulo de frutanos, em particular nas plantas sob estresse nutricional, deva ter ocorrido maior atividade da SST, que utiliza a sacarose como substrato liberando glicose (Pollock, 1986).

Como salientado acima, o metabolismo de frutanos está intimamente relacionado à concentração de sacarose uma vez que esse composto é substrato para a síntese de frutanos (Pollock, 1986), além de induzir a síntese ou ativação de SST (Wagner & Wiemken, 1986). Portanto, quando a sacarose excede a demanda, a maior concentração de sacarose pode elevar a capacidade de síntese de frutanos em órgãos de reserva (Pollock & Cairns, 1991; Améziane

et al., 1997a). Essas reações parecem ter sido mais intensas aos 180 dias em plantas de *V. herbacea* cultivadas sob N-limitado, onde a maior concentração de sacarose nos rizóforos (fig. 5) parece ter estimulado a síntese de frutanos (fig. 4).

Nas plantas tratadas com N-enriquecido, a concentração de sacarose nos rizóforos foi sempre menor e decresceu gradativamente até os 180 dias. Essa diferença pode ser devida ao maior consumo de fotossintatos para redução e assimilação do nitrato em condições de maior fertilidade (Améziane *et al.*, 1995, 1997a, 1997b). A utilização de carbono para assimilação e redução de nitrato é grande, sendo estimada em aproximadamente 15% da energia disponível quando essas reações ocorrem na raiz (Lambers *et al.*, 1998).

Embora a exportação de fotossintatos possa ser controlada pela própria concentração de sacarose da folha (Chapin *et al.*, 1988), o fluxo da sacarose pode variar independente da força da fonte (Améziane *et al.*, 1995) como sugerem os resultados obtidos em *V. herbacea*. Mesmo não havendo diferenças na concentração de sacarose foliar nessa espécie entre as condições nutricionais experimentadas, o teor de sacarose em rizóforos foi maior em N-limitado, indicando que a atividade do dreno é fator determinante na importação de carbono, independente da concentração de sacarose foliar (Ho, 1988; Marcelis, 1996).

O decréscimo na concentração dos carboidratos solúveis em folhas após 30 dias da instalação do experimento indica maior fluxo dos compostos ricos em carbono para os rizóforos onde ocorre a síntese e armazenamento de frutanos. Resultados similares foram obtidos por Améziane *et al.*, (1995) ao reportarem aumento na proporção de ^{14}C translocado das folhas para as raízes tuberosas de *Cichorium intybus*, simultaneamente ao aumento na capacidade de síntese de frutanos. Portanto, condições nas quais o crescimento da parte aérea é afetado, mais carbono está disponível para armazenamento em órgãos de reserva, principalmente, nas fases mais adiantadas de senescência dos órgãos aéreos e de acúmulo de frutanos (Améziane *et al.*, 1997a,b).

Além das alterações no crescimento e no metabolismo de carboidratos não-estruturais, o estresse nutricional também interferiu no metabolismo de proteínas (fig. 6). O período de maior decréscimo no conteúdo de proteínas totais solúveis em folhas de *V. herbacea* (90 – 180 dias) coincidiu com o período de incremento de proteínas e de frutanos nos órgãos de reserva. Esses resultados sugerem que o acréscimo de proteínas nos rizóforos na fase de maior acúmulo de frutanos, pode ter ocorrido em função da remobilização das proteínas foliares em direção aos órgãos de armazenamento, principalmente na fase de senescência, como verificaram Améziane *et al.* (1997b) em plantas de *C. intybus*. Segundo Limami *et al.* (1996) e Améziane *et al.* (1997c), na fase de senescência, ocorre a degradação de proteínas e, conseqüentemente, um acúmulo de aminoácidos solúveis, os quais são desviadas para locais de maior atividade celular, como os órgãos de acúmulo de frutanos. Os resultados permitem ainda inferir que, a deficiência de nitrogênio seja promotora na mobilização de compostos nitrogenados das folhas para os órgãos de reserva (Guitman *et al.*, 1991; Limami *et al.*, 1996; Améziane *et al.*, 1997c; Louahlia *et al.*, 1999). Desse modo, a relação entre os órgãos reflete a habilidade de compensar o crescimento limitado pelo baixo suprimento de nitrogênio por ciclagem do mesmo para os órgãos de maior atividade (Marschner *et al.*, 1996; Vouillot & Devienne-Barret, 1999).

A possibilidade da maior mobilização dos compostos nitrogenados da parte aérea para os rizóforos, no outono, coincide com a fase de maior acúmulo de frutanos (fig. 4). Assim, os compostos nitrogenados da parte aérea seriam utilizados, preferencialmente, para a síntese das enzimas relacionadas ao metabolismo de frutanos (Améziane *et al.*, 1997a,b) e para o crescimento dos rizóforos de *V. herbacea*. Portanto, a capacidade de *V. herbacea* em ajustar o nitrogênio estocado na forma de proteína, dependendo da disponibilidade de nitrato, revela uma estratégia eficiente no uso do nitrogênio durante o período de maior acúmulo de frutanos. Alguns estudos sugerem que para plantas bianuais, as proteínas de reserva são

qualitativamente mais importantes do que os carboidratos de reserva, vindo a desempenhar papel chave no processo de rebrotamento (Fouldrin & Limami, 1993; Améziane *et al.*, 1997c; Limami *et al.*, 1996).

Atividade Fotossintética – Mais de 75% do nitrogênio foliar está localizado nos cloroplastos (Evans, 1989a), compondo a enzima Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco, EC 4.1.1.39), os pigmentos fotossintetizantes e os compostos da cadeia transportadora de elétrons (Warren *et al.*, 2000; Broadley *et al.*, 2001). Isso pode explicar a menor eficiência fotossintética verificada em plantas de *V. herbacea* cultivadas sob baixa concentração de nitrogênio, principalmente aos 60 dias (fig. 7).

Todavia, embora a relação entre a capacidade fotossintética e o conteúdo de nitrogênio foliar seja amplamente documentada (Evans, 1989a,b; Anten *et al.*, 1996; Alt *et al.*, 2000), não se observou uma correlação entre as medidas fotossintéticas e o conteúdo de proteínas foliares em *V. herbacea* ($r^2 = 0,005$). Warren *et al.* (2000) também não encontraram correlação similar em arbóreas nativas da Austrália. Evidentemente, fatores como a resistência estomática limitam a atividade fotossintética. Diversos autores (Chapin *et al.*, 1988; Broadley *et al.*, 2000, 2001) argumentaram que a restrição de nitrogênio deprime a fotossíntese mais pelo seu efeito direto na resistência estomática do que na cinética das enzimas relacionadas à fixação do carbono. Essa hipótese parece verdadeira para *V. herbacea* devido à maior concentração interna de CO₂ constatada em N-limitado (fig. 7), indicativa da menor atividade de carboxilação (Larcher, 2000; Broadley *et al.*, 2001).

Uma hipótese sobre o mecanismo de ação do nitrogênio na fotossíntese foi apresentada por Chapin *et al.* (1988). De acordo com o modelo idealizado por esses autores, a restrição do nitrogênio eleva o conteúdo de ácido abscísico (ABA), causando o fechamento dos estômatos e conseqüentemente, a redução da fotossíntese. Além do seu efeito no movimento estomático,

o ABA também promove a hidrólise de proteínas (Chapin *et al.*, 1998), desempenhando importante papel na mobilização de nitrogênio orgânico. Desse modo, a menor taxa de fotossíntese observada em plantas de *V. herbacea* sob estresse de nitrogênio poderia ser resultado da menor condutância estomática e conteúdo de proteínas, refletindo na menor atividade da Rubisco e no transporte de elétrons (Evans, 1983).

Considerando que as medidas de fotossíntese foram feitas nas mesmas folhas das quais em seguida foram extraídas os açúcares solúveis, a redução da fotossíntese aos 30 dias em plantas cultivadas nas duas concentrações de nitrato, parece estar relacionada ao aumento na concentração desses carboidratos foliares (fig. 5). Nestas, o conteúdo da sacarose aumentou em torno de 314% aos 30 dias, sustentando a hipótese de que a fotossíntese é regulada pelo conteúdo dos carboidratos solúveis (Farrar *et al.*, 2000). A sacarose, além de representar a maior forma de carbono transportada na planta, atua também, como importante sinalizador molecular, ativando ou reprimindo genes específicos (Koch, 1996; Farrar *et al.*, 2000; Hellmann *et al.*, 2000), como aqueles relacionados à fotossíntese os quais são inibidos quando os níveis de carboidratos solúveis são elevados (Koch, 1996).

Agradecimentos – A FAPESP, pelo apoio financeiro (Biotasp proc. 98/05124-8), ao CNPq, pelas bolsas de Produtividade em Pesquisa de M.A.M Carvalho e L.B.P. Zaidan e à CAPES (PICDT proc. 23068.000024/99-20), pela concessão de bolsa de doutorado à G.R.F. Cuzzuol. À A.M. Baroni, pelo apoio técnico nas medidas de fotossíntese.

LITERATURA CITADA

- Alt, C., Stutzel, H., Kage, H. 2000. Optimal nitrogen content and photosynthesis in cauliflower (*Brassica oleracea* L. *botrytis*). Scaling up from a leaf to the whole plant. *Annals of Botany* 85: 779-787.
- Anten, N.P.R., Hernandez, R., Medina, E.M. 1996. The photosynthetic capacity and leaf nitrogen concentration as related to light regime in shade leaves of a montane tropical forest tree, *Tetrorchidium rubrivenium*. *Functional Ecology* 10:491-500.
- Améziane, R., Limami, M.A., Noctor, G. & Morot-Gaudry, J.-F. 1995. Effect of nitrate concentration during growth on carbon partitioning and sink strength in chicory. *Journal of Experimental Botany* 46:1423-1428.
- Améziane, R., Deléens, Noctor, G., Morot-Gaudry, J.F. & Limami, M.A. 1997a. Stage of development is an important determinant in the effect of nitrate on photoassimilate (^{13}C) partitioning in chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of Experimental Botany* 48(306):25-33.
- Améziane, R., Richard-Molard, C., Deléens, E, Morot-Gaudry, J-F. & Limami, A.M. 1997b. Nitrate ($^{15}\text{NO}_3$) limitation affects nitrogen partitioning between metabolic and storage sinks and nitrogen reserve accumulation in chicory (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 202:303-312.
- Améziane, R., Richard-Molard, C., Deléens, E., Morot-Gaudry, J-F. & Limami, A.M. 1997c. Nitrate ($^{15}\text{NO}_3$) limitation affects nitrogen partitioning between metabolic and storage sinks and nitrogen reserve accumulation in chicory (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 202:303-312.
- Asega, A.F. & Carvalho, M.A.M. 1999. Sprouting and fructan exohydrolase activity in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. IN: XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Celular (SBBq), Caxambú, Brasil.
- 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.
- Broadley, M.R., Escobar-Gutiérrez, A.J., Burns, A., Burns, I.G. 2000. What are the effects of nitrogen deficiency on growth components of lettuce? *New Phytologist* 147:519-526.

- Broadley, M.R., Escobar-Gutiérrez, A.J., Burns, A., Burns, I.G. 2001. Nitrogen-limited growth of lettuce is associated with lower stomatal conductance. *New Phytologist* 152:97-106.
- Carvalho; M.A.M & Dietrich, S.M.C. 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123:735-740.
- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C. 1997. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from thizophores. *New Phytologist* 136:153:161.
- Carvalho, M.A.M., Pinto, M.M.& Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21:275-280.
- Chapin, F.S. III. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology Systemics* 11:233-260.
- Chapin, F.S. III. 1988. Ecological aspects of plant mineral nutrition. IN: *Advances in Planta Nutrition* (B. Tinker & A. Läuchli, eds), Vol.3, Praeger, New York, pp. 161-191.
- Chapin, F.S.III, Walter, C.H.S. & Clarkson, D.T. 1988. Growth response of barley and tomato to nitrogen stress and its control by abscisic acid, water relations and photosynthesis. *Planta* 173:352-366.
- Chapin, F.S.III, Schulze, E.D. & Mooney, H.A. 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21:423-447.
- Edelman, J. & Jefford, T.G. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus* L. *New Phytologist* 67:517-531.
- Evans, J.R. 1983. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* 72:297-302.
- Evans, J.R. 1989a. Partitioning of nitrogen between and within leaves grown under different irradiances. *Australian Journal of Plant Physiology* 16:533-548.
- Evans, J.R. 1989b. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78:9-19.
- Farrar, J.F. 1993. Sink strength: what is it and how do we measure it? A summary. *Plant Cell and Environment* 16:1047-1057.
- Farrar, J., Pollock, C., Gallagher, J. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154:1-11.

- Felippe, G.M. & Dale, J.E. 1990. The effects of phosphate supply on growth of plants from the Brazilian Cerrado: experiments with seedlings of the annual weed, *Bidens gardneri* Baker (Compositae) and the tree, *Qualea grandiflora* (Mart.) (Vochysiaceae). *Oecologia* 82:81-86.
- 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. *Revista Brasileira de Botânica* 9:159-166.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Isejima, E.M., Dias-Tagliacozzo, G.M., Carvalho, M.A.M., Dietrich, S.M.C. 1991. The physiological significance of fructan accumulation in Asteraceae from the cerrado. *Ciência e Cultura* 43:443-446.
- Fouldrin, K. & Limami, M.A. 1993. The influence of nitrogen ($^{15}\text{NO}_3^-$) supply to chicory plants during forcing on the uptake and remobilization of N reserves for chicon growth. *Journal of Experimental Botany* 44:1313-1319.
- Guitman, M.R., Arnozis, P.A., Barneix, A.J. 1991. Effect of source-sink relations and nitrogen nutrition on senescence and N remobilization in the flag leaf of wheat. *Physiologia Plantarum* 82:278-284.
- Haridasan, M., Pinheiro, A.A.M.C. & Torres, F.R.R. 1997. Resposta de algumas espécies do estrato rasteiro de um cerrado à calagem e à adubação. IN: *Contribuição ao Conhecimento Ecológico do Cerrado* (Leite, L.L. & Saito, C.H. eds), Brasília, pp. 87-91.
- Hellmann, H., Baker, L., Funck, D. Frommer, W.B. 2000. The regulation of assimilate allocation and transport. *Australian Journal of Plant Physiology*. 27:583-594.
- Ho, L.C. 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 39:355-378.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. 1938. *The water-Culture Method for Growing Plants Without Soil*. California Agricultural Experimental Station. Circ. No. 347.
- Jermyn, M.A. 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature* 177:38-39.
- Koch, K.E. 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47:509-540.
- Lambers, J., Chapin, F.S. & Pons, T.L. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, New York, 540p.
- Larcher, W. 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. RiMa, São Carlos, 529p.

- Lichtenthaler, H.K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plantas. *Journal of Plant Physiology* 148:4-14.
- Limami, M.A., Dufossé, C., Richard-Moulard, C., Fouldrin, K., Roux, L. & Morot-Gaudry, J-P. 1996. Effect of exogenous nitrogen ($^{15}\text{NO}_3$) on utilization of vegetative storage protein (VSP) during regrowth in chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of Plant Physiology* 149:564-572.
- Louahlia, S., Macduff, J.H., Ourry, A., Humphreys, M. & Boucaud, J. 1999. Nitrogen reserve status affects the dynamics of nitrogen remobilization and mineral nitrogen uptake during recovery of contrasting cultivars of *Lolium perenne* from defoliation. *New Phytologist* 142:451-462.
- Marcelis, L.F.M. 1996. Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. *Journal of Experimental Botany* 47:1281-1291.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd. Edition, Academic Press, Orlando, 649p.
- Marschner, H., Kirkby, E.A. & Cakmak, I. 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany* 47:1255-1263.
- Marschner, H., Kirkby, E.A. & Cakmak, I. 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *Journal of Experimental Botany* 47:1255-1263.
- McGrath, V.B., Blakeney, A.B. & Batten, G.D. 1997. Fructan to nitrogen ratio as an indicator of nutrient stress in wheat crops. *New Phytologist* 136:145-152.
- Paul, M.J. & Stitt, M. 1993. Effects of nitrogen and phosphorus deficiencies on levels of carbohydrates, respiratory enzymes and metabolites in seedlings of tobacco and their response to exogenous sucrose. *Plant, Cell and Environment* 16:1047-1057.
- Paulilo, M.T.S. & Felipe, G.M. 1995. Respostas de plântulas de *Qualea grandiflora*, uma espécie arbórea de cerrado, à adição de nutrientes minerais. *Revista Brasileira de Botânica* 18:109-112.
- Pollock, C.J. 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist* 104:1-24.
- Pollock, C.J. & Cairns, A.J. 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology*. 42:77-101.

- Pollock, C.J. & Jones, T. 1979. Seasonal patterns of fructan and metabolism in forage grasses. *New Phytologist* 83:8-15.
- Prado, C.H.B.A. & Moraes, J.A.P.V. 1997. Photosynthetic capacity on mass and area basis and leaf specific weight in some woody species of Cerrado vegetation under field conditions. *Photosynthetica* 33:103-112.
- Rufty, T.W., Raper, C.D. & Huber, S.T. 1984. Alterations in internal partitioning of carbon in soybean plants in response to nitrogen stress. *Canadian Journal of Botany* 62:503-507.
- Sasaki, R.M. & Felipe, G.M. 1998. Response of *Dalbergia miscolobium* Benth. seedlings, a cerrado tree species, to mineral nutrient supply. *Revista brasileira de Botânica* 21:65-72.
- Sasaki, R.M., Rondon, J.N., Zaidan, L.B.P. & Felipe, G.M. 1999. Germination of seeds from herbaceous plants artificially stored in cerrado soil. *Revista Brasileira de Biologia* 59:271-279.
- Shiomi, 1993. Structure of fructopolysaccharide (Asparagosin) from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *New Phytologist* 123:263-270.
- Silva, A.M. 2000. Detecção de proteínas que se ligam à cadeia de E(1-4) glucanos em cotilédones de chagas (*Tropeolum majus*) durante o período de mobilização de xiloglucanos de reserva. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Mestrado.
- Tertuliano, M.F. & Figueiredo-Ribeiro, C.L. 1993. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. *New Phytologist* 123:741-749.
- Van den Ende, W., Roover, J.De & Van Laere, A. 1999. Effect of nitrogen concentration of fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 105:2-8.
- Vijn, I. & Smeekens, S. 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120:351-359.
- Vouillot, M.O. & Devienne-Barret, F. 1999. Accumulation and remobilization of nitrogen in a vegetative winter wheat crop during or following nitrogen deficiency. *Annals of Botany* 83: 569-575.
- Wagner, W. & Wiemken, A. 1986. Properties and subcellular localization of fructan hydrolase in the leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel). *Journal of Plant Physiology* 121:429-439.

- Wang, C. & Tilberg, J.-E. 1996. Effects of nitrogen deficiency on accumulation of fructan and fructan metabolizing enzyme activities in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* 97:339-345.
- Warren, C.R., Adams, M.A. & Chen, Z. 2000. In photosynthesis related to concentrations of nitrogen and rubisco in leaves of Australian native plants? *Australian Journal of Plant Physiology* 27:407-416.
- Zonta, E.P., Machado, A. A. & Silveira Júnior, P. 1984. Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (SANEST). UFPel, Pelotas.

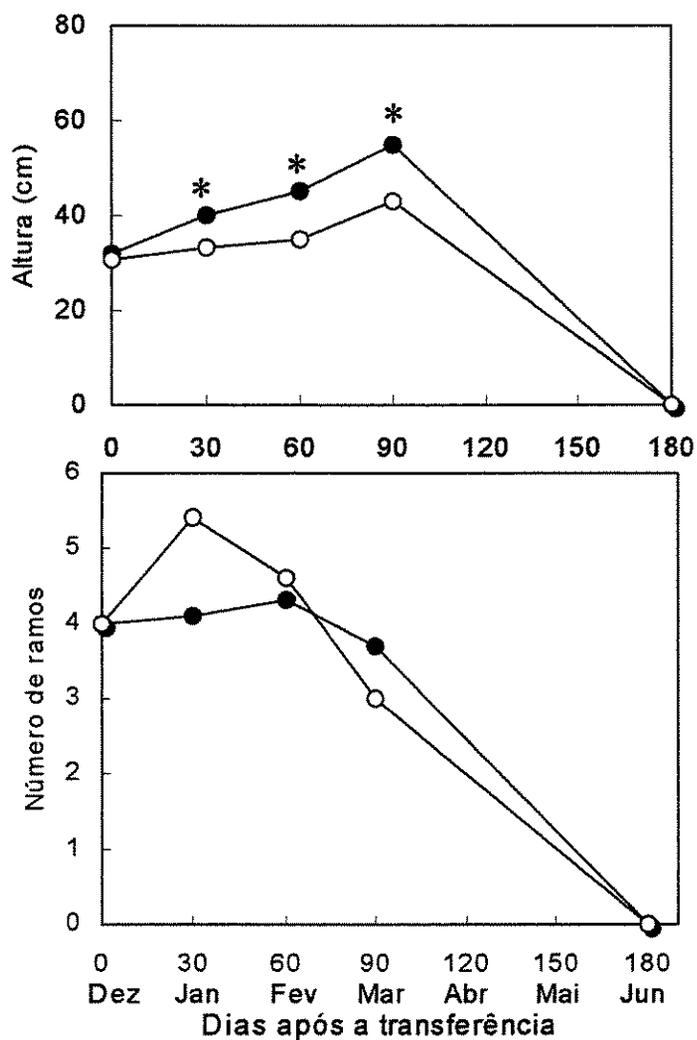


Figura 1. Efeito de nitrato na altura e número de ramos em plantas de *V. herbacea*. Tratamentos: 10,7 mmol/L (●), 10,7→1,3 mmol/L (○) de N-NO_3^- . Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5% ($n = 6$).

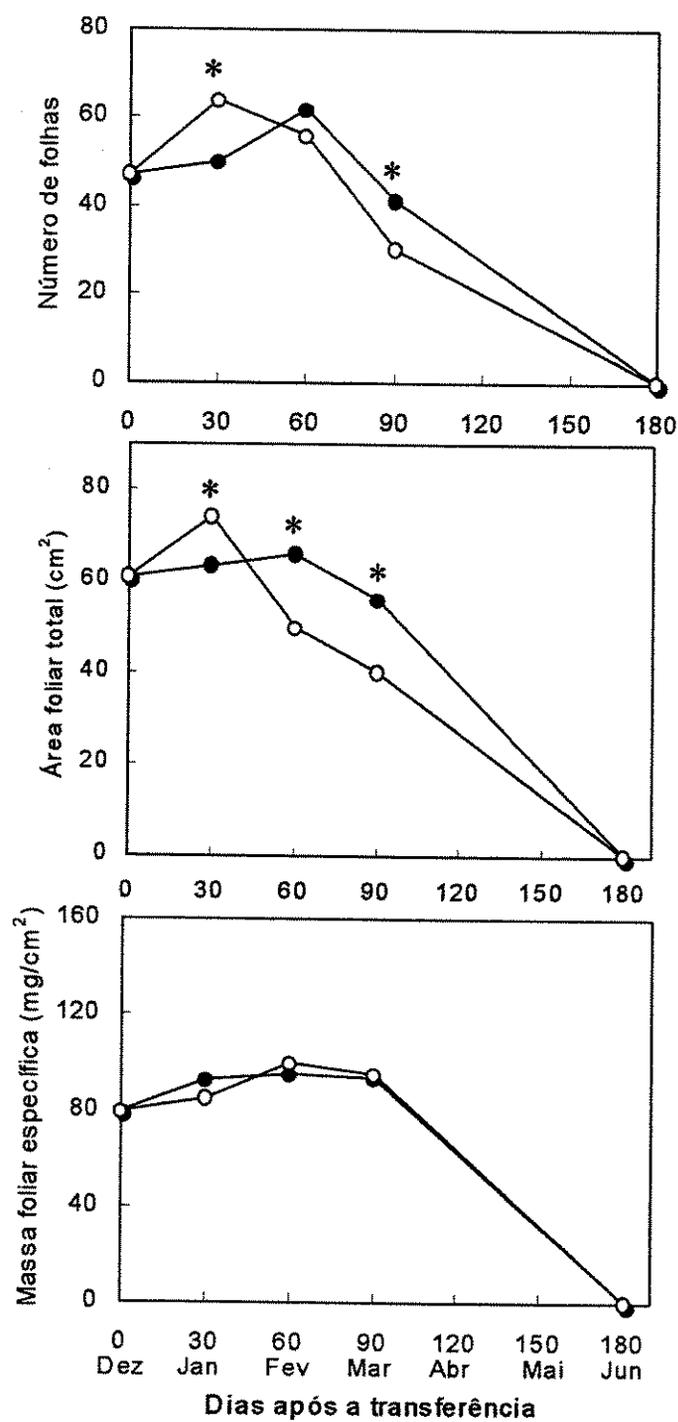


Figura 2. Efeito de nitrato nas medidas foliares em plantas de *V. herbacea*. Tratamentos: 10,7 mmol/L (●), 10,7→1,3 mmol/L (○) de $N-NO_3^-$. Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5% (n = 6).

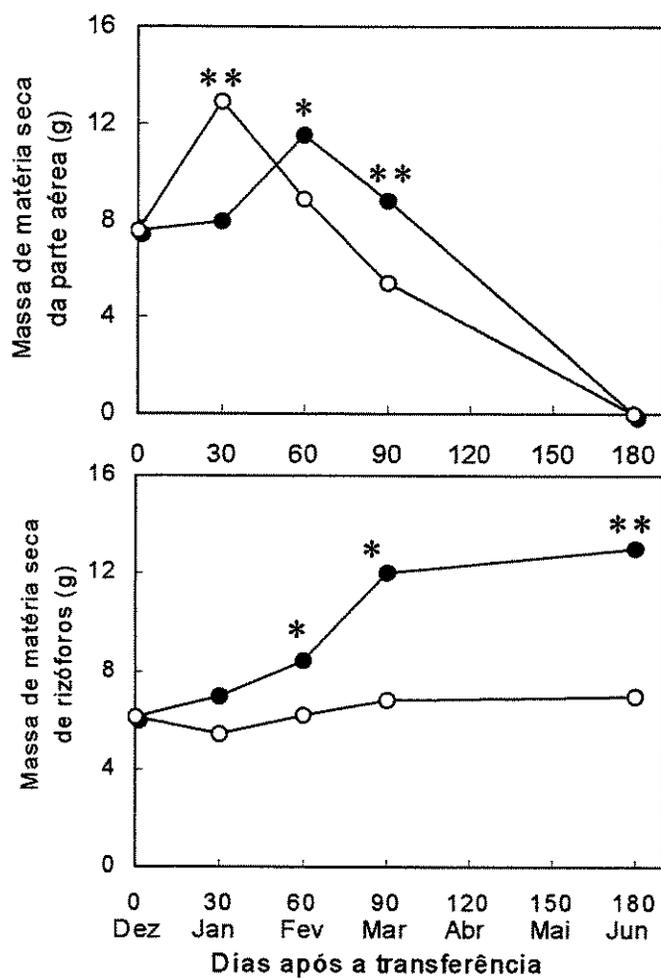


Figura 3. Efeito de nitrato na partição de biomassa seca entre parte aérea e rizóforos em plantas de *V. herbacea*. Tratamentos: 10,7 mmol/L (●), 10,7→1,3 mmol/L (○) de N-NO_3^- . Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5%, **P = 1% (n = 6).

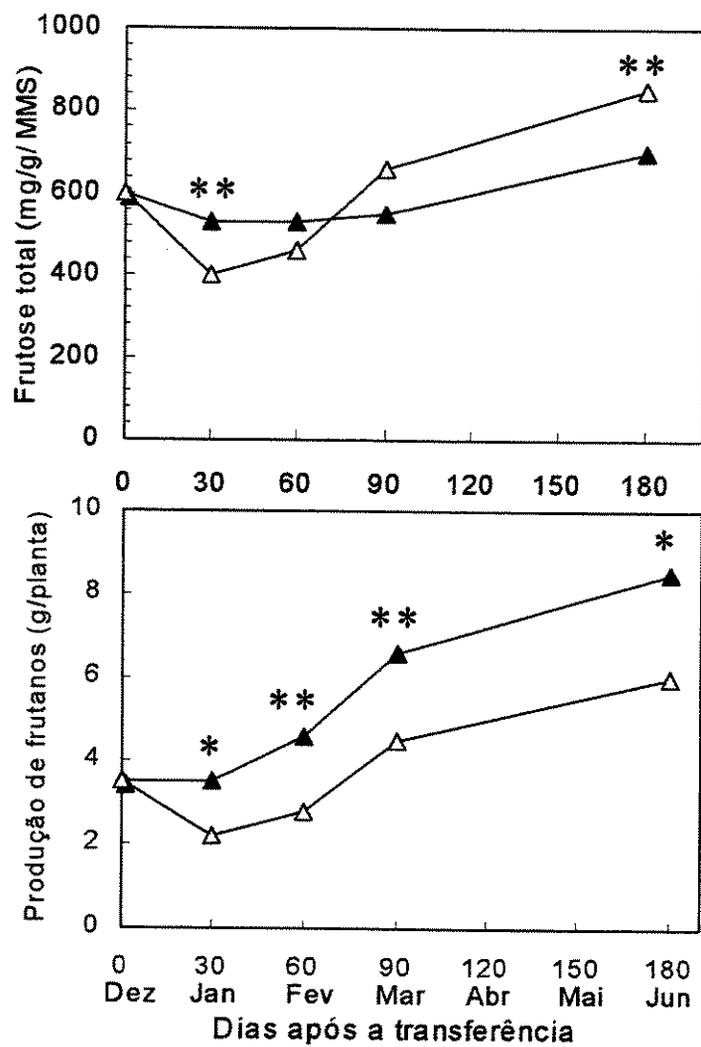


Figura 4. Efeito de nitrato na concentração e na produção de frutanos em plantas de *V. herbacea*. Tratamentos: 10,7 mmol/L (▲), 10,7→1,3 mmol/L (Δ) de N-NO₃⁻. Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5%, **P = 1% (n = 6).

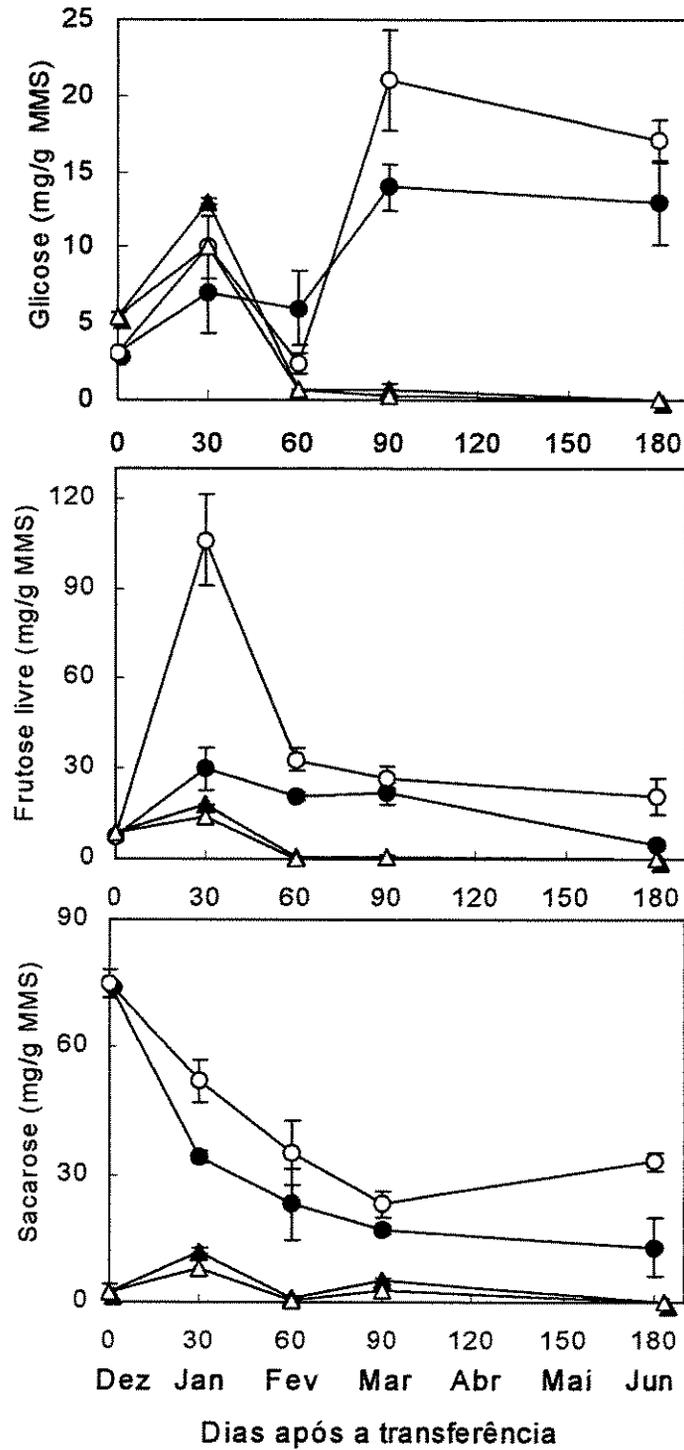


Figura 5. Efeito de nitrato no conteúdo de glicose, frutose livre e sacarose em rizóforos e folhas de *V. herbacea*. Tratamentos: 10,7 mmol/L (símbolos fechados), 10,7→1,3 mmol/L (símbolos abertos) de N-NO_3^- em rizóforos (● ○) e em folhas (▲ △). As barras verticais representam erro padrão ($n=3$).

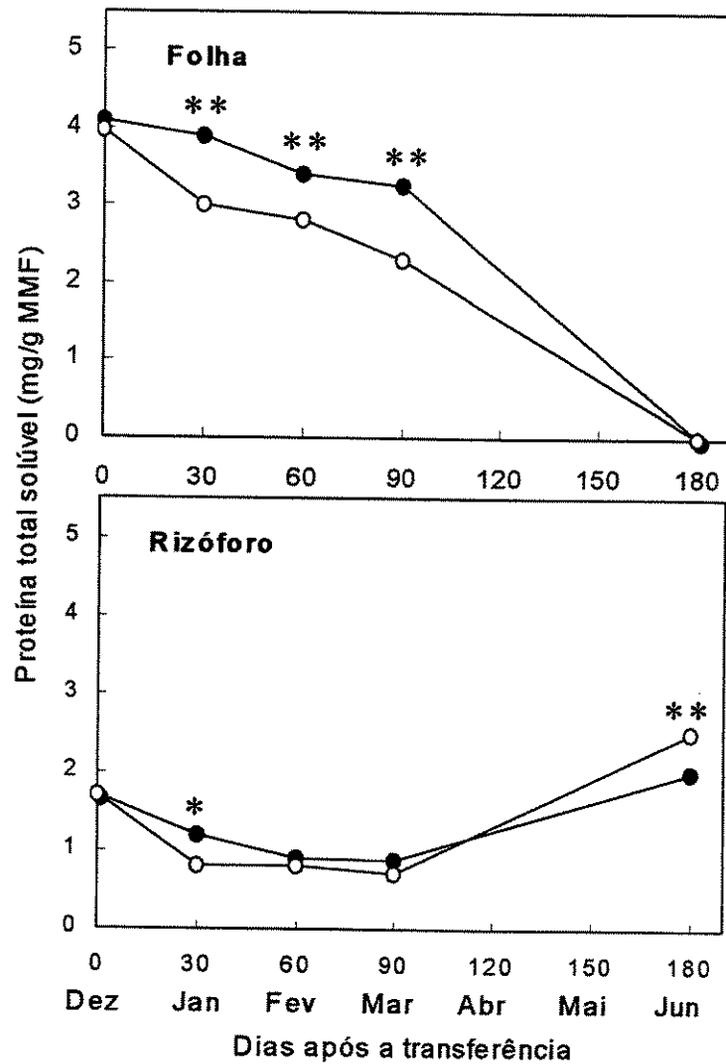


Figura 6. Efeito de nitrato no teor de proteína total solúvel em folha e rizóforos em plantas de *V. herbacea*. Tratamentos: 10,7 mmol/L (●), 10,7→1,3 mmol/L (○) de $N-NO_3^-$. Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5%, **P = 1% (n=3).

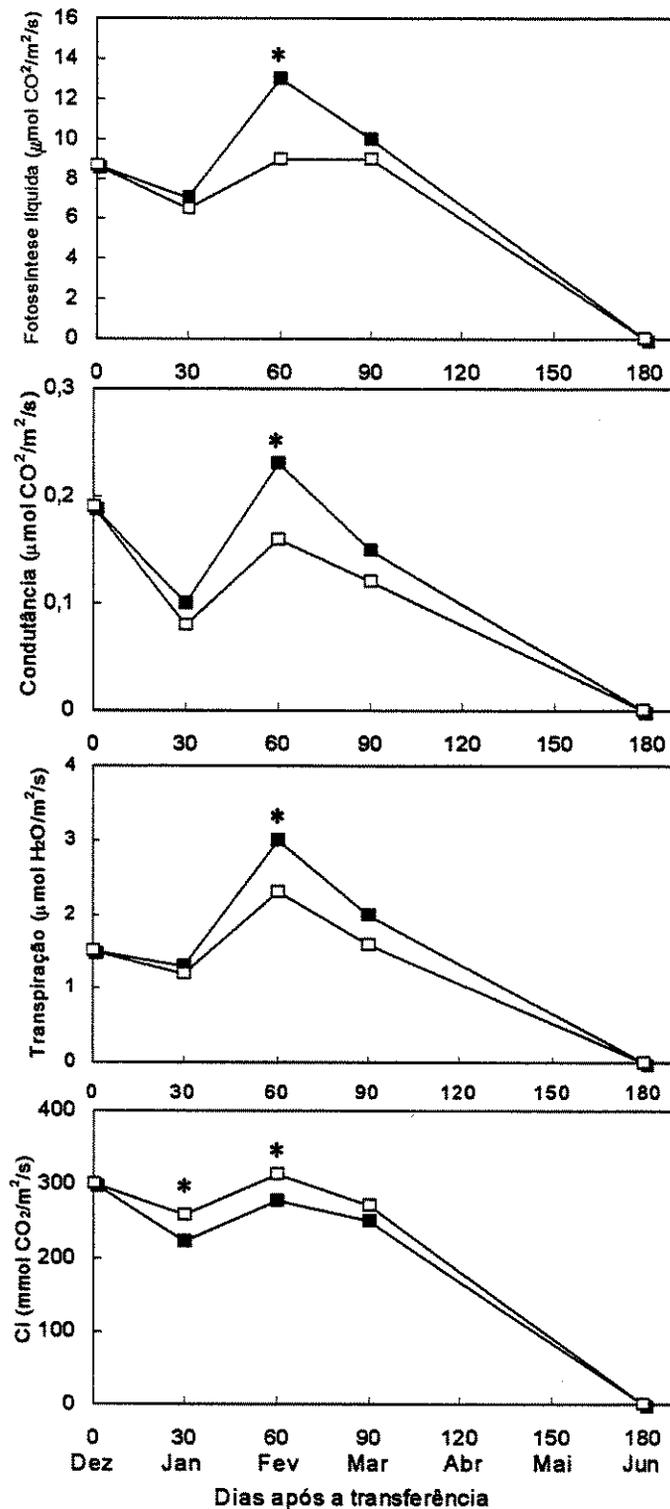


Figura 7. Efeito de nitrato na fotossíntese, condutância, transpiração e concentração interna de CO₂ em plantas de *V. herbacea*. Tratamentos: 10,7 mmol/L (■), 10,7→1,3 mmol/L (□) de N-NO₃⁻. Diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de *P = 5% (n=6).

7. CAPÍTULO 4

**Artigo 4 - CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE FRUTANOS EM PLANTAS DE
Vernonia herbacea (VELL.) RUSBY SUBMETIDAS À ADUBAÇÃO NITROGENADA**

Aceito para publicação na Revista Brasileira de Botânica

CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE FRUTANOS EM PLANTAS DE *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY SUBMETIDAS À ADUBAÇÃO NITROGENADA

GERALDO ROGÉRIO FAUSTINI CUZZUOL¹

MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO²

CLAUDIO JOSÉ BARBEDO²

LILIAN BEATRIZ PENTEADO ZAIDAN²

Título resumido: **Adubação nitrogenada em *Vernonia herbacea***

1. Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Biologia, 29060-900 Vitória, ES, Brasil

2. Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01061-970, São Paulo, SP, Brasil

1. Autor para correspondência: cuzzuol@npd.ufes.br

RESUMO

Vernonia herbacea acumula altas concentrações de frutanos do tipo inulina, em seus órgãos subterrâneos de reserva, denominados rizóforos. Foi estudada a influência da adubação nitrogenada no crescimento dessa espécie e na produção de frutanos. Plantas obtidas a partir de fragmentos de rizóforos foram cultivadas em área de cerrado onde receberam três doses de nitrogênio: 6, 12 e 24 kg N/ha na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Plantas jovens, com seis meses de idade mostraram aumento em altura, área foliar e massa seca da parte aérea e dos rizóforos em resposta ao aumento da dose de nitrogênio. Por outro lado, o teor de frutanos decresceu com o aumento da concentração do nitrogênio. Após doze meses de cultivo, o crescimento das plantas foi estimulado apenas nas doses entre 6 e 12kg/ha de nitrogênio. Os resultados mostraram, também, que o teor de frutanos em plantas jovens está correlacionado negativamente tanto ao crescimento quanto às concentrações crescentes de nitrogênio. Já as plantas tratadas com 24 kg N/ha chegaram a acumular 6,0 g de frutanos por planta, enquanto nas plantas controle, que não receberam N suplementar, esse valor foi de 3,5 g. Assim, aplicação de 24 kg N/ha é recomendada para uma colheita antecipada (12 meses), visando à produção de frutanos.

ABSTRACT

Plants of *V. herbacea* accumulate high amounts of fructans of the inulin type in the underground organs named rhizophores. The effect of different concentrations of nitrogen, 6, 12 and 24 kg N/ha supplied as $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on plant growth and fructan accumulation was investigated in plants obtained from rhizophore fragments and cultivated in a cerrado area. Young, six-month-old plants, showed lower amounts of fructans and increases in height, leaf area, dry mass of the aerial organs and rhizophores with increasing concentrations of nitrogen. After 12 months, growth was stimulated only in plants receiving 6 to 12 kg N/ha. The data showed that in young plants fructan content is negatively correlated to growth and to increasing nitrogen concentrations. On the contrary, plants with 12 months treated with 24 kg N/ha accumulated 6.0 g fructan per plant while in control plants, not treated with supplementary N, this value was only 3.5 g. These results indicate that the 24 kg N/ha concentration is recommended for fructan production in plants with 12 months.

INTRODUÇÃO

A baixa fertilidade e a deficiência hídrica do solo encontram-se entre os principais fatores limitantes da produtividade vegetal (Haridasan *et al.*, 1997). Estudos sobre fertilidade são amplamente documentados para espécies cultivadas (Marschner, 1995) porém são escassas as informações a respeito das exigências nutricionais de espécies nativas, em especial as do cerrado.

Os trabalhos sobre fertilização mineral em espécies nativas do cerrado foram realizados, principalmente, com arbóreas e em algumas espécies do estrato herbáceo. De modo geral, esses estudos mostraram que a maioria das espécies responderam à aplicação de cálcio e de adubação, aumentando a absorção dos nutrientes (Moraes, 1994; Vilela & Haridasan, 1994; Haridasan *et al.*, 1997). Testando diferentes macronutrientes, Melo (1999) demonstrou que o fósforo foi o nutriente mais limitante para algumas arbóreas na fase de muda, proporcionando maior crescimento e produção de matéria seca. Esse mesmo autor concluiu ainda que, apesar de adaptadas à baixa fertilidade, as espécies nativas são capazes de absorver mais nutrientes desde que haja maior disponibilidade destes no solo, mostrando que a escassez de nutrientes no solo é um fator limitante para as espécies nativas do cerrado.

O comportamento nutricional de gramíneas e outras herbáceas do cerrado *sensu stricto* mostraram que estas também são bem adaptadas aos solos oligotróficos e ácidos do cerrado (Vilela & Haridasan, 1994). No entanto, o fato dessa vegetação ser tolerante à baixa fertilidade não elimina a possibilidade de se obter respostas à maior disponibilidade de nutrientes do solo (Vilela & Haridasan, 1994). Esta hipótese foi confirmada por Haridasan *et al.* (1997) ao demonstrarem que herbáceas do cerrado das famílias Asteraceae, Poaceae, Euphorbiaceae, Proteaceae e Sapindaceae absorvem mais Ca, N, P e K em resposta ao aumento da aplicação de cálcio e da adubação no solo. Contudo, nenhuma análise de crescimento foi realizada com

os membros dessas famílias. Teixeira *et al.* (1997), estudando *Vernonia herbacea*, uma Asteraceae perene, nativa do estrato herbáceo do cerrado, mostraram que sob condições controladas em casa de vegetação, solução nutritiva de Hoagland promoveu o crescimento dos órgãos aéreos.

Plantas de *V. herbacea* possuem órgãos-dreno subterrâneos, denominados rizóforos, que acumulam frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich, 1993) que são polímeros de frutose originados da sacarose e que apresentam ligações E-2,1 entre os resíduos de frutose (Pollock, 1986). Essa classe de carboidratos parece estar relacionada a mecanismos de osmorregulação em plantas que passam por períodos de restrição de água e/ou baixas temperaturas em determinadas épocas do ano (Pollock, 1986).

Variações sazonais no conteúdo e na composição de frutanos têm sido relatadas para diversas espécies, incluindo *Helianthus tuberosus* (Bacon & Loxley, 1952), *Cichorium intybus* (Van den Ende *et al.*, 1996), *Polymnia sonchifolia* (Fukai *et al.*, 1997) e forrageiras e cereais (Pollock & Cairns, 1991) de regiões temperadas e para algumas espécies tropicais do cerrado, como *Viguiera discolor* (Isejima & Figueiredo-Ribeiro, 1993), *Gomphrena macrocephala* (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993) e *Vernonia herbacea* (Carvalho & Dietrich, 1993). No inverno, quando as partes aéreas das plantas de *V. herbacea* senescem, o conteúdo de inulina aumenta, chegando a representar 80% da massa seca dos seus rizóforos. O ciclo fenológico dessa espécie é caracterizado por uma fase de crescimento vegetativo que se inicia na primavera e se estende até o final do outono, quando os órgãos aéreos entram em senescência e os rizóforos, em dormência. Na primavera do segundo ciclo de vida, ocorre a brotação das gemas vegetativas dos rizóforos dando início à fase de crescimento rápido seguido de floração (Carvalho & Dietrich, 1993).

Além da importância ecológica, os frutanos são de grande interesse econômico, devido às suas propriedades benéficas à saúde (Tomomatsu, 1994) que despertaram a atenção da

indústria mundial de alimentos. Essa classe de carboidratos tem sido empregada com sucesso nos casos de constipação, prevenção de doenças do intestino, por estimular a proliferação das bifidobactérias, e no controle da osteoporose, por estimular a absorção de cálcio (Coussement & Franck, 1998). O fato dos frutanos não serem absorvidos pelo organismo humano (Nilsson *et al.*, 1988; Hidaka & Hirayama, 1991) fez desses polímeros de frutose uma potente fonte alternativa de açúcar de baixa caloria.

As maiores fontes comerciais de inulina são raízes de *Dhalia* sp. e de *C. intybus* e tubérculos de *H. tuberosus*, todas da família Asteraceae e de regiões temperadas. Dentre essas espécies, *C. intybus* é a mais produtiva, podendo atingir 12/t/ha de inulina (Meijer *et al.*, 1993). A produção de frutanos em *V. herbacea* foi estimada em 0,522 t/ha após dois anos de cultivo (Carvalho *et al.*, 1998). Esses autores verificaram que a aplicação de N, P e K não promoveu o aumento da biomassa de rizóforos, nem da produção de frutanos.

Considerando que essa espécie acumula elevadas concentrações de frutanos em seus órgãos de reserva e em vista do crescente interesse por novas fontes de frutanos para uso na indústria alimentícia e farmacêutica, *V. herbacea* figura como alternativa para o uso sustentável do cerrado. Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de estimular a produtividade de inulina com o fornecimento diferencial de nitrogênio para as plantas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico e delineamento experimental - Plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) obtidas por multiplicação vegetativa, a partir de fragmentos de rizóforos medindo aproximadamente 4 cm de comprimento, foram cultivadas entre abril de 1997 e abril de 1998 na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu (22° 35'S e 47° 44'W), uma área de cerrado do estado de São Paulo.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com 6 repetições, 4 tratamentos e 54 plantas por parcela, no espaçamento de 25 cm entre plantas e 50 cm entre linhas. Os dados da análise química da camada de 20 cm do solo do local do experimento são apresentados na tabela 1. Os resultados da análise química do solo indicaram baixa acidez (pH = 5,8), alto teor de Ca e baixo de Mg, muito baixo para P e K e alto para o Al trocável. O solo apresentou baixa capacidade de troca catiônica (CTC), baixo teor de matéria orgânica (M.O.) e extremamente baixa de saturação de bases (V).

Para a correção da acidez do solo, foi feita calagem com 0,918 t/ha de calcário dolomítico, antes do plantio. No momento do plantio, a adubação básica para todos os tratamentos foi de 20 kg/ha de nitrogênio na forma de sulfato de amônia ((NH₃)₄SO₄), 40 kg/ha de fósforo (P₂O₅) na forma de termofosfato e 120 kg/ha de potássio (K₂O) na forma de cloreto de potássio. Também foram aplicados três níveis de nitrogênio: 6, 12 e 24 kg/N/ha na forma de (NH₃)₄SO₄ em setembro e dezembro de 1997. Os fertilizantes foram aplicados a uma distância de 5 cm do sulco de plantio e a uma profundidade de 7 cm. A irrigação artificial foi acionada quando necessário. As avaliações para análise de crescimento e do conteúdo de frutanos foram realizadas após 6 meses (avaliação preliminar) e 12 meses de cultivo.

Análise de crescimento – As medidas de crescimento utilizadas foram altura do maior ramo de cada planta, área foliar e massa seca da parte aérea (caules e folhas) e subterrânea (rizóforos). A massa seca foi determinada após secagem em estufa à temperatura de 60°C até obter massa constante; para os rizóforos, foram utilizadas quatro amostras de 3 g de massa fresca estimando-se o valor da massa total dos rizóforos de cada planta. A área de folhas maiores que cinco cm de comprimento foi calculada através do programa “Area Leaf & Analysis” da Skye Instruments Ltd. (1993).

Extração de carboidratos solúveis - Os carboidratos solúveis foram extraídos segundo o método utilizado por Carvalho *et al.* (1998) a partir de seis amostras de rizóforos (1,5 g). As amostras foram fragmentadas, fervidas em etanol 80% por 3 minutos para desnaturação enzimática. Em seguida, foram maceradas em gral e almofariz, aquecidas em banho-maria a 80°C por 15 minutos e centrifugadas a 800 g por 10 minutos à temperatura ambiente. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes como descrito anteriormente e então submetido duas vezes a extração aquosa por 30 minutos a 60°C, homogenizados e filtrados à vácuo, em tecido algodão. Os sobrenadantes da fração etanólica e aquosa foram reunidos, constituindo o extrato de frutanos totais, o qual foi concentrado em rotoevaporador, a 40°C. Os extratos foram mantidos a -20°C para posterior análise quantitativa e qualitativa.

Análise dos carboidratos - O conteúdo de frutose livre e combinada presente nos extratos foi estimado pela reação de antrona, modificada para cetoses (Jermyn 1956), usando-se frutose (Sigma) como padrão.

Após deionização em resina catiônica (Dowex-50W, Na⁺) e aniônica (Dowex-1, Cl⁻), os carboidratos solúveis neutros foram analisados em coluna de troca aniônica 4x250 mm CarboPac PA-100, utilizando o cromatógrafo de íons Dionex DX-300 acoplado a um detector

de pulso amperométrico (HPAEC/PAD). Foi utilizado o gradiente estabelecido por Shiomi (1993). O eluente A (NaOH 150 mM) e o eluente B (acetato de sódio 500 mM em NaOH 150 mM) foram misturados conforme a seguinte programação: 0-4 min, 25 mM; 4-25 min, 225 mM; 25-35 min, 320 mM; 35-39 min, 500 mM; 39-41 min, 25 mM. O fluxo através da coluna foi de 1 cm³/min e os potenciais aplicados ao T1 (480 ms), T2 (120 ms) e T3 (60 ms) foram de +0,05, +0,60 e -0,60 V, respectivamente. Os padrões de eluição dos componentes das amostras foram comparados com os padrões de fruto-oligo e possacarídeos de tubérculos de *Helianthus tuberosus*.

Análise estatística – Foi aplicada a regressão de polinômios para o estudo da relação dos parâmetros analisados com as concentrações de (NH₃)₄SO₄ e da relação entre crescimento e concentração de frutanos. O erro padrão da média também foi calculado.

RESULTADOS

Os resultados obtidos mostraram que a adubação nitrogenada influenciou, significativamente, o crescimento de plantas de *V. herbacea* cultivadas em área de cerrado (fig. 1). Em plantas jovens, colhidas aos 6 meses, ocorreu aumento na altura, área foliar, massa seca da parte aérea e dos rizóforos em resposta ao aumento da dose de nitrogênio. A dose de 24 kg N ha⁻¹ causou aumento em 50% na área foliar e na massa seca da parte aérea e dos rizóforos quando comparada às plantas não adubadas (controle). Quanto à altura, essa diferença foi de cerca de 20%. Após doze meses de cultivo, as plantas responderam positivamente às doses entre 6 e 12 kg/ha de nitrogênio.

Houve diferenças entre as curvas de regressão obtidas para plantas jovens e aos 12 meses (fig. 1). Para as primeiras, as curvas foram ascendentes, enquanto para as outras, obteve-se uma regressão quadrática, com um máximo entre 6 e 12/kg/ha de nitrogênio.

Como esperado para plantas em fase de crescimento, a fig. 1 mostra, ainda, que aos 12 meses de cultivo, plantas controle e tratadas apresentaram aumento de todas as medidas de crescimento, com valores superiores aos das plantas colhidas aos 6 meses..

A razão parte aérea:rizóforos também foi influenciada pela adubação nitrogenada em plantas com 12 meses de idade. Em plantas tratadas com 6 kg/ha de nitrogênio, essa razão foi de 0,75 enquanto no controle foi de 0,65 indicando, portanto, promoção de acúmulo de biomassa aérea.

A concentração de frutanos decresceu com o aumento das doses de nitrogênio em plantas jovens (fig. 2). Assim, enquanto a concentração de frutanos em plantas que receberam 24 kg/N/ha foi de apenas 330 mg/g de massa seca, esse valor foi de 650 mg/g de massa seca nas plantas que não receberam a adubação de cobertura, representando uma diferença de 97%. Em plantas com 12 meses, as diferenças entre os tratamentos também foram acompanhadas

por alterações no conteúdo de frutanos. Doses que promoveram maior crescimento (6 a 12 kg/ha, fig. 1) levaram a um menor acúmulo desses carboidratos de reserva. Por outro lado, a aplicação de 24 kg/ha de nitrogênio, promoveu acúmulo de frutanos (450 mg/g de massa seca) representando ganho de 11% em relação ao valor obtido nas plantas controle (370 mg/g MMS).

Foi observada uma correlação entre os parâmetros de crescimento e a concentração de frutanos (fig. 3) em plantas com 6 meses de cultivo. As condições nutricionais favoráveis ao crescimento (24 kg/N/ha, fig.1) levaram ao menor acúmulo de frutanos nos rizóforos (fig. 2 e 3). Para plantas colhidas aos 12 meses, nenhuma correlação significativa foi encontrada entre a concentração de frutanos e o crescimento (fig. 3). Plantas colhidas com 6 meses apresentaram concentrações de frutanos próximas de 80% da massa seca dos rizóforos, exceto quando tratadas com 24 kg/N/ha.

Os tratamentos de adubação e o tempo de colheita alteraram, também, a produtividade de frutanos (fig. 4). Para plantas colhidas aos 6 meses, a dose de 6 kg/N/ha foi a que promoveu maior produção com valor estimado de 700 mg de frutanos por planta, correspondendo a um aumento de 40% em relação ao controle, enquanto em plantas colhidas com 12 meses, a produção de frutanos por planta foi superior, obtendo-se rendimento máximo de 6 g por planta com a dose de 24 kg/N/ha. Esse valor corresponde a um aumento de 100% em relação às plantas não tratadas. A produção de frutanos estimada por área foi de 0,5 t/ha para plantas colhidas com um ano e tratadas com 24 kg/N/ha.

As análises dos frutanos por HPAEC/PAD mostraram que a adubação nitrogenada não alterou o padrão dos componentes da série homóloga de frutanos em plantas colhidas aos 6 meses de idade (fig. 5), mesmo no tratamento que proporcionou melhor ganho de biomassa (24 kg/N/ha). Já aos 12 meses de cultivo, diferenças ocorreram quando foram adicionados 6 kg/ha de nitrogênio, podendo ser observada maior proporção de 1-cestose (C), nistose (Nis) e

dos fruto-oligossacarídeos de GP 5-8. Em comparação às plantas jovens, plantas com 12 meses apresentaram maior proporção de frutanos com menor grau de polimerização (GP 5-8) e menor proporção de fruto-polissacarídeos de cadeias longas (GP>25). Numa análise mais detalhada dos cromatogramas, foram identificados componentes da série de inulo-*n*-ose em maiores proporções nos rizóforos de plantas com 12 meses de cultivo, principalmente quando tratadas com 6 a 24 kg/N/ha. Os picos, sempre muito baixos dessa segunda série de frutanos podem ser visualizados em posição alternada com os picos dos componentes da série principal de frutanos.

DISCUSSÃO

De maneira geral, a adubação nitrogenada em plantas de *V. herbacea* cultivadas em área de cerrado resultou em benefício para o crescimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Renó *et al.* (1997) em espécies arbóreas do cerrado *sensu stricto*. Haridasan *et al.* (1997), analisando seis espécies do estrato herbáceo desse bioma, constataram que N, P, K e Ca são fatores limitantes para o crescimento desse tipo de vegetação. Assim, embora as espécies herbáceas do cerrado estejam bem adaptadas aos solos oligotróficos (Vilela & Haridasan, 1994), estas podem responder ao aumento da aplicação de cálcio e da adubação no solo, elevando a concentração dos nutrientes na biomassa de seus órgãos aéreos. Por outro lado, Carvalho *et al.* (1998) notaram um possível efeito negativo da adubação com N, P e K na biomassa de *V. herbacea*, porém, não tendo encontrado diferenças significativas dadas o elevado coeficiente de variação das medidas de crescimento.

Trabalhando com *Achyrocline alata*, outra Asteraceae do cerrado, Haridasan *et al.* (1997) verificaram que a adição crescente de cálcio no solo causou um aumento de até 87% na concentração de Ca na parte aérea das plantas. No entanto, outras espécies de cerrado não mostraram nenhuma resposta ao nitrogênio, mas sim ao P e K. Nesse aspecto, Felipe & Dale (1990) constataram aumento na área foliar e biomassa seca de *Bidens gardneri*, uma composta do cerrado, em resposta às doses crescentes do P até o valor máximo em 6 mg de P por planta, nível esse considerado superior ao observado em solos do cerrados.

Em ambientes similares ao cerrado já foram constatadas algumas limitações do crescimento causadas por deficiência nutricional do solo. Miragaya *et al.* (1983), trabalhando com gramíneas das savanas da Venezuela, verificaram que a adição de N, P e K aumentou significativamente a produção de matéria seca da parte aérea e concluíram que o baixo nível de nutrientes no solo era fator limitante para o crescimento das espécies estudadas.

Em algumas situações, os elementos fornecidos isoladamente não são capazes de promover qualquer acréscimo de biomassa, sendo necessária a combinação dos elementos para manifestar uma resposta satisfatória de crescimento. Nicoloso *et al.* (1999) verificaram que o N só apresentou efeito positivo sobre o crescimento quando combinado a outros elementos químicos. As interações entre os nutrientes são complexas e encontram-se bem documentadas para espécies cultivadas (Marschner, 1995), mas são pouco estudadas em espécies selvagens. Portanto, estudos sobre o efeito da combinação de nutrientes podem otimizar a produção de biomassa em plantas de *V. herbacea* e, conseqüentemente, a produção de frutanos.

A adubação nitrogenada em *V. herbacea* alterou a partição de biomassa entre parte aérea e subterrânea. Adição de 6 kg/N/ha em plantas com 12 meses causou diminuição da produção da parte subterrânea em relação à parte aérea, quando comparada ao controle. Efeito similar foi observado por Renó *et al.* (1997), Melo (1999) e Oliveira (1999) em espécies arbóreas de Cerrado adubadas com nitrogênio, mostrando que, de modo geral, a maior disponibilidade de N estimula a partição de biomassa para os órgãos aéreos, aumentando a razão parte aérea:parte subterrânea. No entanto, essa razão pode variar muito entre as espécies e nas diferentes fases do seu ciclo de vida (Oliveira, 1999). Em *V. herbacea*, a razão parte aérea:parte subterrânea aumenta na primavera e verão, coincidindo com a fase de florescimento e crescimento vegetativo e, no final do outono, quando as plantas entram na fase de senescência, essa razão diminui (Carvalho *et al.*, 1997).

Em estudos do comportamento nutricional, a fase do desenvolvimento vegetal pode interferir efetivamente nas respostas aos tratamentos, uma vez que as exigências nutricionais podem variar com a idade da planta (Marschner, 1995). Conforme os resultados apresentados na fig. 1, plantas jovens responderam progressivamente às doses crescentes de adubação nitrogenada, enquanto em plantas com 12 meses de idade, respostas positivas ocorreram apenas nas doses entre 6 e 12 kg/ha de nitrogênio. Tais resultados são consistentes com aqueles obtidos

por Collins & McCoy (1997) que constataram diferentes respostas quanto à produção de raízes tuberosas de *C. intybus* em função da idade das plantas. Nesse estudo, plantas com 1 ano de *C. intybus* mostraram resposta linear crescente ao aumento das doses do nitrogênio, e que plantas com 2 anos apresentaram dois tipos de respostas: linear crescente e quadrática crescente, com um ponto máximo na dose de 150 kg/ha de nitrogênio. No caso do cerrado, esta maior exigência em plantas jovens pode ter importante papel ecológico no sentido de limitar a população de plantas adultas evitando que o cerrado se transforme em uma vegetação mais densa (Melo, 1999).

A adubação nitrogenada em plantas com 6 e 12 meses de idade resultou em respostas diferentes não apenas no crescimento, mas também no conteúdo de frutanos. Doses crescentes de adubação nitrogenada causaram decréscimo na concentração de frutanos em plantas jovens, ao passo que efeito contrário ocorreu em plantas com 12 meses de idade (fig. 2). No entanto, esses resultados não permitem afirmar que a síntese de frutanos esteja sob controle direto da fertilidade do solo, uma vez que diferentes respostas ocorreram em função da idade das plantas e das épocas de avaliação (outubro e abril). Correlação negativa entre crescimento e concentração de frutanos foi constatada em plantas jovens, mas não em plantas com 12 meses de idade (fig. 3). Outros estudos realizados com espécies acumuladoras de frutanos da família Asteraceae como em *H. tuberosus* (Schittenhelm, 1999), *C. intybus* (Van den Ende *et al.*, 1999), *Polysmnia sanchifolia* (Tsukihashi *et al.*, 1991) e *V. herbacea* (Teixeira *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 1998), também mostraram que o nitrogênio promoveu o crescimento vegetal em detrimento da concentração de carboidratos. Esses resultados reforçam a hipótese de que tratamentos que limitam o crescimento da planta proporcionam aumento no conteúdo de carboidratos de reserva (Pollock, 1986).

Quanto à época do ano, esperava-se que plantas colhidas em abril (12 meses de cultivo) mostrassem maior concentração de frutanos em relação às colhidas em outubro (6

meses de cultivo), uma vez que o conteúdo em frutanos de *V. herbacea* alcança valores mais elevados no outono (Carvalho & Dietrich, 1993). No entanto, isso não ocorreu, sugerindo que outros fatores, como a idade da planta, tenham influenciado a concentração de frutanos.

Excluindo a maior dose de nitrogênio, a capacidade de síntese de frutanos parece ter sido influenciada pela idade da planta, visto que plantas jovens mostraram maior concentração de frutanos em relação às plantas colhidas aos 12 meses de cultivo (fig. 2). Analisando duas épocas de colheita, Carvalho *et al.* (1998) constataram comportamento similar em *V. herbacea* tendo as plantas com 2 anos apresentado menor concentração de frutanos do que plantas com 1 ano. Portanto, parece que a capacidade de síntese de frutanos em *V. herbacea* esteja sob forte controle da idade das plantas, visto que rizóforos de plantas mais jovens desta espécie acumulam maior conteúdo de frutanos.

As proporções dos componentes da série homóloga de frutanos foram alteradas em resposta à adubação nitrogenada aos 12 meses de cultivo. Em relação às outras doses, foi observado aumento de 1-cestose, nistose e oligômeros de GP 5-8 em rizóforos de plantas adubadas com 6 kg/N/ha. Quando comparadas às plantas com 6 meses, plantas com 12 meses de idade mostraram diminuição nos fruto-polissacarídeos de GP>25 e aumento nos fruto-oligossacarídeos (fig. 5), sugerindo maior atividade de hidrólise de frutanos em plantas mais desenvolvidas, caracterizadas pelas maiores medidas de crescimento (fig. 1). A maior proporção dos componentes da série de inulo-*n*-ose em plantas com 12 meses, especialmente no tratamento de 6 kg/N/ha, confirmam essa hipótese, uma vez que essa série de frutanos é considerada produto de hidrólise de frutanos (Ernst *et al.*, 1996). Em *H. tuberosus* e *C. intybus* também se verificou que o crescimento induzido por condições ambientais satisfatórias foi acompanhado pela diminuição na proporção de frutanos de cadeia longa em relação aos frutanos de cadeia curta, indicando que a degradação dos fruto-polissacarídeos ocorre durante a mobilização das reservas para atender à demanda da parte aérea (Jefford & Edelman, 1963;

Van den Ende *et al.*, 1999). Da mesma forma, Carvalho *et al.* (1998) notaram uma diminuição nos fruto-polissacarídeos de GP>8 em relação aos fruto-oligossacarídeos (GP 3-8) em plantas de *V. herbacea* com 2 anos de cultivo sob adubação mineral. Tais resultados confirmam a hipótese de que fatores limitantes do crescimento modificam também a distribuição das classes moleculares de frutanos (Pollock, 1986).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que plantas adubadas com 24 kg N/ha chegaram a acumular 6,0 g de frutanos por planta, enquanto em plantas não adubadas esse valor foi de 3,5 g (fig. 4) o que representa um acréscimo de 70% na produtividade. Dados obtidos anteriormente mostraram que plantas de 1 ano de idade acumularam 1,9 g por planta, chegando ao valor de 6,9 g apenas aos 2 anos de idade (Carvalho *et al.*, 1998). Portanto, a aplicação de 24 kg N/ha foi eficiente para promover a produção de frutanos, com redução do tempo de cultivo.

Concluindo, a adubação nitrogenada é eficiente para aumentar a produtividade em uma colheita antecipada (12 meses), sem alterar de forma expressiva a composição dos frutanos.

Agradecimentos – A FAPESP, pelo apoio financeiro (Biotasp proc. 98/05124-8), ao CNPq, pelas bolsas de Produtividade em Pesquisa de M.A.M Carvalho, C.J. Barbedo e L.B.P. Zaidan e à CAPES (PICDT proc. 23068.000024/99-20) pela concessão de bolsa de doutorado à G.R.F. Cuzzuol.

LITERATURA CITADA

- Bacon, J.S.D. & Loxley, R. 1952. Seasonal changes in the carbohydrates of the Jerusalem artichoke tuber. *Biochemical Journal* 51:208-213
- Carvalho; M.A.M & Dietrich, S.M.C. 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123:735-740.
- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C. 1997. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from thizophores. *New Phytologist* 136:153:161.
- Carvalho, M.A.M., Pinto, M.M.& Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21:275-280
- Collins, M. & McCOY, E.J. 1997. Chicory productivity, forage quality, and response to nitrogen fertilization. *Agronomy Journal* 89:323-238.
- Coussement, P. & Franck, A. 1998. New food applications for inulin. *Agro-food-Industry Hi-Tech* 9:26-28.
- Ernst, M., Chatterton, N. J. & Harrison, P. A. 1996. Purification and characterization of a new fructan series from species of Asteraceae. *New Phytologist* 132:63-66.
- Felippe, G.M. & Dale, J.E. 1990. The effects of phosphate supply on growth of plants from the Brazilian Cerrado: experiments with seedlings of the annual weed, *Bidens gardneri* Baker (Compositae) and the tree, *Qualea grandiflora* (Mart.) (Vochysiaceae). *Oecologia* 82:81-86.
- Fukai, K., Ohno, S., Goto, K., Nanjo, F. & Hara Y. 1997. Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in yacon (*Polymnia sonchifolia*). *Soil Science and Plant Nutrition* 43:171-177.
- Haridasan, M., Pinheiro, A.A.M.C. & Torres, F.R.R. 1997. Resposta de algumas espécies do estrato rasteiro de um cerrado à calagem e à adubação. IN: *Contribuição ao Conhecimento Ecológico do Cerrado* (L.L. Leite & C.H. Saito, eds), Brasília, pp. 87-91.
- Hidaka, H. & Hirayama, M. 1991. Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. *Biochemical Society Transactions*. 19:561-565.

- 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 *Helianthus tuberosus* L. *Journal experimental Botany* 14:56-62.
- Isejima, E.M. & Figueiredo-Ribeiro, R. de C. 1993. Fructan variation in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae): the influence of phenology. *Plant Cell and Physiology* 34:723-727.
- Jermyn, M.A. 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature* 177:38-39.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd Edition, Academic Press, Orlando, 889p.
- Meier, W.J.M., Mathijssen, E.W.J.M. & Borm, G.E.L. 1993. Crop characteristics and inulin production of Jerusalem artichoke and chicory. IN: *Inulin and Inulin Containing Crops, Studies in Plant Science* (H. Fuchs, ed.), Elsevier, Amsterdam, pp..
- Melo, J.T. 1999. Respostas de espécies arbóreas do cerrado a nutrientes em latossolo vermelho escuro. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, tese de Doutorado.
- Miragaya, J., San Jose, J.J. & Hernandez, J.I. 1983. Effect of added nitrogen, phosphorus and potassium on above-ground biomass production and nutrient content of *Trachypogon* savanna grasses. *Tropical Ecology* 24:33-42.
- Moraes, D.D.A. 1994. Resposta de algumas espécies arbóreas nativas do cerrado à adubação e calagem. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, dissertação de Mestrado.
- Nicoloso, F.T., Fogaça, M.A.F., Zanchetti, F., Missio, E.L. & Fortunato, R.P. 1999. Exigências nutricionais da grápia (*Apuleia leicarpa* Vog. Macbride) em solo podzólico vermelho amarelo – níveis de nitrogênio, fósforo e potássio. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11:157-159.
- Nilsson, U., Öste, R., Jägerstad, M. & Birkhed. 1988. Cereal fructans: *in vitro* and *in vivo* studies on availability in rat and humans. *Journal Nutrition* 118:1325-1330.
- Oliveira, M.E. 1999. Influência de árvores das espécies nativas *Dipteryx alata* Vog. E *Caryocar brasiliense* Camb. no sistema solo-planta em pastagem de *Brachiaria decumbens* Stapf no cerrado. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, tese de Doutorado
- Pollock, C.J. 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist* 104:1-24.
- Pollock, C.J. & Cairns, A.J. 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42:77-101.

- Renó, N.B., Siqueira, J.O., Curi, N. & Vale, F.R. 1997. Limitações nutricionais ao crescimento inicial de quatro espécies arbóreas nativas em Latossolo Vermelho-Amarelo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32:17-25.
- Schittenhelm, S. 1999. Agronomic Performance of root Chicory, Jerusalem Artichoke, and Sugarbeet in stress and nonstress environments. *Crop Science* 39:1815-1823.
- Shiomi, 1993. Structure of fructopolysaccharide (Asparagosin) from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *New Phytologist* 123:263-270.
- Teixeira, P.G., Carvalho, M.A.M, Zaidan, L.B.P. & Klein, A.L. 1997. Effect of mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 2:89-96.
- Tomomatsu, H. 1994. Health effects of oligosaccharides. *Food Technology* 48:61-65.
- Tsukinhashi, T., Asami, T., Minasawa, K. & Kubota, M. 1991. Effect of nitrogen and potassium fertilizer on the growth and yield of yacon (*Polysmnia sanchifolia*). *Vocacional Agriculture* 38:50-56.
- Van den Ende, W., Minties A., Spellers, H., Onuoha, A.A. & Van Laere, A. 1996. The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* L. during growth, storage and forcing. *New Phytologist* 132:555-563.
- Van den Ende, W., De Roover, J. & Van Laerce, A. 1999. Effect of nitrogen concentration on fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 105:2-8.
- Vieira, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1993. Fructose-containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae) ant different phenological phases. *Plant, Cell and Environment* 16:919-928.
- Vilela, D.M.V. & Haridasan, M. 1994. Response of the ground layer community of a cerrado vegetation in central Brazil to limiting and irrigation. *Plant and Soil* 163:25-31.
- Vijn, I. & Smeeckens, S. 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120:351-359.

Tabela 1. Composição química do solo do cerrado da Reserva Biológica da Estação Experimental de Moji Guaçu onde foi realizado o experimento. As análises foram realizadas no Laboratório de Fertilidade do Solo, da Faculdade de Ciências Agronômicas (UNESP), em Botucatu, SP

<i>P_{resina}</i>	M.O.	pH	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
mg/dm ³	g/dm ³	CaCl ₂	mmol _c /dm ³						%
1,6	10	5,8	0,2	15	8	21	25	46	54

M.O. = matéria orgânica; H+Al = potencial de acidez; SB = soma das bases; CTC = capacidade de troca catiônica (SB + (H+Al)); V = saturação de bases: (SB/CTC)x100.

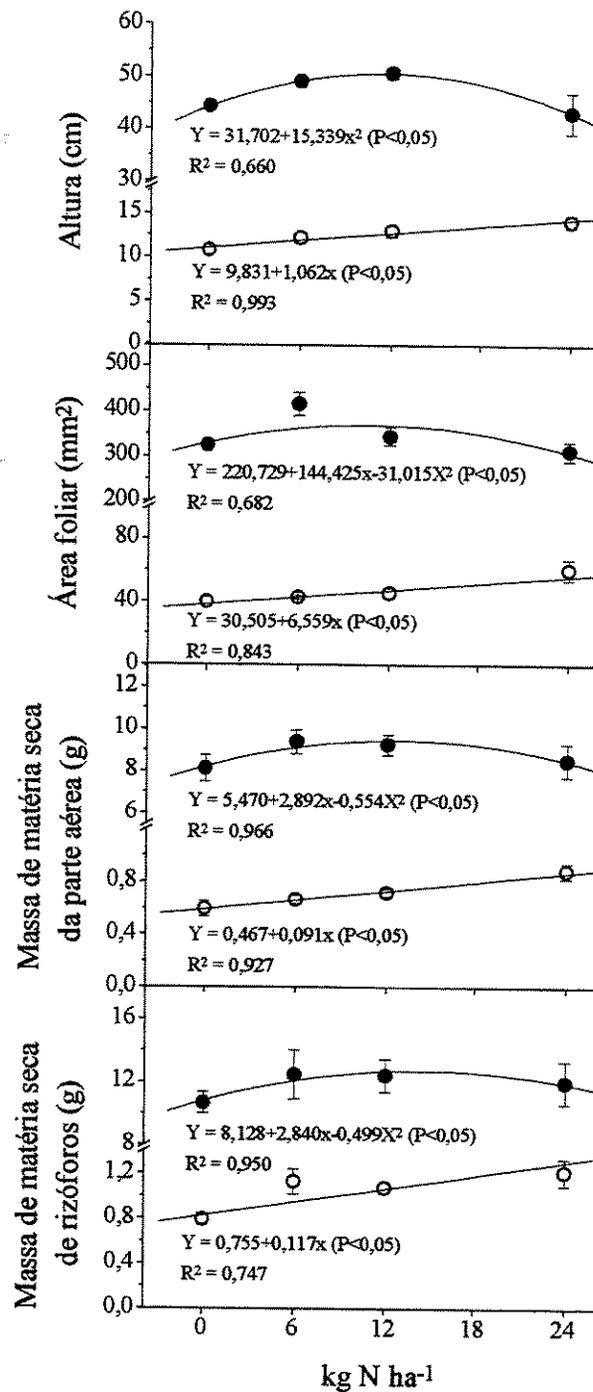


Figura 1. Medidas de altura, área foliar, massa de matéria seca da parte aérea e massa de matéria seca de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* cultivadas em diferentes níveis de adubação nitrogenada após 6 meses (○) e 12 meses (●), em uma área de cerrado. Barras representam erro padrão (n=6).

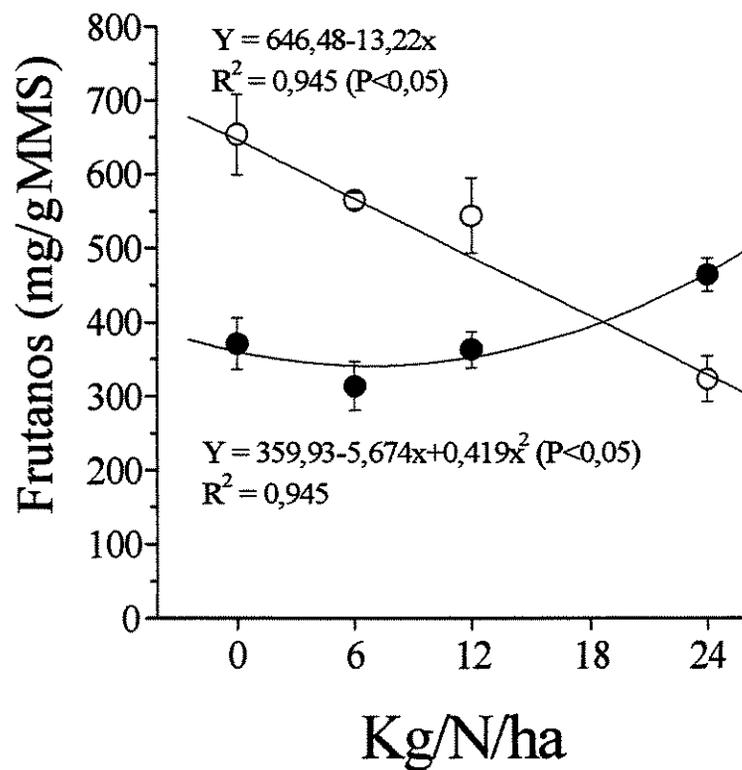


Figura 2. Concentração de frutanos em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* cultivada em diferentes níveis de adubação nitrogenada após 6 meses (○) e 12 meses (●), em uma área de cerrado. Barras representam erro padrão (n=6).

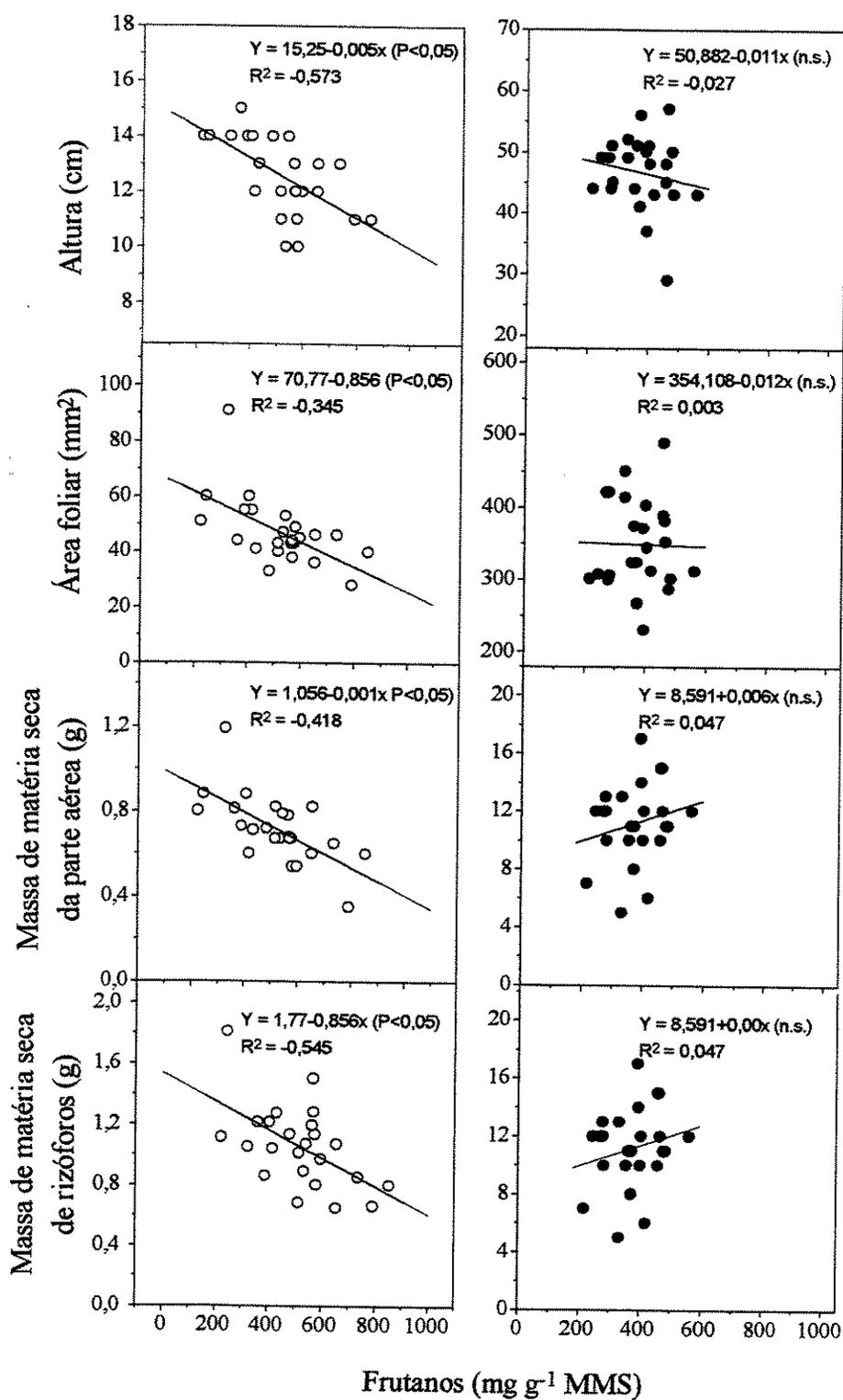


Figura 3. Correlação entre a concentração de frutanos e medidas de crescimento em plantas de *Vernonia herbacea* após 6 meses (O) e 12 meses (●) de cultivo em uma área de cerrado.

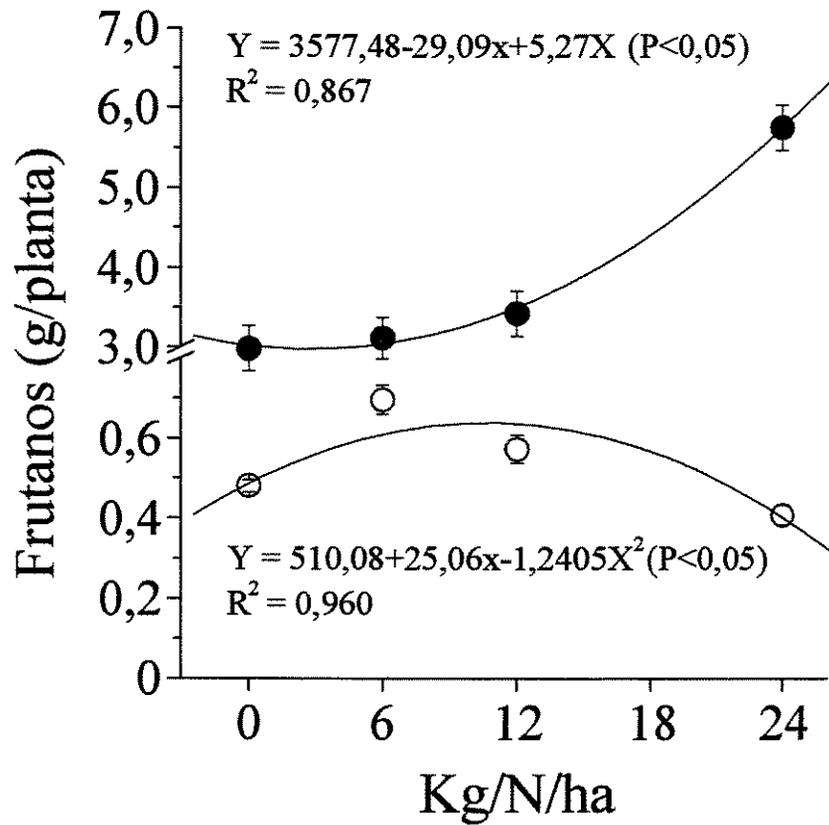


Figura 4. Efeito de diferentes níveis de adubação nitrogenada na produção de frutanos por planta de *Vernonia herbacea* após 6 meses (○) e 12 meses (●) de cultivo em uma área de cerrado. Barras representam erro padrão (n=6)

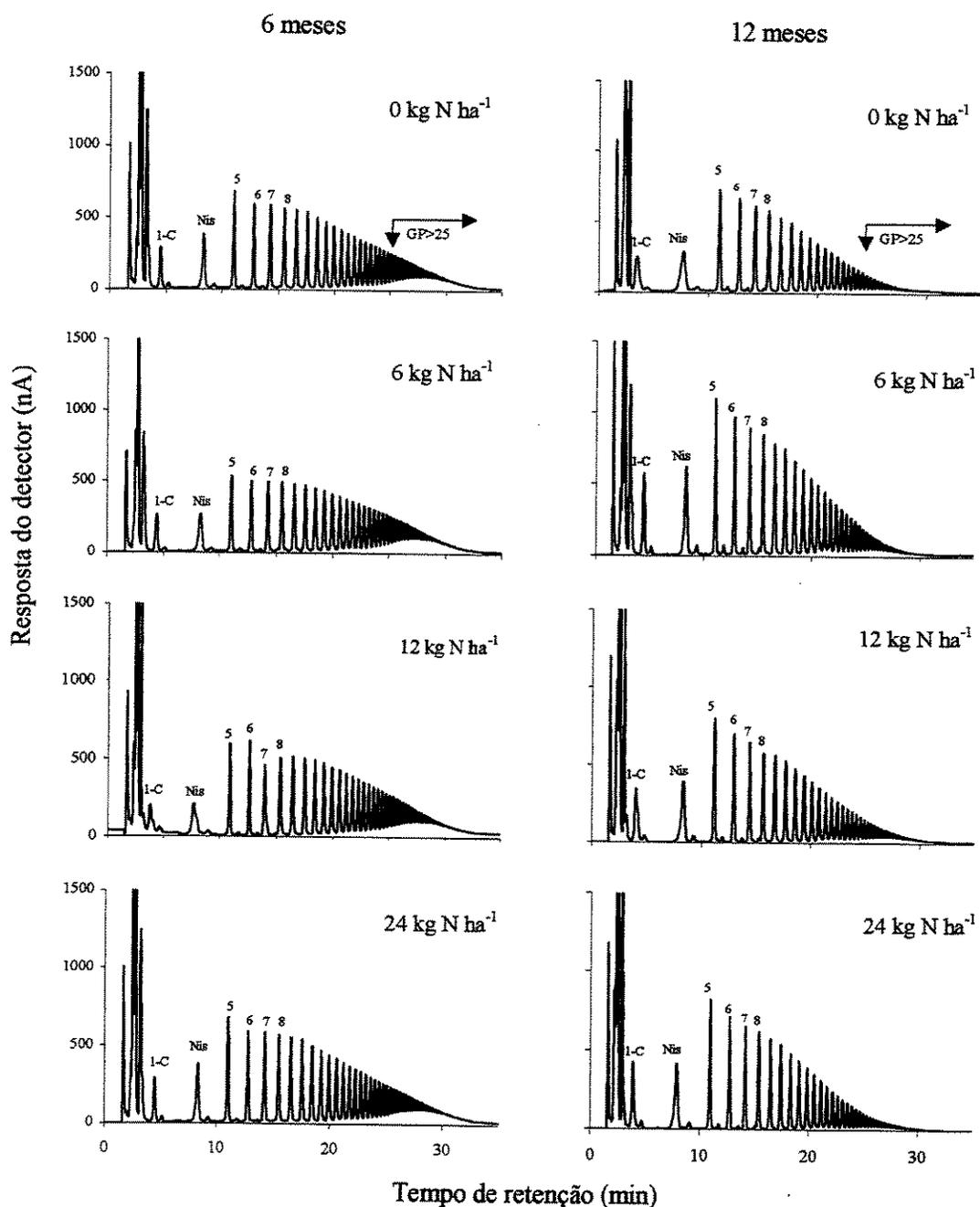


Figura 5. Análise por cromatografia de troca aniônica de alta resolução dos frutanos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* cultivadas com diferentes níveis de adubação nitrogenada após 6 meses e 12 meses em condições de uma área de cerrado. 1-C = 1-cestose; Nis = nistose. Os números 5 a 8 referem-se a fruto-oligossacarídeos de grau de polimerização 5-8. Os picos menores alternados com os picos da série principal de frutanos correspondem aos componentes da série inulo-*n*-ose. A concentração das alíquotas aplicadas no HPAEC/PAD foi equivalente, aproximadamente, de 400 µg frutose/ml.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cerrado abriga espécies vegetais ricas em polissacarídeos de potencial tecnológico considerável. Dentre as espécies já estudadas, *V. herbacea* destaca-se pelo seu elevado conteúdo de frutanos. Esses compostos possuem propriedades funcionais e fisiológicas com aplicação na indústria alimentícia e medicinal, respectivamente. Portanto, estudos relacionados à otimização da produção dos frutanos são desejáveis sob o ponto de vista econômico. A compreensão dos mecanismos fisiológicos e das estratégias adaptativas de *V. herbacea* também pode subsidiar dados valiosos para estudos relacionados à otimização da produção vegetal dessa herbácea de cerrado.

Com a presente tese de doutorado e terceiro estudo sobre a nutrição mineral em *V. herbacea*, algumas importantes informações foram obtidas, que contribuíram para uma melhor compreensão das relações nutricionais e os mecanismos de adaptação dessa Asteraceae de cerrado.

Embora seja uma espécie que se desenvolva naturalmente em ambiente oligotrófico, *V. herbacea* tem seu crescimento limitado pelo nitrogênio. Porém, a sua exigência nutricional é baixa, uma vez que responde de forma insatisfatória nos níveis nutricionais considerados eficientes para o crescimento de cultivares agrícolas.

Mesmo com o aumento da disponibilidade de nutrientes, a taxa de crescimento continuou baixa, confirmando dados da literatura que afirmam que em espécies nativas de crescimento lento a TCR permanece inalterada mesmo sob melhores condições nutricionais. (Chapin, 1980, 1988; Lambers & Poorter, 1992; Lambers *et al.*, 1998)

De maneira geral, a maior fertilidade do substrato proporcionou ganhos em termos de biomassa, mas reduziu a concentração de frutanos, sustentando a hipótese de que condições promotoras do crescimento reduzem o conteúdo de carboidratos (Pollock, 1986).

Os mecanismos fisiológicos em plantas de *V. herbacea* sob estresse nutricional são bastante complexos (fig. 3). A limitação de nitrato alterou a razão parte aérea:parte subterrânea e partição de carboidratos, bem como a atividade fotossintética. Quando a disponibilidade de nitrato foi restringida, ocorreu aumento na razão C:N mais em função da redução de proteínas do que ao aumento de carboidratos. Mesmo não havendo diferenças na concentração de sacarose foliar entre as condições nutricionais experimentadas, o conteúdo de sacarose em rizóforos foi maior sob deficiência de nitrato, indicando que a atividade do dreno é fator determinante na importação de carbono, independente da concentração de sacarose foliar (Ho, 1988; Marcelis, 1996). No entanto, cabe ressaltar que o intervalo de tempo adotado entre as avaliações talvez não tenha sido o satisfatório para mostrar possíveis diferenças no conteúdo de sacarose foliar nos tratamentos testados. Desse modo, avaliações semanais ou menor que isso possibilitem detectar a diferença de sacarose foliar não encontrada no presente trabalho.

De acordo com Chapin (1980), sob estresse nutricional, a parte aérea da planta cresce menos aumentando a demanda de açúcares que são transportados para a parte subterrânea, proporcionando mais energia para o crescimento de raízes e outros órgãos subterrâneos, aumentando assim a razão parte subterrânea:parte aérea, como verificado em *V. herbacea*. Todavia, é preciso ressaltar que estudos sobre o efeito da nutrição no conteúdo de carboidrato em folhas poderia fornecer outros dados caso as plantas fossem monitoradas em intervalos de tempo menores do que aqueles utilizados no presente trabalho.

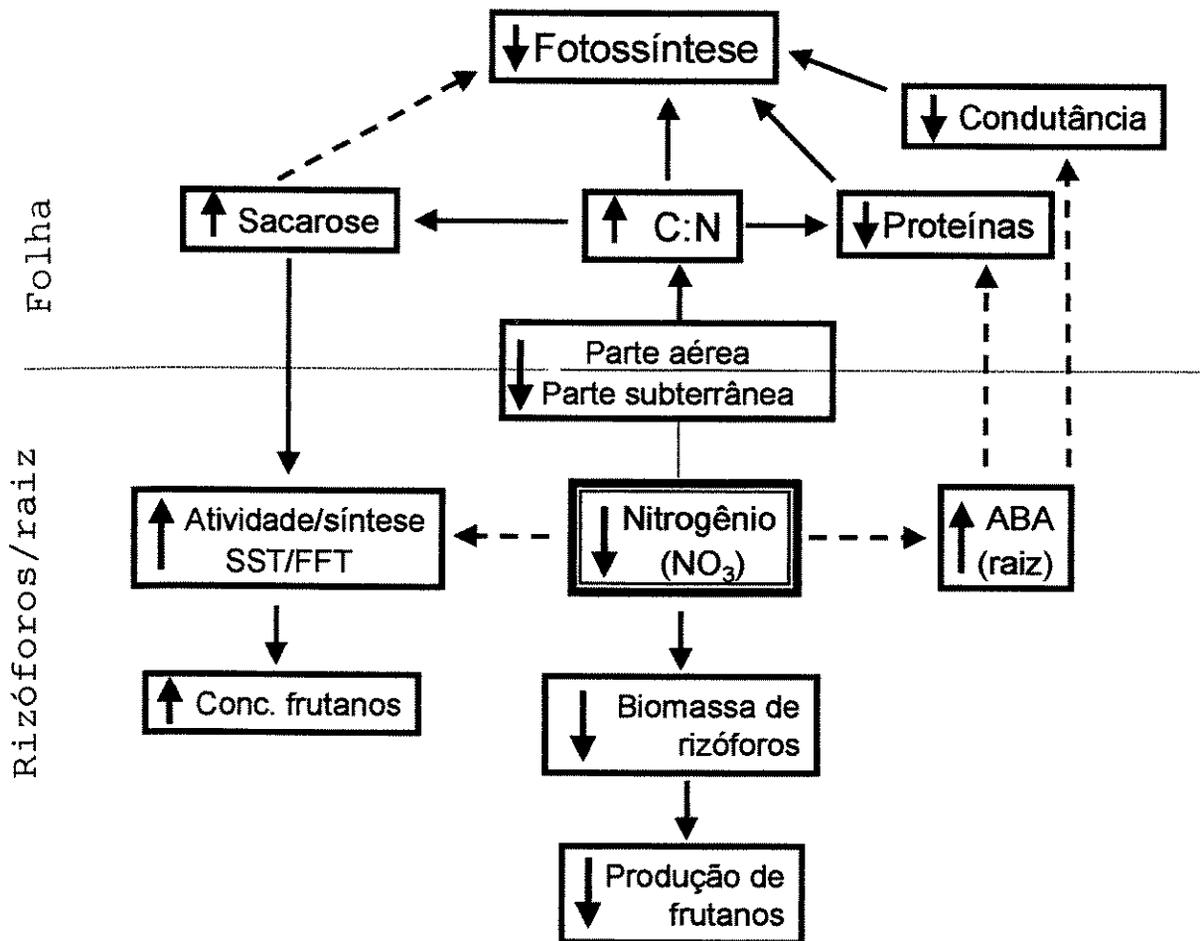


Figura 3. Hipóteses sobre os mecanismos de ação do nitrogênio (NO_3^-) no crescimento, no metabolismo de carboidratos e na fotossíntese em *V. herbacea*. As setas indicam (↓) diminuição ou (↑) aumento. Linhas tracejadas referem-se às hipóteses ainda não testadas em plantas produtoras de frutanos como *V. herbacea*.

De qualquer modo, as avaliações forneceram importantes elementos que auxiliaram na interpretação das respostas de *V. herbacea* ao estresse nutricional. Nesse aspecto, os carboidratos solúveis influenciaram na atividade fotossintética agindo diretamente nas reações de fixação do carbono. Desse modo, a sacarose e seus derivados poderiam funcionar como sinalizadores moleculares, ativando ou reprimindo genes específicos (Koch, 1996; Farrar *et al.*, 2000; Hellmann *et al.*, 2000), como aqueles relacionados à fotossíntese, os quais são inibidos quando os níveis de carboidratos solúveis são elevados (Koch, 1996).

Além dos carboidratos, o nitrogênio também tem influência marcante na fotossíntese. O menor conteúdo de proteínas em folhas de plantas sob deficiência de nitrogênio poderia explicar a menor eficiência fotossintética de plantas sob estresse nutricional. Embora a relação entre a capacidade fotossintética e o conteúdo de nitrogênio foliar seja básica no metabolismo de carbono e de nitrogênio (Evans, 1989a,b; Evans & Seemann, 1989; Anten *et al.*, 1996; Alt *et al.*, 2000), não se observou uma correlação entre as medidas fotossintéticas e o conteúdo de proteínas foliares em *V. herbacea*. Nesse caso particular, fatores como a resistência estomática controlando a atividade fotossintética podem ocorrer. Diversos autores (Chapin *et al.*, 1988; Broadley *et al.*, 2000, 2001) argumentaram que a restrição de nitrogênio deprime a fotossíntese mais pelo seu efeito direto na resistência estomática do que na cinética das enzimas relacionadas à fixação do carbono. Essa hipótese parece verdadeira para *V. herbacea* devido à maior concentração interna de CO₂ (indicativa da menor atividade de carboxilação) constatada em plantas sob deficiência de nitrogênio.

Cabe lembrar que a fotossíntese pode ser controlada, também, pelo ABA. A deficiência nutricional parece atuar como um sinal estimulando a síntese de ABA na raiz. Ao ser translocado para as folhas, o ABA poderia controlar o movimento das células-guarda reduzindo a condutividade estomática e, conseqüentemente, a fotossíntese (Chapin *et al.*, 1988).

Quanto ao efeito da nutrição no metabolismo de carboidratos, a baixa concentração de nitrato poderia operar indiretamente na síntese desses compostos, elevando a razão C:N nas folhas. Como a sacarose seria pouco utilizada em vista do crescimento limitado da parte aérea, haveria a translocação preferencial desse composto para os órgãos-dreno onde a sacarose exerceria influência na atividade das sintetases de frutanos, uma vez que a sacarose é o substrato da SST (Edelman & Jefford, 1968). Outra possível via de ação do nitrato no metabolismo de frutanos foi proposta (Améziane *et al.*, 1997a,b,c) na qual o nitrato agiria indiretamente sobre as sintetases de frutanos. A atividade dessas enzimas poderia aumentar sob baixa concentração de nitrato, refletindo no aumento da concentração de frutanos, especialmente na fase de maior síntese desses compostos, que no caso de *V. herbacea* ocorre no outono e no inverno.

Embora a menor disponibilidade de nitrogênio possibilite o aumento da concentração de frutanos, a maior disponibilidade de nitrogênio proporcionou melhores resultados em termos de produção de frutanos. No presente estudo, obteve-se 4,1 g de frutanos por planta em 12 meses aplicando-se solução nutritiva contendo 10,7 mmol/L de N-NO_3^- . Em condições de campo, 6 g de frutanos por planta foi obtido no mesmo tempo aplicando-se 24 kg/ha de nitrogênio na forma de sulfato de amônia, demonstrando a viabilidade do cultivo de *V. herbacea* em áreas de cerrado, visando à produção de frutanos

A aplicação isolada de nitrogênio proporcionou acréscimo moderado na biomassa de *V. herbacea*, sugerindo que a combinação de elementos seja capaz de proporcionar respostas mais satisfatórias do que aquelas apresentadas nesse estudo. Com essa estratégia poderia-se otimizar a produção de rizóforos de *V. herbacea* e, conseqüentemente, a de frutanos.

9. LITERATURA CITADA NA INTRODUÇÃO E REVISÃO GERAL, E NAS CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Alt, C., Stutzel, H., Kage, H. 2000. Optimal nitrogen content and photosynthesis in cauliflower (*Brassica oleracea* L. *botrytis*). Scaling up from a leaf to the whole plant. *Annals of Botany* 85: 779-787.
- Améziane, R., Limami, M.A., Noctor, G. & Morot-Gaudry, J.-F. 1995. Effect of nitrate concentration during growth on carbon partitioning and sink strength in chicory. *Journal of Experimental Botany* 46:1423-1428.
- Améziane, R., Deléens, E., Noctor, G., Morot-Gaudry, J.-F. & Limami, M.A. 1997a. Stage of development is an important determinant in the effect of nitrate on photoassimilate (^{13}C) partitioning in chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of Experimental Botany* 48:25-33.
- Améziane, R., Cassan, L., Dufossé, C., Rufty JR. T.W. & Limami, A.M. 1997b. Phosphate availability in combination with nitrate availability affects root yield and chicon yield and quality of Belgian endive (*Cichorium intybus*). *Plant and Soil* 191:269-277.
- Améziane, R., Richard-Molard, C., Deléens, E., Morot-Gaudry, J.-F. & Limami, A.M. 1997c. Nitrate ($^{15}\text{NO}_3$) limitation affects nitrogen partitioning between metabolic and storage sinks and nitrogen reserve accumulation in chicory (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 202:303-312.
- Anten, N.P.R., Hernandez, R., Medina, E.M. 1996. The photosynthetic capacity and leaf nitrogen concentration as related to light regime in shade leaves of a montane tropical forest tree, *Tetrorchidium rubrivenium*. *Functional Ecology* 10:491-500.
- Arens, K. 1963. As plantas lenhosas dos campos cerrados como flora adaptada às deficiências minerais do solo. IN: Simpósio Sobre o Cerrado, São Paulo, Brasil, p.349-265.
- Brenner, B.M., Dworkin, L.D. & Ichikawa, I. 1986. Glomerular ultrafiltration. IN: The Kidney (M.D. Brenner, C. Floyd & M.D. Rector, eds), WB Sanden Company, Philadelphia, p.124-144.
- Broadley, M.R., Escobar-Gutiérrez, A.J., Burns, A., Burns, I.G. 2000. What are the effects of nitrogen deficiency on growth components of lettuce? *New Phytologist* 147:519-526.
- Broadley, M.R., Escobar-Gutiérrez, A.J., Burns, A., Burns, I.G. 2001. Nitrogen-limited growth of lettuce is associated with lower stomatal conductance. *New Phytologist* 152:97-106.

- Carpita, N.C., Keller, F., Gibeaut, D.M., Housley, T.L. & Matile, P. 1991. Synthesis of inulin oligomers in tissue slices, protoplasts and intact vacuoles of Jerusalem artichoke. *Journal of Plant Physiology* 138:204-210.
- Carvalho, M.A.M., Pinto, M.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21:275-280.
- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C. 1997. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from thizophores. *New Phytologist* 136:153:161.
- Carvalho, M.A.M & Dietrich, S.M.C. 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123:735-740.
- Chapin, F.S. III. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology Systemics* 11:233-260.
- Chapin, F.S. III. 1988. Ecological aspects of plant mineral nutrition. IN: *Advances in Plant Nutrition* (B. Tinker & A. Läuchli, eds), Vol. 3, Praeger, New York, pp. 161-191.
- Chapin, F.S.III, Walter, C.H.S. & Clarkson, D.T. 1988. Growth response of barley and tomato to nitrogen stress and its control by abscisic acid, water relations and photosynthesis. *Planta* 173:352-366.
- Coussement, P. & Franck, A. 1998. New food applications for inulin. *Agro-food-Industry Hi-Tech* 9:26-28.
- Crawford, N.M. 1995. Nitrate: nutriente and signal for plant growth. *The Plant Cell* 7:859-868.
- De Vuono, Y.S., Batista, E.A. & Funari, F.L. 1986. Balanço hídrico na área da Reserva Biológica de Moji Guaçu, São Paulo – Brasil. *Hoehnea* 13:73-85.
- Dias-Tagliacozzo, G.M. 1995. Frutanos de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby: Variações em função da temperatura e da disponibilidade de água. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, tese de Doutorado.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Dietrich, S.M.C. & Mello-Aires, M. 1996. Measurement of glomerular filtration rate using inulin prepared from *Vernonia herbacea*, a Brazilian native species. *Brazilian Journal Medicinal Biology Research* 29:1393-1396.

- Dias-Tagliacozzo, G.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C., Carvalho, M.A. & Dietrich, S.M.C. 1999. Fructan variation in the rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, as influenced by temperature. *Revista Brasileira de Botânica* 22:267-273.
- Edelman, J. & Jefford, T.G. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus* L. *New Phytologist* 67:517-531.
- Evans, J.R. & Seemann, J.R. 1989. The allocation of protein nitrogen in the photosynthetic apparatus: costs, consequences, and control. IN: *Photosynthesis* (W.R. Briggs., ed.), Alan R. Liss Inc, New York, pp. 183-205.
- Evans, J.R. 1989a. Partitioning of nitrogen between and within leaves grown under different irradiances. *Australian Journal of Plant Physiology* 16:533-548.
- Evans, J.R. 1989b. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. *Oecologia* 78:9-19.
- Farrar, J., Pollock, C., Gallagher, J. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154:1-11.
- Felippe, G.M. & Dale, J.E. 1990. The effects of phosphate supply on growth of plants from the Brazilian Cerrado: experiments with seedlings of the annual weed, *Bidens gardneri* Baker (Compositae) and the tree, *Qualea grandiflora* (Mart.) (Vochysiaceae). *Oecologia* 82:81-86.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1993. Distribuição, aspectos estruturais e funcionais dos frutanos, com ênfase em plantas herbáceas do cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 5:203-208.
- 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. *Revista Brasileira de Botânica* 9:159-166.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Isejima, E.M., Dias-Tagliacozzo, G.M., Carvalho, M.A.M., Dietrich, S.M.C. 1991. The physiological significance of fructan accumulation in Asteraceae from the cerrado. *Ciência e Cultura* 43:443-446.
- Frehner, M., Keller, F. & Wienken, A. 1984. Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). *Journal of Plant Physiology* 116:197-208.
- Godfrey, T. & West, S. 1996. *Industrial Enzimology*. Stockton Press, New York, 609p.
- Grime, J.P. & Hunt, R. 1975. Relative growth-rate: Its range and adaptive significance in a local flora. *Journal Ecology* 63:393-422.

- Gross, D., Blanchard, P.H. & Bell, D.J. 1954. Neokestose, a trisaccharide formed from sucrose by yeast invertase. *Journal of Chemistry Society* 1727-1730.
- Haridasan, M., Pinheiro, A.A.M.C. & Torres, F.R.R. 1997. Resposta de algumas espécies do estrato rasteiro de um cerrado à calagem e à adubação. IN: *Contribuição ao Conhecimento Ecológico do Cerrado* (L.L. Leite & C.H. Saito, eds), Brasília, pp. 87-91.
- Hellmann, H., Baker, L., Funck, D. Frommer, W.B. 2000. The regulation of assimilate allocation and transport. *Australian Journal of Plant Physiology*. 27:583-594.
- Hendry, G. 1987. The ecological significance of fructan in a contemporary flora. *New Phytologist* 106-201-216.
- Hendry, G.A. & Wallace, R.K. 1993. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. IN: *Science and Technology of Fructans* (M. Suzuk & N. J. Chatterton, eds), CRC Press, Boca Raton, pp. 119-139.
- Hidaka, H. & Hirayama, M. 1991. Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. *Biochemical Society Transactions*. 19:561-565.
- Ho, L.C. 1988. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in relation to sink strength. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 39:355-378.
- Hsiao, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24:519-570.
- Isejima, E.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Zaidan, L.B.P. 1991. Fructan composition in adventitious tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by daylength. *New Phytologist* 119:149-154.
- Itaya, N.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Buckeridge, M.S. 1999. Synthesis of fructans by fructosyltransferase from the tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32:435-442.
- Kandler, O. & Hopf, H. 1980. Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. In: *The Biochemistry of Plants*. IN: *Carbohydrates: Structure and Function* (J. Press, ed.), Vol 3, Academic Press, New York, p.221-270.
- Klein, A.L., Zaidan, L.B.P. & Felipe, G.M. 1996. Interaction between soil and photoperiod on development of *Bidens gardneri* Baker (Asteraceae), a herbaceous species from the Brazilian cerrado. *Revista brasileira de Botânica* 19:1-5.
- Koch, K.E. 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47:509-540.

- Kosaric, N., Cosentino, G.P. & Wieczorek, A. 1984. The Jerusalem artichoke as an agricultural crop. *Biomass* 5:1-36.
- Lambers, J. & Poorter, H. 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in ecological Research* 23:187-261.
- Lambers, J. & Poorter, H. 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in ecological Research* 23:187-261.
- Lambers, J., Chapin, F.S. & Pons, T.L. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, New York, 540p.
- Lewis, D.H. 1984. Occurrence and distribution of storage carbohydrates in vascular plants. IN: *Storage Carbohydrates in Vascular Plants* (D. H. Lewis, eds), Cambridge University Press, Cambridge, p.1-52.
- Mantovani, W. & Martins, F.R. 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 11:101-112.
- Mantovani, W. 1983. Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do cerrado da Reserva Biológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, dissertação de Mestrado.
- Manzoni, M. & Cavazzoni, V. 1992. Hydrolysis of Topinambur (Jerusalem Artichoke) fructans by extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* var *bulgaricus*. *Journal Chemical Technology Biotechnology* 54:311-315.
- Marcelis, L.F.M. 1996. Sing strenght as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. *Journal of Experimental Botany* 47:1281-1291.
- Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd. Edition, Academic Press, Orlando, 649p.
- McGrath, V.B., Blakeney, A.B. & Batten, G.D. 1997. Fructan to nitrogen ratio as an indicator of nutrient stress in wheat crops. *New Phytologist* 136:145-152.
- Méier, H. & Reid, J.S.G. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. IN: *Encyclopedia of Plant Physiology* (F.A. Loweus & W. Tanner, ed.), Vol 13, Springer-Verig, Heldelberg, pp. 416-417.

- Meier, W.J.M., Mathijssen, E.W.J.M. & Borm, G.E.L. 1993. Crop characteristics and inulin production of Jerusalem artichoke and chicory. IN: Inulin and Inulin Containing Crops, Studies in Plant Science (H. Fuchs, ed.), Elsevier, Amsterdam, pp.
- Melo, J.T. 1999. Respostas de espécies arbóreas do cerrado a nutrientes em latossolo vermelho escuro. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, tese de Doutorado.
- 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). Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo 7:33-38.
- Moraes, D.D.A. 1994. Resposta de algumas espécies arbóreas nativas do cerrado à adubação e calagem. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, dissertação de Mestrado.
- Nilsson, U., Öste, R., Jägerstad, M. & Birkhed. 1988. Cereal fructans: *in vitro* and *in vivo* studies on availability in rat and humans. Journal Nutrition 118:1325-1330.
- Oliveira, M.E. 1999. Influência de árvores das espécies nativas *Dipteryx alata* Vog. E *Caryocar brasiliense* Camb. no sistema solo-planta em pastagem de *Brachiaria decumbens* Stapf no cerrado. Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, tese de Doutorado
- Parker, D.R. & Norvell, W.A. 1999. Advances in solution culture methods for plant mineral nutrition research. IN: Advances in Agronomy (D.L. Sparks, ed.), Vol. 65, Academic Press, New York, p.151-213.
- Paulilo, M.T.S. & Felipe, G. 1995. Resposta de plântulas de *Qualea grandiflora* Mart., uma espécie arbórea de cerrado, à adição de nutrientes minerais. Revista brasileira de Botânica 18:109-112.
- 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. & Jones, T. 1979. Seasonal patterns of fructan and metabolism in forage grasses. New Phytologist 83:8-15.
- Pollock, C.J. 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. New Phytologist 104:1-24.
- Pollock, C.J. & Preiss, J. 1980. The citrate-stimulated starch synthase of starch maize kernels: purification and properties. Arch. Biochem. Biophys. 204:578-588.
- Pollock, C.J., Eagles, D.F. & Sims, I.M. 1988. Effect of photoperiod and irradiance changes upon development of freezing tolerance and accumulation of soluble carbohydrates in seedlings of *Lolium temulentum* grown at 2^oC. Annals of Botany 62:95-100.

- Praznik, W. & Beck, R.H.F. 1985. Application of permeation chromatographic systems to the determination of the molecular weight of inulin. *Journal of Chromatography* 348: 187-197.
- Renó, N.B., Siqueira, J.O., Curi, N. & Vale, F.R. 1997. Limitações nutricionais ao crescimento inicial de quatro espécies arbóreas nativas em Latossolo Vermelho-Amarelo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32:17-25.
- Sasaki, R.M. & Felipe, G.M. 1998. Response of *Dalbergia miscolobium* Benth. seedlings, a cerrado tree species, to mineral nutrient supply. *Revista brasileira de Botânica* 21:65-72.
- Scott, R.W. 1968. Transfructosylation in higher plants containing fructose polymers., University of London, London, England, PhD Thesis.
- Shiomi, N. 1981. Two novel hexasaccharides from the roots of *Asparagus officinalis*. *Phytochemistry* 20:2581-2583.
- Shiomi, N. & Izawa, M. 1980. Purification and characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Agricultural Biology Chemistry* 44:603-614.
- Silva, R.F. 1996. Use of inulin as a natural texture modifier. *Cereal Foods World* 41:792-794.
- Smith, D. 1973. The nonstructural carbohydrates. IN: *The Biochemistry of Herbage*. (G. W. Butler & R. W. Bailey, eds.), Vol 2, Academic Press, New York, p.105-155.
- Teixeira, P.G., Carvalho, M.A.M, Zaidan, L.B.P. & Klein, A.L. 1997. Effect of mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 2:89-96.
- Tertuliano, M.F. & Figueiredo-Ribeiro, C.L. 1993. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. *New Phytologist* 123:741-749.
- Thomas, H. & Evans, C. 1989. Effect of divergent selection for osmotic adjustment on water relations and growth of plants of *Lolium perene*. *Annals of Botany* 64:581-587.
- Tomomatsu, H. 1994. Health effects of oligosaccharides. *Food Technology* 48:61-65.
- Tsukinhashi, T., Asami, T., Minasawa, K. & Kubota, M. 1991. Effect of nitrogen and potassium fertilizer on the growth and yield of yacon (*Polysmnia sanchifolia*). *Vocacional Agriculture* 38:50-56.
- Van den Ende, W., De Roover, J. & Van Laerce, A. 1999. Effect of nitrogen concentration on fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 105:2-8.

- Van Laere, A. & Van den Ende, W. 2002. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment* 25:803-813.
- Vieira, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 1993. Fructose-containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. (Amaranthaceae) at different phenological phases. *Plant, Cell and Environment* 16:919-928.
- Vilela, D.M.V. & Haridasan, M. 1994. Response of the ground layer community of a cerrado vegetation in central Brazil to limiting and irrigation. *Plant and Soil* 163:25-31.
- Vijn, I. & Smeekens, S. 1999. Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120:351-359.
- Virgona, J.M. & Barlow, W.E.R. 1991. Drought stress induces changes in non-structural carbohydrate composition of wheat stems. *Australian Journal of Plant Physiology* 18:239-247.
- Wagner, W. & Wiemken, A. 1986. Properties and subcellular localization of fructan hydrolase in the leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel). *Journal of Plant Physiology* 121:429-439.
- 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.
- Wang, C. & Tilberg, J.-E. 1996. Effects of nitrogen deficiency on accumulation of fructan and fructan metabolizing enzyme activities in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* 97:339-345.