**EFEITOS DO NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO E NO METABOLISMO DE
FRUTANOS EM *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY.**

PATRÍCIA GAYA DE CARVALHO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Julho – 2005

**EFEITOS DO NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO E NO METABOLISMO DE
FRUTANOS EM *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY.**

PATRÍCIA GAYA DE CARVALHO

Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. **MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Julho – 2005

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Carvalho, Patrícia Gaya de
Efeitos do nitrogênio e no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.)
Rusby / Patrícia Gaya de Carvalho. - - Piracicaba, 2005.
101 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
Bibliografia.

1. Asteraceae 2. Carboidrato vegetal 3. Compostae 4. Enzima vegetal 5. Metabolismo vegetal 6. Nitrogênio I. Título

CDD 581.19248

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

AQUELE

letra – Bpa Sônia Hernandez
música – Esdras Gallo

Aquele que põe
Fim as minhas guerras
É o mesmo que põe limites no mar
Aquele que faz meu coração acalmar
É o mesmo que faz
A estrela brilhar

Aquele que me dá
Motivo pra viver
É o mesmo que não deixa
O dia e a noite falhar

Aquele em que me apoio
E me dá asas pra voar
Veio viver dentro de mim. Jesus

Jesus, Jesus, Jesus

À Wilma, Arménio e Felipe,
meus amores, minha família,
meu apoio, meu consolo.
Eu amo amá-los.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por fazer de mim sua morada.

À minha família, tão bendita, pelo incentivo, colaboração, amor e respeito.

À minha orientadora Dra. Maria Angela Machado de Carvalho, que com carinho e dedicação me ensinou ética profissional e pesquisa, contribuindo para meu crescimento e amadurecimento.

Ao Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar pelo apoio concedido durante a realização dos experimentos e por me envolver no “mundo” do metabolismo do nitrogênio.

A chefe da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Dra Lilian Beatriz Penteado Zaidan, pela concessão do laboratório e casa de vegetação para a realização dos experimentos e pelas sugestões que aperfeiçoaram esta dissertação.

À minha amiga Patrícia Pinho Tonini, pela fidelidade e companheirismo nestes seis anos. Tenho por você um sentimento de afeição, estima e apreço. Nossa relação é a verdadeira e concreta amizade.

À minha pequena Amanda Francine Asega, pelo companheirismo, carinho e atenção. Você me trouxe a pesquisa e aos frutanos. Em cada momento do meu mestrado você esteve comigo. Sigo seus passos. Não vou abandoná-la.

À companheira de casa, caronas, bancada, ônibus e cursos, Maria Teresa Portes. Percorremos, em paralelo, o mesmo caminho desde a iniciação científica. Aprendi e aprendo muito com você.

À Vanessa Oliveira e Amanda Pereira Souza pelo auxílio na elaboração dos gráficos, tabelas e desenhos e preciosa amizade conquistada neste período. Ressalto você, Vanessa, pela condução do primeiro experimento enquanto eu estava na ESALQ.

Aos pesquisadores que tanto admiro Dra. Marília Gaspar, Dr. Marcos S. Buckeridge, Dra. Márcia Regina Braga, Dra. Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro, Dr. Marco Aurélio Tiné e Dr. Edson Paulo Chu.

Aos docentes de minhas disciplinas cursadas durante o mestrado, destacando o professor Dr. Luiz Ignácio Prochnow, pela paciência em ensinar fertilidade do solo a uma bióloga.

Aos biólogos e sempre amigos, César, Gisele e Elaine Cristina, pelo carinho.

As minhas queridas Claudinha (Sarah), Kelly, Giovanna e Marina, pelo excelente e maravilhoso convívio.

Aos amigos carinhosos Lílian, Henrique, Eduardo, Flávio, Joni e Agustin que sempre proporcionaram um ambiente agradável enquanto estive em Piracicaba. Sinto saudades de nossas constantes conversas e risadas.

Aos colegas da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas: Danilo, Aline, Paola, Mário, Fernanda K., Ludmila, Amanda S., Vanessa R., Márcia Débora, Josimara, Rosana, Clóvis, Fabiano, Ricardo, Felipe, Flávio, Fábio, Denise, Maraba, Marcelo e João.

A todos que me ajudaram a carregar baldes com soluções nutritivas do laboratório para casa de vegetação.

Aos funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas que contribuíram para a realização deste trabalho: Mary (minha querida técnica), Cida, Ana Alice, Sirlei, Da. Helena, Da. Amélia e Seu Luiz.

Ao Dr. Geraldo Cuzzuol, pelo incentivo dado no início do trabalho.

À secretária de Pós-graduação do Departamento de Fisiologia e Bioquímica de Plantas (ESALQ) Maria Solizete Granziol Silva, que sempre foi prestativa esclarecendo minhas dúvidas.

À secretária da Divisão de Biblioteca e Documentação Sílvia Maria Zinsly, pela dedicação, agilidade e bondade na correção desta dissertação.

Ao Departamento de Solos e Nutrição da ESALQ, pela análise de minhas amostras quanto ao nitrogênio total.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (proc. 02/11226-5) e apoio financeiro ao projeto temático (BIOTASP/FAPESP).

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Nitrogênio.....	7
2.1.1 Metabolismo do nitrogênio.....	8
2.2 Frutanos.....	12
2.2.1 Ocorrência e localização.....	12
2.2.2 Papel fisiológico.....	13
2.2.3 Estrutura.....	14
2.2.4 Metabolismo.....	17
2.2.5 Importância econômica.....	18
2.3 <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby.....	19
2.4 Nutrição mineral em plantas.....	22
2.5 Objetivo Geral.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Material vegetal.....	26
3.2 Condições de crescimento e amostragem.....	26
3.2.1 Efeito do nitrato no metabolismo de frutanos e na redutase do nitrato em plantas de <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby.....	26

3.2.2 Efeito de diferentes concentrações de nitrato no crescimento e no metabolismo de frutanos em <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby.....	27
3.2.3 Aspectos do crescimento e atividade da redutase do nitrato em <i>Vernonia herbacea</i> submetidas a diferentes fontes de nitrogênio no solo.....	29
3.3 Extração de carboidratos solúveis.....	30
3.4 Análise quantitativa e qualitativa dos frutanos.....	30
3.5 Extração enzimática.....	31
3.6 Ensaio e determinação enzimática.....	32
3.7 Dosagem de proteína.....	33
3.8 Ensaio da atividade da redutase do nitrato.....	33
3.9 Determinação do teor de nitrato no tecido.....	34
3.10 Determinação do nitrogênio total.....	34
3.11 Análise estatística.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Efeito do nitrato no metabolismo de frutanos e na redutase do nitrato em plantas de <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby.....	36
4.2 Efeito de diferentes concentrações de nitrato no crescimento e no metabolismo de frutanos em <i>Vernonia herbacea</i> (Vell.) Rusby.....	48
4.3 Aspectos do crescimento e atividade da redutase do nitrato em plantas de <i>Vernonia herbacea</i> submetidas a diferentes fontes de nitrogênio.....	71
5 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

EFEITOS DO NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO E NO METABOLISMO DE FRUTANOS EM *Vernonia herbacea* (VELL.) RUSBY.

Autor: PATRÍCIA GAYA DE CARVALHO

Orientadora: Prof. Dra. MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

RESUMO

O nitrogênio é um dos elementos mais limitantes no desenvolvimento de plantas. *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, Asteraceae do cerrado, possui órgãos subterrâneos (rizóforos) que armazenam frutanos do tipo inulina. Estudos anteriores mostraram que o tratamento com solução nutritiva contendo $1,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ (N-limitado) promoveu o acúmulo de frutanos nos rizóforos em detrimento do aumento de biomassa aérea e que o inverso ocorreu com plantas que receberam $10,7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ (N-suficiente). Entretanto, não foram obtidas informações quanto às atividades das enzimas, em plantas sob esses tratamentos. Considerando a importância de estudos de nutrição mineral para a adequação de tratamentos de fertilização visando à produtividade de plantas de interesse econômico e em vista do teor elevado de frutanos em *V. herbacea*, este projeto teve como objetivos analisar o efeito do nitrogênio no crescimento e na alocação da biomassa, bem como no conteúdo e na composição de frutanos, nas atividades das enzimas de síntese (SST e FFT) e

degradação (FEH e INV) de frutanos nos rizóforos e na atividade da redutase do nitrato (RN) e conteúdo de nitrato em folhas de *V. herbacea*. No presente trabalho, plantas de *V. herbacea* tratadas com baixo teor de nitrogênio ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrato) apresentaram atividades de síntese (SST e FFT) superiores às tratadas com teor mais elevado de nitrogênio ($11,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrato), enquanto o inverso, ou seja, atividade elevada de despolimerização (FEH) ocorreu nas plantas que receberam $11,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de nitrato. O conteúdo de frutanos foi maior em plantas sob condições limitantes de nitrogênio, coerente com a maior atividade de síntese encontrada nestas plantas. Entretanto, maiores biomassas aérea e subterrânea foram encontradas nas plantas que receberam $2,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$, não sendo possível afirmar que baixos níveis de nitrato limitaram o seu crescimento. Dessa forma, para melhor compreensão do efeito do nitrato no crescimento, na alocação de biomassa e no metabolismo de frutanos em *V. herbacea*, foi conduzido um novo experimento que teve como objetivos analisar o efeito de diferentes concentrações de nitrato (0, 2,5, 5, 10 e 15 mM de KNO_3) nos mesmos parâmetros analisados no experimento anterior em rizóforos e folhas de *V. herbacea*. Assim foi possível concluir que plantas tratadas com 10 mM apresentaram melhor eficiência no acúmulo total de biomassa e de frutanos nos rizóforos. Neste experimento, também foi demonstrado que plantas de *V. herbacea*, além dos frutanos, acumulam quantidades elevadas de nitrato nos rizóforos, mas assimilam preferencialmente esse mineral nas folhas. Uma vez que as plantas apresentaram maior massa seca aérea e subterrânea quando receberam soluções nutritivas enriquecidas com 10 mM de nitrato, foi realizado outro experimento para verificar a melhor fonte de nitrogênio no cultivo dessa espécie. As plantas foram submetidas ao cultivo com nitrato (KNO_3), amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e a mistura de nitrato e amônio (NH_4NO_3), ambas na concentração de 10 mM, sendo possível verificar que esta

espécie não apresentou preferência pela fonte nitrogenada, e sugerindo que o cultivo pode ser realizado em qualquer uma das fontes nitrogenadas estudadas.

EFFECTS OF NITROGEN IN GROWTH AND FRUCTAN METABOLISM IN *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby

Author: PATRÍCIA GAYA DE CARVALHO

Adviser: Prof. Dra. MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

SUMMARY

Nitrogen is the most limiting element to plant development. *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, Asteracea from the cerrado, bears underground organs (rhizophores) which accumulate inulin-type fructans. Previous studies showed that nutrient solution containing $1.3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ (N-Limited treatment) promoted fructan accumulation in rhizophores and decrease of aerial biomass, while the opposite occurred in plants treated with nutrient solution containing $10.7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ (N-sufficient treatment). However, as the activities of fructan metabolizing enzymes were not measured in these plants, new experiments were designed with this purpose. Thus, considering the importance of studies on mineral nutrition for the adjustment of the fertilization treatment, aiming at high contents of fructan and increase in plant productivity, the aim of this project was to analyse the effect of nitrogen on growth and biomass allocation, on fructan content and composition, on the activity of enzymes involved in fructan

metabolism (SST, FFT, FEH and INV) in rhizophores, as well as on the activity of nitrate reductase (NR) and nitrogen content in leaves and rhizophores of *V. herbacea*. In the present work, plants treated with a low nitrogen concentration ($2.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$) presented higher fructan biosynthetic activities than those treated with higher nitrogen concentration ($11.9 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$). Oppositely, a higher mobilization activity occurred under high nitrogen concentration. Fructan content was higher in plants under low nitrogen concentration, in accordance with the higher biosynthetic activity in this treatment. However, higher aerial and underground biomass were detected in the $2.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_3^-$ plants, indicating that growth was not limited under low levels of nitrate. Therefore, in order to improve the understanding of the effect of nitrate on growth, biomass allocation and fructan metabolism in *V. herbacea*, a new experiment was performed in which different concentrations of nitrate concentration (0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 mM) were supplied in the same conditions mentioned above. The results showed that 10 mM nitrate was the most efficient concentration for total plant biomass and fructan accumulation in the rhizophore. It was also shown that, besides fructan, nitrate is accumulated in the rhizophores, but is preferably assimilated in leaves, where RN activity is higher. Considering results obtained with 10 mM nitrate, a third experiment was done in order to compare the effect of different nitrogen sources on growth of *V. herbacea*. The plants were treated with nutrient solutions containing ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), nitrate (KNO_3) and a mixture of nitrate and ammonium (NH_4NO_3), both at a final concentration of 10 mM. No preference for the nitrogen source was observed when growth parameters were analysed. Therefore, the results suggest that plants of *V. herbacea* can be cultivated under any of the nitrogen sources used in this study.

1 INTRODUÇÃO

Vernonia herbacea, uma Asteraceae perene, nativa do cerrado, com crescimento sazonal, que apresenta órgãos subterrâneos espessados denominados rizóforos. Os rizóforos são responsáveis pela reprodução vegetativa da espécie, além de atuarem como órgãos de reserva para a planta, acumulando até 90% do seu peso seco em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich, 1993).

Os frutanos são polímeros de frutose, formados pela adição de resíduos de frutose à molécula de sacarose. Conforme modelo descrito por Edelman & Jefford (1968) para tubérculos de *Helianthus tuberosus* e confirmado por Koops & Jonker (1996) e Lüscher et al. (1996), para esta mesma espécie e por Van den Ende & Van Laere (1996), para raízes de *Cichorium intybus*, a primeira enzima envolvida na síntese de frutanos é a sacarose: sacarose frutossiltransferase (SST) que catalisa irreversivelmente a formação do trissacarídeo 1-cestose a partir de duas moléculas de sacarose; a outra enzima é a frutano: frutano frutossiltransferase (FFT), responsável pelo alongamento da cadeia de frutanos, que catalisa a transferência reversível de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora.

Ainda segundo este modelo, a mobilização das moléculas de frutanos ocorre pela remoção sequencial dos resíduos terminais de frutose por uma frutano-exohidrolase (FEH). A FEH não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose, sendo a frutose e a sacarose, os principais produtos de sua ação (Edelman & Jefford, 1964).

Uma vez que a sacarose é o dissacarídeo que dá origem aos frutanos, no estudo do metabolismo destes carboidratos, deve-se considerar a enzima invertase (INV) que tem a função de hidrolisar a sacarose e liberar glucose e frutose.

Em *V. herbacea*, Asega & Carvalho (2004) sugeriram que a FFT atua, junto à FEH, na diminuição do tamanho das cadeias de frutanos durante a rebrota induzida pela remoção dos órgãos aéreos, enquanto a SST é inibida devido, possivelmente, à interrupção da translocação de sacarose para os rizóforos.

Os frutanos conferem às plantas maior resistência às condições ambientais adversas, pois além do ajuste osmótico e solubilidade elevada, a sua localização vacuolar permite o armazenamento de grandes quantidades de reserva que podem ser rapidamente disponibilizadas quando necessário (Pollock & Chatterton, 1988). Esta característica os diferenciam do amido, encontrado na forma insolúvel nos plastídeos. Além disso, as enzimas do metabolismo de frutanos são menos sensíveis à inativação por baixas temperaturas do que as enzimas relacionadas ao metabolismo de amido (Van den Ende et al., 2002).

Além de atuarem como compostos de reserva que são em geral acumulados quando a capacidade fotossintética das folhas excede a demanda para o crescimento dos órgãos aéreos e manutenção da planta (Van den Ende et al., 2002), os frutanos parecem desempenhar outras funções mais específicas nas plantas. Alguns dados sugerem uma correlação com a resistência à seca, tolerância ao frio e osmorregulação (Hendry, 1993; Pilon-Smits et al., 1995; 1999; Livingston & Henson, 1998).

Van den Ende et al. (2002) sugeriram que açúcares, hormônios e diferentes tipos de estresse regulam genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos. Dentre esses fatores encontra-se o estresse nutricional provocado pela deficiência de nitrogênio (Wang et al., 2000), temperatura baixa (Prud'home et al.,

1993), iluminação contínua de folhas excisadas (Penson & Cairns, 1994), anóxia (Albrecht et al., 1993), alta concentração de CO₂ (Smart et al., 1994), alta irradiância (Cairns et al. 2000), exposição à seca (De Roover et al., 2000), assim como elevados teores de sacarose, glucose e frutose (Wei et al., 2001) são capazes de induzir genes ligados à biossíntese de frutanos.

Além da sua importância ecológica, os frutanos são de grande interesse econômico, devido às suas propriedades benéficas à saúde (Tomomatsu, 1994) que despertaram a atenção da indústria de alimentos. Esses carboidratos têm sido empregados com sucesso em 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.

Dentre os fatores que regulam o metabolismo de frutanos, o estresse nutricional devido à deficiência de nitrogênio, tem sido muito estudado (Veen & Kleinendorst, 1984; Améziane et al., 1995; Teixeira et al., 1997; Van den Ende et al., 1999; Wang et al., 2000; Morcuende et al., 2004).

O nitrogênio é o elemento que mais limita o crescimento vegetal, e a sua baixa disponibilidade foi associada à redução da divisão e expansão celular, da área foliar e da fotossíntese (Chapin, 1980).

A maioria das espécies vegetais é capaz de absorver e assimilar nitrato, amônio, uréia e aminoácidos como fonte de nitrogênio, mas a preferência pela fonte varia de espécie para espécie (Crawford & Glass, 1998). Entre as fontes minerais de nitrogênio, o nitrato é a mais importante para o crescimento das plantas (Forde, 2000).

A rápida redução do nitrato a nitrito é influenciada por fatores bióticos e abióticos e se deve à sazonalidade e à variação na concentração de nitrato nos solos (Haynes, 1986). Variações sazonais na temperatura e fatores edáficos, portanto, afetam o consumo do nitrato nas plantas (Crawford & Glass, 1998). Na primavera, por exemplo, o nível inicial de nitrato no solo é alto e diminui a partir do momento em que aumenta a absorção de nitrato pela planta (Crawford & Glass, 1998).

O processo de assimilação do nitrato compreende a sua redução a nitrito pela enzima redutase do nitrato (RN) (Crawford, 1995) ou o seu armazenamento nos vacúolos para posterior utilização, já que este não causa efeitos prejudiciais nos tecidos vegetais (Lea et al., 1992). Logo após sua redução, o nitrito é transferido para os cloroplastos, ou plastídeos nas raízes e reduzido a amônio pela redutase do nitrito (Tischner, 2000).

Entre os fatores que regulam a RN nas plantas estão o nitrato, a luz, os carboidratos, que atuam em nível de transcrição e tradução (Taiz & Zeiger, 2004) e por uma modulação pós-traducional (Kaiser & Huber, 2001).

O amônio derivado da absorção da raiz ou produzido por assimilação do nitrato ou da fotorrespiração é convertido a glutamina e glutamato pelas ações sequenciais da glutamina sintetase e glutamato sintase, que estão localizadas no citosol e nos plastídeos das raízes ou dos cloroplastos (Bloom et al., 1992; Becker et al., 1993).

Uma das razões da importância do nitrogênio reduzido no metabolismo vegetal é a partição de amônio na rota primária de síntese de compostos orgânicos importantes (Grey et al., 1987). O nitrogênio é, algumas vezes, absorvido pelas plantas na forma orgânica, mas geralmente é suplementado na forma de íons nitrato e amônio.

Os íons amônio e nitrato gerados pela fixação ou liberados por decomposição da matéria orgânica do solo, tornam-se objetos de intensa competição entre plantas e

microorganismos (Havlin et al., 1999). Para permanecerem competitivos, os vegetais desenvolveram mecanismos para capturar rapidamente esses íons a partir da solução do solo.

Sob as concentrações elevadas no solo, que ocorrem após a fertilização com nitrogênio, a absorção do amônio e do nitrato pelas raízes pode exceder a capacidade de uma planta em assimilar esses íons, levando ao acúmulo no caso do nitrato, pois amônia é tóxica e não pode ser acumulada. As plantas podem acumular altos níveis de nitrato no vacúolo para posterior utilização ou podem translocá-lo através dos tecidos sem efeitos prejudiciais, enquanto altos níveis de amônio são tóxicos para as plantas (Lea et al., 1992). A maior parte do amônio na planta deve ser incorporada em nitrogênio orgânico já na raiz, pois não pode permanecer livre na célula e tecidos, uma vez que a amônia, resultante da reação do amônio com o OH^- da água, é tóxica mesmo em baixas concentrações, causa desagregação dos processos de fosforilação, tornando permeáveis as membranas mitocondriais, cloroplásticas e vacuolares (Pimentel, 1998; Taiz & Zeiger 2004).

Na planta, a eficiência de utilização do nitrogênio é determinada por algumas variáveis: absorção de nitrato ou amônio, atividade da RN, estoque de nitrato, habilidade de mobilizar e translocar nitrogênio para os órgãos dreno, e adaptação à baixa disponibilidade de nitrogênio no meio (Duncan & Baligar, 1991).

Estudos de nutrição mineral em plantas nativas do cerrado foram realizados principalmente com plantas arbóreas (Felippe & Dale, 1990; Paulilo & Felippe, 1995; Sassaki & Felippe, 1998). Alguns trabalhos foram realizados com *V. herbacea*, com enfoque na modelação da força do dreno em plantas submetidas a diferentes tratamentos nutricionais. Esses trabalhos mostraram que plantas cultivadas em casa de vegetação e tratadas com solução nutritiva de Hoagland, em substrato arenoso,

apresentaram maior crescimento dos órgãos aéreos (Teixeira et al., 1997). Já Carvalho et al. (1998) verificaram que, em condições de campo, a fertilização mineral não alterou a biomassa aérea e subterrânea das plantas. Entretanto, Cuzzuol et al. (2003), observaram que plantas cultivadas em solo submetidos à aplicação de 24 kg N. ha⁻¹ acumularam 6,0 g de frutanos por planta após um ano de cultivo, enquanto as plantas controle armazenaram apenas 3,5 g. Esse tratamento mostrou-se mais eficiente ao aplicado anteriormente (Carvalho et al., 1998), uma vez que nesse último, plantas com um ano de idade acumularam apenas 1,9 g de frutanos por planta. Experimentos realizados por Cuzzuol (2003) em casa de vegetação indicaram que tratamento com solução nutritiva contendo doses baixas de nitrogênio resultou em um aumento na concentração de frutanos em detrimento do aumento da biomassa aérea e que o inverso ocorreu em plantas que receberam doses mais elevadas de nitrogênio.

Embora vários trabalhos realizados anteriormente visaram ao efeito do nitrogênio e da adubação nitrogenada no crescimento, na alocação de biomassa e na produção de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea*, informações quanto às atividades das enzimas do metabolismo de frutanos em plantas sob esses tratamentos não haviam sido obtidas até o a realização do presente trabalho. Os resultados obtidos permitirão melhor compreender a relação entre crescimento, alocação de biomassa e metabolismo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As plantas devem obter do ambiente os materiais brutos específicos para as complexas reações bioquímicas necessárias à manutenção de suas células e ao seu crescimento. Além da luz, as plantas necessitam de água e de certos elementos químicos para o metabolismo e o crescimento (Raven et al., 1996).

Apenas certos elementos minerais foram considerados essenciais para o crescimento vegetal. Um elemento essencial é definido como aquele cuja ausência impede uma planta de completar seu ciclo de vida (Arnon & Stout, 1939) ou aquele que tem um papel fisiológico definido (Epstein, 1999).

2.1 Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um elemento fundamental no metabolismo das plantas, pois é utilizado na síntese de proteínas e outros compostos orgânicos (Pereira et al., 1981). Além disso, sua ausência 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).

Embora pequena quantidade possa estar presente na forma inorgânica, o N, quando absorvido na forma inorgânica oxidada (NO_3^-), deve ser reduzido para ser incorporado a compostos orgânicos e, então, exercer suas funções metabólicas.

Quando absorvido na forma reduzida (NH_4^+), pode ser incorporado diretamente nos compostos orgânicos. O N no interior das plantas encontra-se combinado ao carbono, hidrogênio e oxigênio e, algumas vezes, ao enxofre, como constituinte de aminoácidos, enzimas, ácidos nucleicos, clorofila, alcalóides e outros.

A concentração de N nas plantas cultivadas varia de 10 g.kg^{-1} a 50 g.kg^{-1} de matéria seca (Raij, 1991). O sintoma característico da deficiência de N é a clorose generalizada. Inicia-se pelas folhas mais velhas como resultado da alta mobilidade deste nutriente (Taiz & Zeiger, 2004). Essa alta mobilidade se deve ao fato das proteínas, compostos que estão em constante síntese e degradação, liberarem compostos nitrogenados permeáveis no floema, conferindo ao N ótima redistribuição.

O N é absorvido pelas plantas nas formas de amônio (NH_4^+) e/ou de nitrato (NO_3^-), sendo este último preferencial para grande parte das culturas (Crawford, 1995). A absorção de NO_3^- estimula a absorção de cátions, enquanto a absorção de NH_4^+ pode restringir a absorção de cátions, como por exemplo, o Ca^{2+} (Havlin et al., 1999).

2.1.1 Metabolismo do nitrogênio

As plantas assimilam a maioria do nitrato absorvido por suas raízes em compostos orgânicos nitrogenados (Oaks, 1994), como segue:

A primeira parte do processo consiste na redução do nitrato a nitrito, no citoplasma, pela enzima redutase do nitrato (RN) (Tischiner, 2000), conforme a seguinte reação:

onde NAD(P)H indica NADH ou NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida). A forma mais comum da RN utiliza somente o NADH como doador de elétrons. Outra forma da enzima, encontrada predominantemente em tecidos não-clorofilados, como raízes, pode usar tanto o NADH quanto o NADPH (Warner & Kleinhofs, 1992).

As RNs das plantas superiores são constituídas de três subunidades idênticas, com três grupos prostéticos cada: a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), o grupo heme e o complexo molibdênio.

O NADH liga-se ao FAD de cada subunidade e inicia a transferência de dois elétrons a partir do grupo carboxila terminal (C) até o grupo amino terminal (N). Os elétrons atravessam o grupo heme e chegam ao complexo molibdênio, onde ocorre a redução do nitrato a nitrito, como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 – Modelo dímero da redutase do nitrato indicando os três domínios de ligação, dos quais as seqüências de polipeptídeos são similares nos eucariontes (Taiz & Zeiger, 2004)

Entre os fatores que regulam a RN nas plantas estão o nitrato, a luz, os carboidratos, que atuam em nível de transcrição e tradução (Taiz & Zeiger, 2004) e recentemente, conforme verificado por Kaiser & Huber (2001), por uma modulação pós-traducional (Figura 2).

A atuação da luz e dos carboidratos se dá pela estimulação da proteína fosfatase, que desfosforila vários resíduos de serina da proteína RN, promovendo a sua ativação.

O nitrito é um íon altamente reativo e potencialmente tóxico (Taiz & Zeiger, 2004). As células vegetais transportam rapidamente o nitrito que foi originado pela redução do nitrato do citosol para o interior dos cloroplastos das folhas e nos plastídeos nas raízes. Nessas organelas, a enzima nitrito redutase reduz o nitrito a amônio.

O amônio derivado da absorção pela raiz, ou produzido por assimilação do nitrato ou da fotorrespiração, é convertido a glutamina e glutamato pelas ações sequenciais da glutamina sintetase e glutamato sintase, que estão localizadas no citosol e nos plastídeos das raízes ou dos cloroplastos.

Uma vez assimilado em glutamina ou glutamato, o nitrogênio pode ser transferido para muitos outros compostos orgânicos através de diversas reações, incluindo as de transaminação. A interconversão entre a glutamina e a asparagina sintase equilibra o metabolismo do carbono e do nitrogênio em uma planta (Coruzzi & Bush, 2001).

Figura 2 – Modelo da regulação pós-traducional da redutase do nitrato. A enzima consiste em três domínios funcionais e estruturais diferentes sendo dois ativos (um livre e outro que sofre fosforilação) e um inativo, ligadas dependentemente por duas regiões (em cinza) (Kaiser & Huber, 2001)

2.2 Frutanos

2.2.1 Ocorrência e localização

Os frutanos são reconhecidos como uma classe de compostos há aproximadamente 200 anos. Depois do amido e da sacarose são os carboidratos mais amplamente distribuídos entre os vegetais superiores (Hendry & Wallace, 1993), ocorrendo em cerca de 15% da flora contemporânea, especialmente em espécies de ordens mais evoluídas. Entre as monocotiledôneas, os frutanos são encontrados principalmente em Liliales e Poales, sendo que nesta última sua ocorrência é restrita a espécies de regiões de clima temperado e, entre as dicotiledôneas, são encontrados em Asterales, Campanulales e Lamiales (Meier & Reid, 1982; Lewis, 1984; Hendry & Wallace, 1993). São também encontrados em briófitas (Sulliman et al., 1979), fungos, bactérias e algas (Lewis, 1984).

Os frutanos são acumulados principalmente em órgãos subterrâneos de reserva como raízes tuberosas, rizóforos, rizomas, tubérculos e bulbos, mas também são armazenados em menores quantidades, em caules, folhas, inflorescência, frutos e sementes, especialmente em Poaceae (Meier & Reid, 1982).

Com relação à localização celular, Frehner et al. (1984) demonstraram, com células isoladas e fragmentadas de tubérculos de *Helianthus tuberosus*, que os frutanos e as enzimas relacionadas em seu metabolismo estão localizadas no vacúolo, embora sua presença e a da enzima de despolimerização dos frutanos (FEH) tenham sido detectados também no fluído apoplástico (Livingston & Henson, 1998).

Em espécies de Asteraceae, os frutanos encontram-se distribuídos no parênquima de reserva, ou concentrados no parênquima do xilema secundário,

conforme demonstrado por Isejima et al. (1991) e Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro (1993).

Variações sazonais no conteúdo de frutanos foram relatadas para diversas espécies, incluindo *Helianthus tuberosus* (Bacon & Loxley, 1952), *Cichorium intybus* (Bhatia et al., 1974) e forrageiras e cereais de regiões temperadas (Pollock & Cairns, 1991) e para espécies tropicais do cerrado, como *Viguiera discolor* (Isegima & Figueiredo-Ribeiro, 1993), *Gomphrena macrocephala* (Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993) e *Vernonia herbacea* (Carvalho & Dietrich, 1993).

O tamanho médio das moléculas de frutanos varia de acordo com a espécie, mas permanece constante em cada espécie. Condições ambientais e o ciclo fenológico podem também influenciar no tamanho das moléculas, à medida que estes fatores interferem no acúmulo ou na utilização dos frutanos (Pollock & Chatterton, 1988). Isso pode ser comprovado em Carvalho & Dietrich (1993) que demonstraram que ocorrem variações nas concentrações e no tamanho médio das moléculas de frutanos nas diferentes fases do seu ciclo fenológico.

Em relação à variação na concentração de frutanos, foi reportado que esta aumenta em condições de anoxia (Albrecht et al., 1993), alta concentração de dióxido de carbono (Smart et al., 1994) e iluminação contínua de folhas excisadas (Penson & Cairns, 1994), entre outras.

2.2.2 Papel fisiológico

Os frutanos atuam como compostos de reserva e são sintetizados e armazenados quando o suprimento de carbono da fotossíntese excede a demanda. Além do conhecido papel dos frutanos como carboidrato de reserva, a síntese desses

polímeros pode controlar a concentração de sacarose no vacúolo, reduzindo seus níveis na célula e impedindo a retroinibição da fotossíntese (Pollock, 1986).

Outra função dos frutanos está relacionada à regulação osmótica na célula e mecanismos de resistência das plantas à seca e ao frio (Hendry, 1993; Pilon - Smits et al., 1995, 1999; Livingston & Henson, 1998). Esta função parece estar relacionada à estabilização de membranas celulares (Hinch et al., 2000; Vereyken et al., 2003).

O envolvimento dos frutanos na resistência a estresses ambientais tem sido estudado por vários autores. Entretanto esses estudos são complexos, o que dificulta mostrar uma correlação direta entre um fator ambiental específico e o acúmulo de frutanos (Vinj & Smeekens, 1999).

2.2.3 Estrutura

Os frutanos consistem de séries homólogas de oligo- e polissacarídeos não redutores, onde cada membro da série contém um resíduo a mais de frutose do que o membro anterior (Edelman & Jefford, 1968). Esses polímeros de D-frutose são relacionados estrutural e metabolicamente com a sacarose (Edelman & Jefford, 1968, Pollock et al., 1996) e carregam um resíduo de D-glucose geralmente localizado na extremidade da cadeia, unido por uma ligação do tipo α -1,2 como na sacarose (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro, 2001).

Os frutanos podem ser classificados em três séries principais, de acordo com os diferentes padrões de ligação e com o trissacarídeo que dá origem à série. São eles a 1-cestose ou 1-cestotriose (1-F-frutossil sacarose, α -glu-1,2-fru- β -1,2-fru), o trissacarídeo mais amplamente distribuído entre as espécies que acumulam frutanos, com o resíduo terminal de frutose ligado ao carbono 1 da frutose da sacarose; a 6-

cestose, que apresenta o resíduo terminal de frutose ligado ao carbono 6 da frutose, formando o α -glu-1,2- β -fru-6,2-fru; e a neocestose ou 6-G-cestotriose (6-G-frutosilsacarose), que apresenta dois resíduos de frutose ligados à glucose (β -fru-2,6- α -glu-1,2-fru) (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro, 2001).

Cinco classes estruturais de frutanos foram identificadas (Pollock et al., 1996): frutano do tipo inulina, baseado no trissacarídeo 1-cestose, com ligações do tipo β -2,1, entre os resíduos de frutose e GP médio de aproximadamente 35, encontrado principalmente em Asterales; frutano do tipo levano, baseado no trissacarídeo 6-cestose, com ligações do tipo β -2,6 entre os resíduos de frutose e GP médio de 250, encontrado em Poales; frutanos com ligações mistas e ramificados, com glucose na extremidade da cadeia, como na molécula de bifurcose, também encontrados em Poales; frutanos baseados em neocestose, com ligações β -2,1 entre os resíduos de frutose, encontrado em Liliales; e frutanos baseados em neocestose, com ligações β -2,6 entre os resíduos de frutose, encontrados em alguns membros de Poales (Figura 3).

Figura 3 - Cinco classes estruturais de frutanos, segundo Carpita et al. (1991) e Livingston et al. (1993)

2.2.4 Metabolismo

Conforme modelo descrito por Edelman & Jefford (1968) para tubérculos de *Helianthus tuberosus*, a síntese de frutanos envolve a participação de duas enzimas, a sacarose: sacarose frutossil transferase (SST) e a frutano: frutano frutossil transferase (FFT). A SST catalisa a formação de 1-cestose, trissacarídeo da série homóloga, de forma irreversível, a partir de duas moléculas de sacarose, conforme mostrado abaixo:

A FFT catalisa de forma reversível a transferência de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora, conforme mostrado a seguir:

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

Ainda, conforme modelo proposto, a despolimerização dos frutanos se dá pela remoção seqüencial de resíduos terminais de frutose através da reação catalisada por uma β - frutofuranosidase, conhecida como frutano-exohidrolase (FEH).

A FEH catalisa de forma irreversível a despolimerização das cadeias de frutanos, liberando frutose.

Esse modelo de síntese foi confirmado por Koops & Jonker (1996) e Lüscher et al. (1996), em tubérculos de *H. tuberosus* e por Van den Ende & Van Laere (1996) em raízes de *Cichorium intybus*. Esses autores mostraram que a incubação das enzimas 1-SST e 1-FFT purificadas com sacarose levou a síntese *in vitro* de frutanos normalmente encontrados *in vivo* nessas plantas.

2.2.5 Importância econômica

Os frutanos apresentam grande importância econômica, devido às propriedades benéficas à saúde (Tomomatsu, 1994) que despertaram a atenção da indústria mundial de alimentos, devido às suas propriedades semelhantes às fibras dietéticas (Gibson et al., 1994).

Na forma de frutose livre, produzida a partir da hidrólise de frutanos, possuem papel de adoçante não calórico e dietético (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro, 2001). Na forma de fruto-oligossacarídeos (FOS), promovem inúmeros benefícios à saúde humana. Os FOS não são digeridos pelo organismo humano, sendo considerados alimentos funcionais. Estes sofrem processo de fermentação no intestino por bifidobactérias, cujo crescimento é então estimulado (Incoll & Bonnet, 1996). Os ácidos graxos de cadeias curtas, liberados durante a fermentação por estas bactérias, ao serem absorvidos pelo intestino, entram na circulação sanguínea, diminuem a glicemia, o conteúdo de triglicérides e o colesterol (Roberfroid et al., 1993) e aumentam o

volume fecal (Spiegel et al., 1994). Além disso, os FOS também estimulam a absorção de cálcio e, portanto, atuam no controle da osteoporose, e a absorção de magnésio e ferro no cólon (Roberfroid et al., 1995; Coussement & Franck, 1998).

Na forma de inulina não hidrolisada, os frutanos vêm sendo empregados pela indústria alimentícia como aditivo, devido ao gosto suave e a alta solubilidade sob aquecimento (Dysseler & Hoffem, 1995).

Além disso, na indústria farmacêutica, em testes de função renal, é considerada substância ideal para a determinação do ritmo de filtração glomerular (Aires, 1991). Estudos realizados por Dias-Tagliacozzo et al. (1996), demonstraram o potencial de aplicação da inulina extraída de *V. herbacea* para a determinação do ritmo de filtração glomerular em pacientes nefropatas e em estudos de fisiologia renal.

2.3 *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby.

Cerca de 50% da vegetação herbácea do cerrado possui órgãos subterrâneos espessados (Mantovani, 1983). Dentre as famílias predominantes no cerrado da região da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, destaca-se a família Asteraceae, com 89 espécies, correspondendo a 17% da flora da região (Mantovani & Martins, 1988). Estudos realizados com espécies herbáceas da família Asteraceae nessa mesma região de cerrado reportaram a ocorrência de frutanos em órgãos subterrâneos de aproximadamente 60% delas (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Dentre essas espécies encontra-se *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Figura 4), perene, com órgãos subterrâneos de reserva, os rizóforos, que armazenam até 90% da sua massa seca em de frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich, 1993).

O rizóforo é bastante ramificado e apresenta crescimento geotrópico positivo. Possui muitas gemas laterais que podem dar origem a novas ramificações subterrâneas ou a ramos aéreos (Carvalho & Dietrich, 1993).

Os rizóforos, conforme relatado por Kissmann & Groth (1992) para o gênero *Vernonia*, são estruturas singulares que possuem área entumescida com parênquima cortical apresentando grandes espaços intercelulares que armazenam água. Isso permite melhor adaptação em solos arenosos, que não retém água, bem como a sobrevivência das plantas em períodos de baixa precipitação.

Plantas de *V. herbacea* apresentam crescimento sazonal com um ciclo fenológico caracterizado por um período de dormência durante o inverno, quando os órgãos aéreos desaparecem. Nesta fase, o conteúdo de frutanos nos rizóforos aumenta, possivelmente, devido à translocação de carboidratos dos órgãos aéreos. Na primavera ocorre a brotação, seguida da floração, período em que há diminuição no conteúdo de frutanos, sugerindo sua mobilização para suprir a demanda de carbono para o crescimento dos órgãos aéreos. Após a floração e ao final do verão, verifica-se uma elevação nos teores de frutanos, indicando que este período é caracterizado predominantemente pela síntese de frutanos (Carvalho & Dietrich, 1993).

Figura 4 – Planta adulta de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby com rizóforos desenvolvidos

2.4 Nutrição mineral em plantas

O solo é o substrato natural do qual a planta extrai os nutrientes necessários ao seu crescimento. Atualmente, num sistema de produção contínua de bens agrícolas, a demanda por recursos para o aperfeiçoamento da agricultura é elevada. Dessa forma, o solo como substrato há muito deixou de fornecer, naturalmente e a contento, todos os nutrientes necessários ao crescimento das plantas. A constante e intensa exploração do solo esgotou suas reservas nutricionais prontamente disponíveis e criou desequilíbrios que necessitam ser restabelecidos pela adubação e/ou aplicação de corretivos, como o calcário. Além disso, vários outros processos produtivos foram criados para cultivar plantas em substratos que não o solo, assegurando altas produções mesmo sob condições climáticas desfavoráveis.

Nesse contexto, o termo nutrição implica em nutriente, que é um elemento considerado essencial para o crescimento e produção da biomassa da planta, não podendo ser substituído por nenhum outro (Malavolta et al., 1997). Os nutrientes considerados essenciais e que são obtidos pela planta diretamente do substrato que a sustenta, são classificados em macronutrientes e micronutrientes.

Carbono, hidrogênio e oxigênio são elementos necessários para a constituição de estruturas importantes, bem como para a formação de compostos como carboidratos, ácidos orgânicos, aminoácidos, ceras, ligninas, taninos e outros. Esses elementos são absorvidos diretamente do ar na forma de gases ou dissolvidos na água ou, ainda, obtidos da dissociação da água na planta.

De acordo com a classificação de Marschner (1995), os macronutrientes são representados por N (nitrogênio), P (fósforo), K (potássio), Ca (cálcio), Mg (magnésio) e S (enxofre). Há ainda um outro grupo considerado de elementos “benéficos”, não classificados como essenciais para todas as plantas, mas necessário no

desenvolvimento de algumas culturas ou apenas como estimuladores do crescimento: Si (silício), Co (cobalto), I (iodo), V (vanádio) e Ni (níquel).

Conforme Marschner (1995), essa listagem tende a aumentar, considerando o avanço na tecnologia de detecção, bem como a possibilidade de utilização de produtos cada vez mais puros quimicamente quando da investigação da essencialidade.

Os nutrientes fazem parte de uma série de fatores que atuam sobre o crescimento das plantas juntamente com a luz, temperatura, ar, água, manejo, propriedades e características do solo, embora o crescimento seja, primeiramente, determinado geneticamente. A função de cada nutriente essencial é tanto mais plena quanto mais harmoniosa for sua interação com os demais fatores do meio.

A vegetação do cerrado apresenta características específicas como crescimento limitado, troncos retorcidos, maior alocação de carbono para raízes e elevada razão C:N, sendo apontadas como principais causas destas características, a baixa fertilidade, toxicidade de alumínio e deficiência hídrica do solo (Felippe & Dale, 1990; Paulilo & Felippe, 1995; Haridassan et al., 1997; Sassaki & 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.

Entretanto, o aumento da disponibilidade de nutrientes no solo promoveu uma maior absorção pela maioria das plantas de cerrado estudadas (Moraes, 1994; Haridassan et al., 1997), maior alocação de biomassa para os órgãos aéreos e, conseqüentemente, aumento da razão parte aérea:raiz, quando adubada com nitrogênio (Reno et al., 1997; Mello, 1999).

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 de absorção inferior à das espécies de ambientes mais férteis (Marschner, 1995). Desse modo, apesar de bem adaptadas a solos pobres em nutrientes, as espécies nativas apresentam baixo crescimento e baixa razão parte aérea:raiz mesmo sob maior disponibilidade de nutrientes (Chapin, 1980; 1988). Respostas semelhantes de crescimento e razão parte aérea:raiz também foram encontrados para espécies de cerrado (Paulilo & Felipe, 1995).

O comportamento nutricional é estudado com enfoque 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. Portanto, estudos que integrem essas informações são necessários para melhor compreensão dos mecanismos de adaptação quando determinado nutriente é fornecido diferencialmente, em especial nas plantas nativas, embora essas pareçam ser similares no comportamento nutricional ao descrito para cultivares agrícolas (Cuzzuol, 2003).

Com relação às plantas acumuladoras de frutanos, a baixa concentração de nitrato causou aumento no conteúdo de carboidratos em raízes tuberosas de *Cichorium intybus* (Van den Ende et al., 1999) e em tecidos dreno e fonte de *Hordeum vulgare* (Wang & Tilberg, 1996, 1997). Sob essa condição de estresse nutricional, Améziane et al. (1997a) também verificaram aumento na força de dreno em *C. intybus*. Morcuende et al. (2004) demonstraram que o nitrato é um sinal negativo para as atividades de síntese de frutanos em folhas de *Hordeum vulgare* (cevada); de alguma forma, o nitrato inibiria a expressão da sacarose, impedindo, assim, a indução da síntese de frutanos. Entretanto, poucos trabalhos sobre nutrição mineral e carboidratos em espécies nativas do cerrado foram realizados com arbóreas e em menor número ainda, com herbáceas.

2.5 Objetivo geral

Em vista da importância econômica dos frutanos, do papel ecofisiológico e da ampla ocorrência destes carboidratos na flora do cerrado, o objetivo deste trabalho foi analisar, em plantas de *V.herbacea*, o efeito do nitrogênio no crescimento e na alocação de biomassa e no metabolismo de frutanos e de nitrogênio, visando ao aproveitamento dessa espécie na produção de inulina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae), obtidas por propagação vegetativa a partir de fragmentos de rizóforos de plantas, coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, São Paulo. Foram selecionadas plantas com cerca de 5 cm de altura, aproximadamente 3 meses após a brotação dos rizóforos cultivados em bandejas com areia lavada. As plantas foram transferidas para vasos plásticos (3 L) contendo areia lavada ou quartzo umedecido com água destilada como substrato e submetidas às condições de temperatura e fotoperíodo naturais, em casa de vegetação.

3.2 Condições de crescimento e amostragem

3.2.1 Efeito do nitrato no metabolismo de frutanos e na redutase do nitrato

Conforme a análise da constituição química de plantas de *V. herbacea*, 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 suas exigências nutricionais foliares. Esta solução, contendo 11,9 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ e composta de 2,5 mmol L⁻¹ Ca(NO₃)₂.4H₂O, 2,3 mmol L⁻¹ KNO₃, 0,52 mmol L⁻¹ KH₂PO₄, 1,7 mmol L⁻¹ Mg(NO₃)₂.6H₂O, 0,6 mmol L⁻¹ NH₄NO₃ e 1,3 mmol L⁻¹ Na₂SO₄, foi aplicada em um lote

de plantas que constituiu o tratamento N-suficiente. Outra solução, contendo 2,5 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ e composta de 1,3 mmol L⁻¹ KNO₃, 5,2 mmol L⁻¹ KH₂PO₄, 0,9 mmol L⁻¹ KCl, 1,5 mmol L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 0,6 mmol L⁻¹ NH₄NO₃ e 2,17 mmol L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, foi aplicada em outro lote de plantas e constituiu o tratamento N-limitado. Ambas foram suplementadas com os sais de micronutrientes da solução de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) e o pH foi ajustado para 6,0 - 6,5 com KOH 1 N. As plantas receberam semanalmente 100 mL de solução nutritiva e, quando necessário, foram regadas com água destilada para evitar o dessecamento.

Foram realizadas quatro coletas durante o período experimental. A primeira, em agosto de 2003, imediatamente antes da transferência das plantas para vasos individuais e do início dos tratamentos. As outras coletas foram realizadas nos meses de dezembro, fevereiro e maio, ou seja, quatro, seis e nove meses, após o início dos tratamentos.

Os ramos aéreos e rizóforos de três plantas em cada ponto de amostragem foram submetidos, separadamente, a medidas de massa de matéria fresca e altura do caule e contagem do número de folhas. Logo após, os ramos aéreos foram levados à estufa a 60 °C até massa constante, para determinação da massa de matéria seca. Amostras de rizóforos foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas para obtenção da matéria seca e posterior extração de carboidratos solúveis.

3.2.2 Efeito de diferentes concentrações de nitrato no crescimento e no metabolismo de frutanos

As plantas foram separadas em 5 lotes, com 34 plantas cada, e receberam semanalmente 150 ml de solução nutritiva com diferentes concentrações de nitrato. O primeiro lote, denominado controle, recebeu uma solução sem nitrato contendo: 0,5

mmol·L⁻¹ K₂HPO₄, 1,3 mmol·L⁻¹ NaSO₄, 2,3 mmol·L⁻¹ KCL, 2,5 mmol·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O e 1,7 mmol·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O. Os demais lotes receberam a mesma solução controle com adição de 2,5, 5,0, 10 e 15 mM de KNO₃, respectivamente. Todos os tratamentos foram suplementados com os sais de micronutrientes da solução de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) e o pH ajustado para 6,0 - 6,5 com KOH 1N. Quando necessário, as plantas foram regadas com água destilada para evitar o dessecamento.

A primeira coleta foi realizada em janeiro de 2004, quando as plantas foram transferidas das bandejas para vasos individuais e passaram a receber as soluções nutritivas. As coletas seguintes foram realizadas aproximadamente a cada 2 meses, em março, junho, agosto e novembro, ou seja, período que incluiu as fases de crescimento vegetativo, senescência, rebrota e novo crescimento vegetativo.

Três plantas de cada tratamento foram coletadas aleatoriamente e analisadas quanto à altura do caule, número de folhas, área foliar e massa de matéria fresca aérea e subterrânea. Os ramos aéreos foram levados à estufa a 60 °C até peso constante, para determinação da massa de matéria seca. Amostras de rizóforos foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas para obtenção da massa de matéria seca. Em seguida foram utilizadas para extração de carboidratos solúveis.

A área foliar foi estimada pela equação da curva de regressão linear ($y = 0,2737 + 0,7158x$), onde x equivale ao produto do comprimento pela largura, com um coeficiente de correlação de 0,9658, previamente determinado para a espécie estudada (Carvalho et al., 1997).

Os parâmetros derivados de crescimento, taxa de crescimento relativo (TCR), razão de área foliar (RAF) e taxa de assimilação líquida (TAL) foram calculados de acordo com Hunt (1982) e utilizando uma ferramenta de software conforme Hunt et al. (2002). A TCR mostra o incremento de produção de massa de matéria seca em

determinado tempo, a TAL expressa a eficiência fotossintética em termos de incremento de massa de matéria seca total produzida por área foliar e por unidade de tempo e a RAF mostra a área foliar utilizada para produzir uma unidade de massa de matéria seca total.

3.2.3 Diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na atividade da redutase do nitrato

As plantas foram separadas em 3 lotes, com 38 plantas cada, e receberam semanalmente, 150ml de solução nutritiva contendo $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $1,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaSO}_4$, $2,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KCL}$, $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $1,7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O primeiro lote foi enriquecido com 10 mM de KNO_3 , o segundo, com 5mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e o terceiro lote, com 5 mM de NH_4NO_3 . Todos os tratamentos foram suplementados com os sais de micronutrientes da solução de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) e o pH ajustado para 6,0 - 6,5 com KOH 1 N. Quando necessário, as plantas foram regadas com água destilada para evitar o dessecamento.

A primeira coleta de dados (T0) foi realizada em setembro, quando as plantas foram transferidas das bandejas para vasos individuais e passaram a receber as soluções nutritivas. As coletas seguintes foram realizadas mensalmente, aos 30 (outubro), 60 (novembro), 90 (dezembro) e 120 (janeiro) dias. A análise de crescimento, quantificação de nitrato e determinação da atividade da redutase do nitrato foram realizadas em 6 plantas, coletadas aleatoriamente, constituindo cada uma, uma replicata. As plantas foram analisadas quanto à altura do caule, número de folhas, área foliar e massa de matéria fresca e seca aérea e subterrânea. Para determinação da massa de matéria seca, os ramos aéreos e amostras de rizóforos foram levados à estufa a 60°C até massa constante.

A área foliar e os parâmetros derivados de crescimento (TCR, RAF e TAL) foram determinados conforme mencionado no item anterior (3.2.2). A força de dreno aparente, que mede a capacidade potencial do órgão de atrair e armazenar fotoassimilados, foi calculada em função da taxa de incremento de massa seca dos rizóforos (massa final dos rizóforos – massa inicial dos rizóforos) / (t₂ – t₁), conforme Shuebert & Fuerle (1997).

3.3 Extração de carboidratos solúveis

As amostras liofilizadas de rizóforos, equivalentes a 1 g de massa fresca, foram homogeneizadas em etanol 80 % e os homogeneizados, mantidos em banho-maria a 80 °C e centrifugados por 15 minutos a 1.082 *g* em temperatura ambiente. Os precipitados foram re-extraídos duas vezes com etanol, a 80 °C. Os resíduos finais foram extraídos em água em banho-maria a 60 °C por duas vezes e filtrados a vácuo. Os sobrenadantes e filtrados foram reunidos, concentrados em evaporador rotatório, e o extrato final foi submetido à precipitação a frio com três volumes de etanol, para separação das frações de fruto-oligo- e -polissacarídeos, conforme Carvalho et al. (1998). As extrações foram feitas em triplicata.

3.4 Análises quantitativa e qualitativa dos frutanos

Os conteúdos de frutose livre e ligada foram determinados nas frações de, separadamente, pelo método de antrona modificado por Jermyn (1956) para quantificação de cetoses, utilizando-se frutose (Sigma) (200 µg mL⁻¹) como padrão. Amostras de extratos contendo os fruto-oligo- e fruto-polissacarídeos (frutano total), constituídas da reunião de alíquotas equivalentes das três repetições, foram

deionizadas em colunas de troca iônica, contendo resinas nas formas catiônica (Dowex 50 X 40 - 200 Na⁺) e aniônica (Dowex 1 X 8 - 200 Cl⁻), conforme Carvalho & Dietrich (1993). Em seguida, foram submetidas à análise qualitativa de seus componentes, na concentração de 4 mg mL⁻¹, por cromatografia de troca aniônica de alta resolução e detecção por pulso amperométrico (HPAC/PAD) em sistema Dionex modelo DX-300, utilizando-se coluna Carbo Pac PA-1 (4 x 250 mm). A eluição dos carboidratos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio) na seguinte programação: de 0 – 4 minutos, 25 mM; 4.1 – 20 minutos, 25 a 225 mM; 20.1 – 35 minutos, 225 a 450 mM; 35.1 – 36 minutos, 450 a 500 mM e 36.1 – 41 minutos, 25 mM. Os potenciais aplicados ao PAD para E1 (480 ms), E2 (120 ms) e E3 (60 ms) foram 0,05, 0,60 e -0,60, respectivamente e o fluxo através da coluna foi de 1 mL min⁻¹.

3.5 Extração enzimática

As extrações enzimáticas foram feitas em tampão citrato–fosfato (Mcllvaine) 50 mM pH 5,5, contendo 2 mM de EDTA, 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β-mercaptoetanol e 10 % de polivinil polipirrolidona (PVPP) (w/v). As amostras foram homogeneizadas em tampão de extração e permaneceram em repouso por 30 minutos. O homogeneizado foi filtrado em tecido de nylon duplo e deixado em repouso por 1 hora. O filtrado foi centrifugado por 10 minutos a 17.370 g e, logo após, foi adicionado ao sobrenadante, sulfato de amônio a 20 % de saturação. A mistura foi deixada em repouso durante uma noite. Em seguida, o extrato foi centrifugado por 20 minutos a 17.370 g. O precipitado foi descartado, ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 80 % de saturação e a mistura mantida em repouso por 1 hora. Após centrifugação por 20 minutos a 17.370 g, o sobrenadante foi descartado e o

precipitado ressuspensionado em tampão de extração numa proporção aproximada de 1 mL 10g⁻¹ de massa fresca inicial de rizóforo. O extrato foi centrifugado por 10 minutos a 7.720 g e o sobrenadante foi dessalinizado em colunas de Bio Gel P-6 DG, por centrifugação a 700 g. Toda a manipulação do material durante a extração foi realizada a 5 °C.

3.6 Ensaio e determinação enzimática

As misturas de incubação foram constituídas de extratos enzimáticos e substratos na proporção de 1:1 (v/v). As condições dos ensaios enzimáticos (pH, temperatura e concentração de substrato) foram realizadas conforme Asega & Carvalho (2004). Os substratos utilizados foram sacarose, nas concentrações de 400 e 200 mM, para SST e INV, respectivamente, preparados em tampão Mcllvaine pH 5,5, 1-cestose 400 mM em tampão Mcllvaine pH 6,5 para FFT e inulina comercial de *Helianthus tuberosus* (Sigma) 100 mg mL⁻¹ em tampão Mcllvaine pH 4,5, para FEH. A temperatura de incubação foi de 30 °C e o tempo de incubação foi de 6 horas para SST, 2 horas para FFT, 4 horas para INV e FEH. A interrupção das reações foi obtida após fervura em banho-maria por 5 minutos.

Para as análises dos produtos de incubação da SST, FFT e INV, as misturas de reação foram diluídas 100 vezes em água deionizada e submetidas à cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD), em sistema de cromatografia Dionex (DX-300), utilizando-se coluna CarboPac PA-1 (4 x 250 mm). Para a SST e FFT, a eluição dos carboidratos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH) na seguinte programação: de 0 – 2 minutos, 25 mM; 2.1 – 8 minutos, 25 a 50 mM; 8.1 – 13 minutos, 50 a 150 mM; 13.1 –

15 minutos, 150 a 500 mM e 15.1 – 17 minutos, 25 mM. Para INV, foi utilizado um programa isocrático de 100 mM de hidróxido de sódio. Em ambos os casos os potenciais aplicados ao PAD para E1 (480 ms), E2 (120 ms) e E3 (60 ms) foram 0,05, 0,60 e -0,60, respectivamente e o fluxo através da coluna foi de 1 ml min⁻¹. As atividades da SST, INV e FFT foram determinadas pela quantificação da área do pico do principal produto formado, 1-cestose, frutose e nistose, respectivamente, utilizando-se padrões externos. A atividade da FEH foi determinada pela quantidade de frutose liberada (Somogyi, 1945).

3.7 Dosagem de proteína

O conteúdo de proteína nos extratos enzimáticos foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o reagente da Bio Rad[®]. Albumina de soro bovino (Sigma) (1 mg mL⁻¹) foi utilizada como padrão.

3.8 Ensaio da atividade da redutase do nitrato (RN)

A atividade da RN foi determinada segundo Stewart et al. (1986). Amostras de folhas foram colocadas em tubos de ensaio com tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,5, contendo 100 mM de nitrato de potássio, 1,5 % de 1-propanol e triton e, em seguida, submetidas à infiltração à vácuo para retirada do ar das amostras e infiltração da solução de ensaio nos tecidos. As amostras foram então incubadas a 25 °C por 1 hora, no escuro. Dessa mistura de incubação, retirou-se 1 mL e adicionou-se 1 mL de ácido sulfanílico 1 % e 1 mL de α -naphtil etileno diamida (NED) 0,05 %, para coloração do produto formado, nitrito. Após repouso de 30 minutos em temperatura ambiente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm.

3.9 Determinação do teor de nitrato no tecido

O teor de nitrato foi determinado pelo método descrito por Cataldo et al. (1975), a partir do tecido fresco de folhas e rizóforos. Cerca de 1 g massa fresca de tecido foi macerado em almofariz com 5 ml de água deionizada em temperatura ambiente. Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado a 19.300 g por 30 min, coletando-se o sobrenadante e centrifugando-o por mais 15 min a 19.300 g. O sobrenadante final foi utilizado para as análises de nitrato. A cada alíquota de 200 μ l do extrato foram adicionados 800 μ l de ácido salicílico 5 % em ácido sulfúrico concentrado. Após 2 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 19 ml de hidróxido de sódio 2 N, elevando o pH acima de 12. A absorbância da mistura resultante foi lida em espectrofotômetro a 410 nm.

3.10 Determinação do nitrogênio total (NT)

O NT foi determinado pelo método de Malavolta et al. (1987) e realizado no Departamento de Solos e Nutrição da ESALQ-USP. Amostras de 0,1 g de massa seca de folhas foram colocadas em um tubo digestor com 5 mL de uma mistura contendo ácido sulfúrico com sais catalisadores. A temperatura foi elevada 50 °C a cada 30 min até 350 °C. Após a digestão, foi adicionado um volume de hidróxido de sódio 15 N suficiente para neutralizar o ácido e deixar o meio alcalino. Em seguida, foi adicionado ácido bórico como solução indicadora. A absorbância da mistura resultante foi lida em espectrofotômetro a 410 nm.

3.11 Análise estatística

Os efeitos dos tratamentos foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de DUNCAN a 5 %, no software Winstat.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do nitrato no metabolismo de frutanos e na redutase do nitrato

A Figura 5 apresenta os dados de altura do caule, número de folhas e massa da matéria fresca e seca de plantas de *V. herbacea*.

Aos quatro meses não foram verificadas diferenças entre os tratamentos com N-limitado e N-suficiente quanto ao número de folhas, massa fresca da parte aérea e de rizóforos e massa seca de rizóforos. Entretanto, aos seis e nove meses, o número de folhas e as massas fresca e seca da parte aérea e de rizóforos foram superiores nas plantas que receberam tratamento N-limitado.

Marschner (1995) propôs que espécies restritas a ambientes pobres em nutrientes desenvolveram estratégias adaptativas para garantir a atividade metabólica necessária durante seu crescimento. O maior número de folhas encontrado em plantas de *V. herbacea* tratadas com N-limitado sugere, de acordo com Cuzzuol (2003), um mecanismo fisiológico capaz de maximizar a interceptação luminosa para a produção de fotoassimilados em quantidade suficiente para atender à demanda do crescimento sob restrição do nitrogênio.

No presente trabalho, aos quatro meses, a massa seca da parte aérea foi levemente maior nas plantas do tratamento N-suficiente, porém aos nove meses esta foi acentuadamente maior no tratamento com N-limitado (Figura 5).

De maneira geral, as plantas alocam menos recursos para a parte aérea e mais para os órgãos subterrâneos quando o nitrogênio encontra-se em deficiência (Lambers et al., 1998). Cuzzuol (2003) verificou, em *V. herbacea*, menor biomassa aérea e subterrânea nas plantas tratadas com a solução N-limitado, quando comparadas com as plantas tratadas com N-suficiente. Entretanto, maior alocação de biomassa para os rizóforos foi verificada nas plantas sob N-limitado, enquanto maior alocação para os órgãos aéreos foi verificada em plantas sob N-suficiente. Teixeira et al. (1997) detectaram aumento da biomassa aérea quando plantas desta mesma espécie foram tratadas com solução nutritiva de Hoagland completa. Améziane et al. (1995) também observaram em chicória (*Cichorium intybus* L.) que as plantas sob deficiência de nitrogênio apresentaram uma diminuição da razão folha:raiz. Entretanto, diferentemente do que foi encontrado por Cuzzuol (2003) e Teixeira et al. (1997), no presente trabalho observou-se que, em geral, as plantas tratadas com N-limitado apresentaram valores mais altos de biomassa aérea e subterrânea do que as submetidas ao N-suficiente (Figura 5).

Entre agosto e fevereiro, a razão de massa parte seca aérea:rizóforos (MSA:MSR) aumentou em razão do maior crescimento dos órgãos aéreos em relação aos rizóforos, nos dois tratamentos de N. Entretanto, entre fevereiro e maio, o incremento de biomassa de rizóforos foi proporcionalmente maior nos rizóforos do que nos órgãos aéreos (Figura 5), o que resultou em diminuição da razão MSA:MSR (Figura 6). Essa foi, em geral, semelhante em ambos os tratamentos exceto em fevereiro, quando foi maior nas plantas sob N-suficiente.

Em geral, a concentração de frutano total foi maior em plantas do tratamento N-limitado (Figura 7). Esse resultado foi observado também para as frações de oligo- e polissacarídeos, com exceção da fração de polissacarídeos aos 4 meses, que

apresentou concentração mais elevada nas plantas tratadas com N-suficiente. A composição de frutano total não apresentou diferenças entre os tratamentos (Figura 8). Entretanto, as proporções de glucose, frutose e principalmente sacarose diminuíram, em geral, a partir do início da aplicação das soluções nutritivas. Cuzzuol (2003) também verificou teores mais elevados de frutanos em plantas de *V. herbacea* tratadas com N-limitado. Van den Ende et al. (1999) também observaram maior acúmulo de frutanos e menor crescimento aéreo em plantas jovens de chicória (*Cichorium intybus*) cultivadas sob baixo suprimento de nitrogênio, enquanto o inverso foi verificado em plantas sob N-enriquecido.

Já é bem conhecido que a síntese de frutanos ocorre quando o suprimento de sacarose excede a demanda (Nelson & Spollen, 1987; Van den Ende et al., 2002) e que o acúmulo de sacarose pode ocorrer sob deficiência de nitrogênio, conforme verificou Wang & Tillberg (1996) em folhas de *Hordeum vulgare*. No presente trabalho, esperava-se menor crescimento dos órgãos aéreos em plantas sob N-limitado, como de fato, foi detectado por Cuzzuol (2003). Entretanto, os resultados aqui apresentados mostraram que o menor suprimento de nitrogênio não só promoveu o crescimento dos órgãos aéreos dessas plantas como ainda levou ao incremento na biomassa dos rizóforos e maior acúmulo de frutanos nesses órgãos.

Segundo Améziane et al. (1997a, b) a capacidade do dreno de atrair e acumular fotoassimilados em uma planta armazenadora de frutanos é controlada pelas enzimas relacionadas à sua biossíntese, SST e FFT, cujas atividades podem aumentar sob baixos níveis de nitrogênio.

No presente trabalho, a atividade da SST foi mais elevada em plantas sob N-limitado (Figura 9) durante os nove meses de cultivo, e a diferença mais acentuada na atividade dessa enzima, entre os tratamentos ocorreu em plantas mais jovens, aos

quatro meses. Esse dado, que indica uma atividade biossintética mais elevada em plantas que apresentaram maior crescimento, é coerente com o maior acúmulo de frutanos nessas plantas. Van den Ende et al. (1999) também verificaram que o maior teor de frutanos foi acompanhado de maior atividade da SST em raízes de chicória tratadas com doses baixas de nitrato. Efeito negativo de altas concentrações de nitrato na síntese de frutanos também foi demonstrado por Morcuende et al. (2004), em folhas excisadas de cevada (*Hordeum vulgare*). Esses autores verificaram que a inibição da síntese de frutanos por nitrato ocorreu pela diminuição da enzima 6-SFT e não pela redução nos níveis de açúcares.

A FFT também apresentou atividade mais elevada em plantas do N-limitado, sobretudo aos 4 meses (Figura 9). Contudo, aos nove meses, final do período experimental, sua atividade foi mais elevada em plantas sob N-suficiente.

A atividade da FEH (Figura 9), responsável pela mobilização de frutanos foi, em geral, mais elevada em plantas sob N-suficiente, resultado que pode estar relacionado com os teores de frutanos mais baixos nas plantas sob esse tratamento. Atividade elevada de FEH e teores mais baixos de frutanos em órgãos subterrâneos de plantas sob tratamentos com concentrações mais elevadas de nitrogênio são fortes indicadores de mobilização dessas reservas, que ocorre em geral quando há aceleração de crescimento, conforme demonstrado por Van den Ende et al. (1999). Entretanto, no presente trabalho, as plantas sob dose suficiente de nitrogênio apresentaram menor crescimento aéreo quando comparadas às de N-limitado. Esse resultado sugere que a sacarose derivada da mobilização de frutanos nestas plantas não foi utilizada especialmente no processo de crescimento, mas provavelmente também para atender às necessidades advindas da absorção de quantidades mais elevadas de nitrato, da sua redução a nitrito e da síntese de aminoácidos e proteínas,

especialmente nos órgãos aéreos, conforme sugerido por Van den Ende et al. (1999) em plantas de chicória, uma vez que esses órgãos são os principais drenos de nitrato (Améziane et al., 1995, 1997a, b).

Em geral, a atividade da RN (Figura 10), avaliada após 4 meses de tratamento, foi aumentando enquanto as plantas cresciam e recebiam nitrato. As maiores atividades foram encontradas nas plantas N-suficiente, exceto aos seis meses de tratamento quando a RN apresentou maior incremento nas plantas do N-limitado.

Uma vez que os carboidratos regulam a RN em nível de transcrição e tradução (Sivasankar & Oaks, 1996), a queda da atividade dessa enzima nas plantas N-suficiente, aos seis meses de tratamento, pode ter ocorrido devido à menor concentração de frutano total (Figura 7) encontrada neste tratamento. Os carboidratos estimulam a produção da proteína fosfatase, que desfosforila vários resíduos da proteína RN promovendo a ativação da enzima. Portanto, frutanos em baixa concentração estimulariam em pequenas quantidades de fosfatases, resultando em uma menor atividade da RN.

Já a maior atividade da RN em plantas N-suficiente, observada no presente trabalho, reforça a hipótese de maior demanda de sacarose provocada pelo aumento da disponibilidade e absorção de nitrato por plantas desse tratamento. Outra relação entre a sacarose e a RN foi apresentada por Lillo (1994). Esse autor verificou, em espécies arbóreas, que a sacarose ou a glucose poderiam substituir a luz na indução do acúmulo de RNAm para RN, sugerindo que os esqueletos carbônicos seriam os fatores determinantes da atividade dessa enzima.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que tratamentos com diferentes concentrações suficientes e limitadas de nitrato promoveram, em *V. herbacea*, um crescimento diferencial e conseqüentemente biomassas diferentes.

Enquanto plantas tratadas com N-limitado apresentaram maior massa aérea e dos rizóforos e conteúdo de frutano semelhante às plantas do N-enriquecido, esse último tratamento promoveu, a partir do mês de abril, mortalidade das plantas, demonstrando que essa solução poderia ser tóxica para as plantas.

Dessa forma, foi conduzido um experimento, no qual foram utilizadas diferentes concentrações de nitrato (0, 2,5, 5, 10 e 15 mM de KNO_3). Neste trabalho, buscou-se identificar a melhor concentração de nitrato a ser fornecida às plantas para obtenção de maior biomassa subterrânea e conteúdo de frutanos, melhor compreensão do efeito desse nutriente no crescimento e no metabolismo de frutanos nessas plantas, uma vez que a relação entre a promoção ou inibição do crescimento e o acúmulo de frutanos não foi completamente esclarecida.

Figura 5 - Medidas de crescimento de plantas de *V. herbacea* tratadas com 1,3 mmol L⁻¹ (N-lim) e 10,7 mmol L⁻¹ (N-suf) de N-NO₃⁻. Determinação realizada em plantas antes do início do tratamento. Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as barras representam o erro padrão

Figura 6 – Razão entre a massa seca aérea (MSA) e massa seca dos rizóforos (MSR) em plantas de *V. herbacea* tratadas com 1,3 mmol L⁻¹ (N-lim) e 10,7 mmol L⁻¹ (N-suf) de N-NO₃⁻. Determinação realizada em plantas antes do início do tratamento. Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as barras o erro padrão

Figura 7 – Conteúdo de fruto-oligossacarídeos, fruto-polissacarídeos e frutano total em rizóforos de *V. herbacea* tratadas com 1,3 mmol L⁻¹ (N-lim) e 10,7 mmol L⁻¹ (N-suf) de N-NO₃⁻. Determinação realizada em plantas antes do início do tratamento . Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as barras representam o erro padrão

Figura 8 – Análise por cromatografia de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD) de frutano total de rizóforos de plantas de *V. herbacea*, tratadas com 1,3 mmol. L⁻¹ (N-lim) e 10,7 mmol. L⁻¹ (N-enr). G – glicose, F – frutose, S – sacarose, 1-C – 1-cestose, N – nistose e GP ≥ 5 – grau de polimerização.

Figura 9 – Atividades da SST, FFT e FEH em rizóforos de *V. herbacea*, tratadas com 1,3 mmol L⁻¹ (N-lim) e 10,7 mmol L⁻¹ (N-suf) de N-NO₃⁻. Determinação realizada em plantas antes do início do tratamento. Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as barras representam o erro padrão

Figura 10 – Atividade da redutase do nitrato em folhas de *V. herbacea* tratadas com 1,3 mmol L⁻¹ (N-lim) e 10,7 mmol L⁻¹ (N-suf) de N-NO₃⁻. Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as barras representam o erro padrão

4.2 Efeito de diferentes concentrações de nitrato no crescimento e no metabolismo de frutanos

Medidas de altura do caule, número de folhas e área foliar de plantas tratadas com soluções nutritivas contendo 0 (controle), 2,5, 5, 10 e 15 mM de nitrato são apresentadas na Figura 11. Concentrações de 10 e 15 mM de nitrato promoveram o crescimento do caule somente após 10 meses de tratamento. Aos 2, 5 e 7 meses de tratamento não foram observadas diferenças entre os tratamentos, assim como também não foram encontradas diferenças entre os tratamentos controle, 2,5 e 5 mM de nitrato aos 10 meses.

O número de folhas foi mais elevado aos 5 meses nas plantas tratadas com 10 e 15 mM e aos 10 meses em plantas tratadas com 15 mM de nitrato, embora nestas últimas a diferença apresentada em relação às demais concentrações não foi estatisticamente significativa.

A área foliar apresentou uma tendência de aumento com o aumento da concentração de nitrogênio fornecido, em todos os meses analisados. Entretanto, aos 10 meses de cultivo, este aumento foi significativamente maior em plantas tratadas com 10 e 15 mM de nitrato.

As massas fresca e seca dos órgãos aéreos apresentaram, em geral, um ganho com o aumento da concentração de nitrogênio em todos os meses analisados, com destaque para as concentrações de 10 e 15 mM (Figura 12). Analisando-se os valores obtidos nessas duas concentrações durante o período experimental, verificou-se um aumento entre os meses de março e junho, uma diminuição em agosto, seguido de novo aumento em novembro. A diminuição detectada em agosto corresponde ao início da brotação que ocorre logo após a perda dos órgãos aéreos, na dormência. As massas fresca e seca dos rizóforos também apresentaram um acréscimo com o

aumento da concentração de nitrogênio fornecido. Este aumento foi significativamente maior aos 7 e 10 meses de tratamento, em plantas sob 10 e 15 mM (Figura 12). Além de não mostrarem diferenças entre os tratamentos, os valores de massa apresentado pelos rizóforos das plantas aos 2 meses foram baixos por não terem ainda desenvolvido novas ramificações subterrâneas, o que ocorreu entre março e junho.

A razão entre a massa de matéria seca dos rizóforos e dos órgãos aéreos (MSR:MSA) foi inicialmente baixa e atingiu os valores mais elevados aos 7 meses, quando as plantas apresentavam órgãos aéreos em início de crescimento (Figura 13), como consequência da rebrota dos ramos logo após a dormência. A razão MSR:MSA voltou a diminuir aos 10 meses, quando as plantas, apesar de apresentar valores elevados de massa de rizóforos, já exibiam órgãos aéreos bastante desenvolvidos (Figura 12).

As maiores taxas de crescimento relativo (TCR) foram verificadas entre 0 e 2 meses e entre 5 e 7 meses, coincidindo com períodos de brotação dos ramos aéreos (Figura 14). Os maiores valores foram, em geral, detectados nas plantas tratadas com 2,5 e 10 mM nitrato. Em todos os tratamentos aplicados, os valores de razão de área foliar (RAF) foram inferiores aos 5 e 7 meses e coincidiram com as fases de senescência dos ramos aéreos e início de brotação, respectivamente, nas quais a área foliar é pequena em relação à massa seca total da planta (Figura 14).

A taxa de assimilação líquida (TAL), determinada pela taxa de incremento de massa de matéria seca por unidade de área foliar, foi mais elevada entre os 5 e 7 meses de tratamento, período que incluiu a senescência das plantas, quando essas apresentavam valores baixos de área foliar (Figura 14).

Os resultados obtidos demonstram que o nitrato promoveu o crescimento de *Vernonia herbacea* e isto pode ser verificado pelos aumentos em altura, número de

folhas, área foliar e massas fresca e seca aérea e dos rizóforos de plantas tratadas com diferentes concentrações de nitrato. Ao final de 10 meses, plantas tratadas com 10 e 15 mM, por exemplo, apresentaram um ganho de 17,5% de massa seca em relação aos tratamentos controle, 2,5 e 5,0 mM de nitrato ou um ganho de aproximadamente 100 % em relação ao de plantas cultivadas em terra de canteiro (Carvalho et al., 1997). O efeito promocional do nitrato foi, em alguns casos, facilmente identificado quando as plantas atingiram um grau de maturidade mais avançado, aos 10 meses, o que mostra a importância da fase de crescimento na resposta ao tratamento nutricional (Marschner, 1995; Améziane et al., 1997a).

Experimentos anteriores realizados com *V. herbacea* demonstraram que a ausência de N na solução de Hoagland não afetou o crescimento de *V. herbacea* cultivadas em casa de vegetação (Teixeira et al., 1997) ou que a adubação com N, P e K influenciou negativamente o aumento da biomassa, porém sem uma diferença significativa entre os tratamentos (Carvalho et al., 1998). Entretanto, mais recentemente foi mostrado que a adubação nitrogenada na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ influenciou significativamente o crescimento de plantas cultivadas em área de cerrado (Cuzzuol et al., 2003). O efeito promotor do N no aumento da biomassa aérea e de rizóforos também foi demonstrado por Cuzzuol (1993), embora com maior alocação de biomassa para os rizóforos em plantas sob concentração inferior de N.

Haridassan et al. (1997) constataram que N, P, K e Ca são fatores limitantes para o crescimento de espécies herbáceas do cerrado. Portanto, embora essas espécies sejam adaptadas aos solos oligotróficos (Vilela & Haridasan, 1994), elas podem responder à adubação, elevando a concentração dos nutrientes na biomassa de seus órgãos aéreos. Algumas espécies de cerrado apresentaram respostas positivas ao P e ao K, mas não ao N. Felipe & Dale (1990) observaram aumento na

área foliar e biomassa seca de *Bidens gardneri*, uma Asteraceae do cerrado, em resposta às doses crescentes do P.

A combinação dos elementos para manifestar uma resposta satisfatória de crescimento também é um fator importante a ser considerado no estudo de nutrição mineral. Nicoloso et al. (1990) 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.

No presente trabalho o N foi fornecido na forma de KNO_3 , portanto não se pode descartar o efeito do K, em adição ao N, sobre o crescimento das plantas, embora esse elemento seja um dos mais fácil e rapidamente lixiviados do solo, enquanto o N é um dos que são mais prontamente absorvidos e assimilados pelas plantas (Havlin, 1999).

A alocação de biomassa para os vários órgãos da planta depende da espécie, da ontogenia e do ambiente em que a planta vive (Poorter & Nagel, 2000). Na vegetação do cerrado, a alocação de biomassa favorece os órgãos subterrâneos causada, entre outras razões, pela baixa fertilidade do solo, toxicidade do alumínio e deficiência hídrica (Arens, 1963; Felipe & Dale, 1990; Paulilo & Felipe, 1995; Haridassan et al., 1997). Um grande número de espécies herbáceas do cerrado apresenta órgãos subterrâneos que atuam como órgãos dreno (Figueiredo-Ribeiro et al., 1986) e são favorecidos na alocação de biomassa como é o caso dos rizóforos de *V. herbacea* (Carvalho et al., 1997).

A possibilidade de alteração na razão massa seca de raízes:massa seca aérea pela manipulação de nutrientes é de particular interesse em plantas que apresentam órgãos de reserva. Em *C. intybus*, por exemplo, a baixa razão massa seca

aérea:massa seca subterrânea, induzida pela deficiência de nitrogênio, foi uma estratégia adotada para produção de raízes tuberosas ricas em frutanos, viabilizando o seu cultivo sem a necessidade de aplicação de doses elevadas de nutrientes (Améziane et al., 1997a).

No presente estudo, os baixos valores da razão massa seca de rizóforos:massa seca aérea (MSR:MAS), encontrados no início do período de cultivo, é resultado da baixa massa dos rizóforos das plantas jovens e não de elevada biomassa aérea, enquanto ao final do experimento, embora os rizóforos já estavam bem desenvolvidos, os baixos valores encontrados dessa razão ocorreram em função de valores também elevados de biomassa aérea das plantas em fase vegetativa de desenvolvimento. Não foram encontradas variações acentuadas na MSR:MSA entre os diferentes tratamentos, exceto aos 7 meses, não parecendo, portanto, haver correlação entre essa razão e as diferentes concentrações de nitrato.

As maiores TCR detectadas entre 0 e 2 meses e entre 5 e 7 meses coincidiram com períodos de brotação. Entretanto, comparando-se os diferentes tratamentos, os maiores valores de TCR foram, em geral, encontrados em plantas que receberam 10 mM de nitrato, o que demonstra ser essa a melhor concentração para o aumento de biomassa em *V. herbacea*.

A RAF reflete a relação entre o sistema assimilador e a massa seca da planta. Valores menores mostram, indiretamente, uma diminuição nos órgãos aéreos fotossintetizantes em relação ao sistema subterrâneo, o que de fato ocorreu nas plantas que exibiram os menores valores de RAF durante a senescência dos órgãos aéreos e início de brotação, aos 5 e 7 meses, respectivamente.

Com relação à TAL, os maiores valores também foram encontrados entre 5 e 7 meses. Entretanto, esses valores foram encontrados em plantas controle e naquelas

tratadas com 2,5 mM de nitrato. Embora a TAL não tenha correlação com a TCR em dicotiledôneas, Cuzzuol (2003) detectou uma correlação altamente significativa entre essas duas taxas em *V. herbacea*, mostrando que a TAL, junto com a área foliar, são as principais variáveis determinantes da TCR (Lambers & Poorter, 1992). De maneira geral, o aumento verificado na TCR foi pequeno e indica que *V. herbacea* 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 aumentada (Lambers & Poorter, 1992; Marschner, 1995).

O conteúdo de fruto-poli-, -oligossacarídeos e a razão fruto-polissacarídeos:fruto-oligossacarídeos são apresentados na Figura 15. O conteúdo de polissacarídeos nas plantas controle foi, em geral, inferior ao das plantas tratadas com nitrato. Verificou-se um pequeno aumento de polissacarídeos aos 5 meses, principalmente nas plantas que receberam 15 mM de nitrato e, aos 7 e 10 meses, observa-se uma tendência de aumento com o aumento da concentração de nitrato. Com relação aos fruto-oligossacarídeos, verificou-se que, em cada ponto de amostragem, sua concentração foi semelhante em todos os tratamentos aplicados. Entretanto, aos 7 e 10 meses esta concentração apresentou uma redução em todos os tratamentos. No início do experimento, (T0), as plantas apresentaram conteúdos de frutanos em ambas as frações inferiores ao das plantas tratadas. A razão fruto-polissacarídeos:fruto-oligossacarídeos aumentou durante o período experimental, e este aumento foi mais acentuado em plantas que receberam 15 mM de nitrato.

O baixo conteúdo de oligo- e polissacarídeos de frutanos encontrado nos rizóforos das plantas jovens (T0) foi causado, possivelmente, pela mobilização das reservas para regeneração da planta a partir apenas deste fragmento de rizóforo.

Durante o período experimental, entretanto, o conteúdo de frutanos, em geral, aumentou, resultado esperado, uma vez que as plantas, estando em crescimento, apresentaram ganho de biomassa aérea que propiciou maior captação de carbono pela fotossíntese e, conseqüentemente, maior acúmulo de frutanos nos rizóforos.

O tratamento com nitrato parece ter promovido principalmente o aumento do teor de polissacarídeos, especialmente aos 5 e 10 meses, quando a maioria das plantas apresentavam ganho significativo de biomassa aérea. Plantas adultas de *V. herbacea* apresentam razão polissacarídeos:oligossacarídeos >1 (poli:oligo >1), enquanto em plantas mais jovens, com menos de um ano de idade, esta razão favorece os oligossacarídeos (Carvalho et al., 1997). Entretanto, no presente estudo a razão poli:oligo >1 foi verificada a partir do mês 7, em plantas tratadas com soluções nutritivas contendo 10 e 15 mM de nitrato, indicando que este tratamento, ao promover um maior crescimento das plantas, tenha favorecido o alongamento da cadeia de frutanos num período de tempo mais curto do que o observado nos demais tratamentos.

Como o acúmulo de frutanos ocorre quando o suprimento de sacarose excede a demanda por sacarose (Nelson & Spollen, 1987), espera-se que plantas com um maior crescimento aéreo, acumulem uma menor quantidade de frutanos nos órgãos subterrâneos. Esta hipótese está de acordo com resultados obtidos por Van den Ende et al. (1999) para plantas jovens de chicória que apresentaram maior ganho de biomassa sob tratamento com soluções “ricas” em nitrogênio, mas que, entretanto, apresentaram teores inferiores de frutanos nos órgãos de reserva, quando comparadas com plantas que receberam soluções “pobres” em nitrogênio. Outros estudos realizados com outras Asteraceae acumuladoras de frutanos, como *H. tuberosus* (Schittenhelm, 1999), *Polymnia sonchifolia* (Tsukihashi et al., 1991) também mostraram

que o nitrogênio promoveu o crescimento vegetal em detrimento da concentração de carboidratos. A resposta ao tratamento com nitrogênio também pode variar de acordo com a idade da planta. Plantas de *V. herbacea* com 6 meses de idade responderam negativamente às doses crescentes de adubação nitrogenada, enquanto efeito contrário ocorreu em plantas com 12 meses de idade (Cuzzuol et al., 2003).

Em plantas de *V. herbacea* submetidas a concentrações maiores e menores de nitrato, o aumento de biomassa aérea e subterrânea foi maior em plantas tratadas com N-suficiente mas a concentração de frutanos foi mais elevada em plantas sob N-limitado (Cuzzuol, 2003). No presente estudo, o aumento de biomassa aérea e subterrânea ocorreu com o aumento da concentração de nitrato na solução nutritiva e a concentração de frutanos nos rizóforos foi, em geral, maior em plantas tratadas com soluções contendo nitrato, embora os conteúdos de frutanos tenham apresentado variações relacionadas com a fase de desenvolvimento das plantas, conforme observado para os teores inferiores de frutanos aos 7 meses, quando as plantas estavam em brotação.

A Figura 16 ilustra as cromatografias por HPAEC/PAD dos frutanos totais de plantas sob diferentes concentrações de nitrato, aos 10 meses de tratamento. Foi observado que o perfil cromatográfico dos tratamentos controle, 2,5 e 5,0 mM foram semelhantes, ou seja, ao longo de 10 meses as plantas apresentaram proporções semelhantes de fruto-oligo e -polissacarídeos. As plantas tratadas com 10 e 15 mM de nitrato apresentaram maior proporção de polissacarídeos em relação aos demais tratamentos, sendo detectadas moléculas com grau de polimerização maior que 47. Entretanto, plantas tratadas com 10 mM, além de proporção elevada de polissacarídeos, apresentaram também proporções elevadas de glucose, frutose, sacarose e 1-cestose. Esses resultados parecem estar associados ao maior

crescimento dos órgãos aéreos e início de desenvolvimento do ápice floral apresentado pela maioria dessas plantas (dados não apresentados).

As atividades das enzimas SST, FFT, INV e FEH são apresentadas na Figura 17. A atividade da SST aumentou após dois meses de tratamento, diminuiu até os 7 meses e apresentou novamente um aumento aos 10 meses. Entre os diferentes tratamentos aplicados, verificou-se, em geral, um aumento da atividade com o aumento da concentração de nitrato. A atividade da FFT apresentou comportamento semelhante ao da SST até os 5 meses de experimento. A invertase apresentou atividade elevada no início do experimento (T0), mas, aos 2 meses, já apresentava atividade aproximadamente 10 vezes inferior. A FEH também apresentou atividade inicialmente elevada em relação aos 2 e 5 meses; entretanto, aos 7 e 10 meses sua atividade aumentou em plantas que receberam soluções com concentrações acima de 5 mM de nitrato.

O aumento da atividade da SST aos 2 e aos 10 meses verificado em todas as plantas tratadas e também aos 5 meses em plantas tratadas com 15 mM de nitrato sugere que o enriquecimento crescente em nitrato das soluções promove a biossíntese de frutanos em *V. herbacea*. A FFT também apresentou aumento de atividade nas plantas tratadas que também puderam ser relacionados com o aumento da concentração de frutanos nessas plantas. A baixa atividade de biossíntese de frutanos no T0 é evidenciada pela baixa atividade da SST assim como a ocorrência de mobilização de reservas nessa mesma fase é evidenciada pelas atividades elevadas de FEH e INV. Esses resultados refletem a condição metabólica de plantas jovens obtidas a partir da brotação de fragmentos de rizóforos, nas quais ocorre a mobilização de reservas do órgão subterrâneo e alocação de biomassa para o estabelecimento dos

órgãos aéreos, não sendo possível ainda a translocação de fotoassimilados para os órgãos de reserva e, portanto, a detecção de atividade elevada de SST.

A atividade inicial elevada da INV diminuiu acentuadamente durante o período experimental. Entretanto as variações apresentadas durante o período experimental não pareceram estar relacionadas aos tratamentos com nitrato, exceto aos 7 e 10 meses, quando a atividade mostrou uma tendência de aumento com o enriquecimento da solução nutritiva. O resultado do aumento da INV, aos 10 meses de tratamento, também pode ser observado na Figura 16, em plantas tratadas com 10 mM, nas quais foram verificadas maiores concentrações de glucose e frutose.

A atividade inicial elevada de FEH está coerente com a necessidade de mobilização de reservas do rizóforo nessa fase de regeneração da planta, assim como a diminuição da sua atividade aos 2 meses é coerente com o início de biossíntese de frutanos nas plantas que já apresentam um aparato fotossintético suficiente para sintetizar sacarose não apenas para sustentar o seu crescimento mas também para promover o acúmulo de reserva no órgão subterrâneo que passa a atuar como órgão dreno. Aumentos da atividade da FEH aos 7 e 10 meses estão possivelmente associados à brotação e ao crescimento intensivo dos ramos aéreos nessas fases. Relação inversamente proporcional entre as atividades da FEH e SST já foi detectada em outras Asteraceae acumuladoras de frutanos como *C. intybus* (Van den Ende et al., 1999), *P. sonchifolia* (Fukai et al., 1997) e *V. herbacea* (Asega & Carvalho, 2004), e reforça a hipótese do controle temporal para a atividade dessas enzimas de síntese e despolimerização num mesmo compartimento celular, o vacúolo.

O teor endógeno de nitrato em folhas foi baixo, variando de 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ massa fresca aos 5 meses de tratamento com 5 mM nitrato a 1,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ massa fresca aos 7 meses de tratamento com 15 mM de nitrato (Figura 18). Nos rizóforos, os teores foram

mais elevados, variando de $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$, aos 2 meses, em plantas controle a $2,6 \mu\text{g g}^{-1}$, aos 10 meses em plantas tratadas com 15 mM de nitrato. Durante todo o período experimental, os conteúdos mais elevados de nitrato endógeno foram detectados em plantas tratadas com concentrações mais elevadas de nitrato (Figura 18).

Por outro lado, a atividade da RN foi, em geral, mais elevada nas folhas do que nos rizóforos (Figura 19). Nestas, a RN apresentou uma tendência de aumento de atividade nas concentrações mais elevadas de nitrato e, especialmente aos 10 meses de tratamento, sob as concentrações de 10 e 15 mM. Nos rizóforos, a RN apresentou níveis de atividade mais baixos, mesmo sob concentrações mais elevadas de nitrato (Figura 19).

Pelos baixos teores de nitrato encontrados em folhas de *V. herbacea*, não é possível afirmar que as plantas estariam armazenando o nitrato no tecido foliar em resposta aos tratamentos.

Embora a maioria das espécies, como *Lolium multiflorum* (Veen & Kleinendorf, 1984, *Hordeum vulgare* (Morcuende et al., 2004) e as 17 espécies de arbóreas estudadas por Aidar et al. (2003) armazenem o nitrato nas folhas, os resultados obtidos com folhas de *V. herbacea* não permitiram esta constatação e levaram à realização de uma análise do conteúdo de nitrato nos rizóforos para verificar se o nitrato estaria sendo armazenado diferencialmente nestes órgãos. Os resultados obtidos após dois meses de aplicação das soluções nutritivas mostraram não só um conteúdo mais elevado de nitrato nestes tecidos em relação às folhas, como também um aumento significativo deste composto nos rizóforos de plantas tratadas com 15 mM de nitrato. Assim, as análises em rizóforos, realizadas após os cinco meses de tratamento até o último ponto amostrado mostraram um aumento gradual de nitrato com o aumento da concentração deste composto nas soluções nutritivas aplicadas, exceto nas plantas

tratadas com 2,5 mM no mês de junho, que apresentaram teor mais elevado do que as de 5 mM.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre o armazenamento de nitrato em órgãos subterrâneos de reserva. Entretanto, alguns trabalhos relatam o acúmulo de nitrato em raízes como é o caso de *Ananas comosus* (L.) Merr., uma espécie de bromélia (Nievola & Mercier, 2001)

A atividade da RN foi determinada inicialmente apenas nas folhas; entretanto, como o nitrato foi predominantemente detectado nos rizóforos, a atividade da RN passou a ser monitorada nesses tecidos também. Embora o conteúdo de nitrato nas folhas tenha sido baixo, a atividade da RN foi, em geral, mais elevada e apresentou uma tendência de aumento com o aumento da concentração de nitrato. Sabe-se que a atividade da RN no tecido foliar é induzida pela luz e pelo nitrato (Beevers & Hageman, 1969) e que esta varia em função do estágio de expansão da folha, sendo máxima quando a folha atinge sua total expansão (Meeker et al., 1974) e declinando com a maturação ou envelhecimento da folha (Franco et al., 1979). Dessa forma, a atividade elevada da RN, aos 10 meses, nas plantas que receberam as doses mais elevadas de nitrato (10 e 15 mM de nitrato), foi coerente com a maior área foliar e, conseqüente maior absorção de luz.

Já a atividade da RN nos rizóforos foi mais baixa. Em plantas controle, foi inferior à das plantas tratadas aos 5 meses de tratamento mas apresentou uma tendência de aumento com o aumento da concentração de nitrato aos 7 e 10 meses, exceto na concentração de 15 mM neste último mês.

Em geral, plantas arbóreas heliófilas e pioneiras apresentam maior atividade da RN nas folhas (Aidar et al., 2003), pois os redutores (NADPH e ferredoxina) e os elétrons que promovem a reação da RN são produtos diretos da fotossíntese (Dose et

al., 1997). Dessa forma, a atuação dessa enzima nas folhas é favorecida. Já em raízes ou outros órgãos subterrâneos, há necessidade da translocação de fotossintatos para produção de energia para que a atividade da RN ocorra.

Os resultados mostraram que, em *V. herbacea*, a atividade da RN em folhas é em geral, um pouco mais elevada do que nos rizóforos. Entretanto, o acúmulo de nitrato nessa espécie é maior no órgão subterrâneo. Dessa forma, pode-se sugerir que a folha estaria atuando como dreno e o rizóforo como fonte de nitrato.

Em muitas plantas, quando as raízes recebem pequenas quantidades de nitrato, o mesmo é reduzido principalmente nesses órgãos. À medida que a concentração do nitrato aumenta nesses tecidos, uma proporção maior é translocada para as partes aéreas onde será assimilado (Marschner, 1995). Isso explicaria a maior atividade da RN nas folhas de plantas tratadas com 10 e 15 mM e a maior atividade nos rizóforos de plantas tratadas com soluções nutritivas contendo 2,5 e 5,0 mM de nitrato aos 10 meses, quando a concentração de nitrato nesses tecidos atinge um valor mais elevado.

Mesmo sob condições similares de disponibilidade do nitrato, o metabolismo do nitrato entre as raízes e os órgãos aéreos pode variar de espécie para espécie, conforme indicado pela proporção da atividade da RN em cada um dos órgãos ou pelas concentrações relativas do nitrato. Em *V. herbacea*, os resultados mostraram que o maior acúmulo de nitrato nos rizóforos promoveu uma maior atividade da RN nas folhas, porém um menor acúmulo de nitrato nesses órgãos causou maior atividade da RN no próprio rizóforos que coincidiu com uma menor atividade da RN nas folhas.

Uma vez verificado que 10 mM de nitrato foi a melhor concentração utilizada para o cultivo de *V. herbacea*, aumento de biomassa e maior conteúdo de frutanos, o experimento seguinte foi conduzido para verificar qual seria a melhor fonte de

nitrogênio para fertilização dessa espécie. Dessa forma, essas plantas foram cultivadas com soluções nutritivas enriquecidas de nitrato (KNO_3), amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e amônio mais nitrato (NH_4NO_3), ambas na concentração de 10 mM.

Figura 11 - Medidas de crescimento de plantas de *V. herbacea* tratadas com diferentes concentrações de nitrato. 2,5 $\square$, 5,0 $\blacksquare$, 10,0 $\blacksquare$, 15,0 mM $\blacksquare$ de KNO_3 . Determinação realizada no T0 $\blacksquare$. Controle – solução nutritiva sem nitrato $\blacksquare$. Os dados representam médias de três repetições ($n=3$) e as barras representam o erro padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$)

Figura 12 - Medidas de crescimento de plantas de *V. herbacea* tratadas com diferentes concentrações de nitrato. 2,5 □, 5,0 ■, 10,0 ■, 15,0 mM ■ de KNO_3 . Determinação realizada no T0 ■. Controle – solução nutritiva sem nitrato ■. Os dados representam médias de três repetições ($n=3$) e as barras representam o erro padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Figura 13 – Razão entre massa seca dos rizóforos (MSR) e massa seca da parte aérea (MAS) de plantas de *V. herbacea* tratadas com diferentes concentrações de nitrato. 2,5□, 5,0■, 10,0■, 15,0 mM ■ de KNO₃. Determinação realizada no T0 ■. Controle – solução nutritiva sem nitrato ■. Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as barras representam o erro padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$)

Figura 14 – Taxa de crescimento relativo (TCR), razão de área foliar (RAF) e taxa de assimilação líquida (TAL) em plantas de *V. herbacea* tratadas com diferentes concentrações de nitrato. 2,5 ■, 5,0 ▲, 10,0 ●, 15,0 mM ✱ de KNO₃. Controle – solução nutritiva sem nitrato ◆. Diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$)

Figura 15 – Conteúdo fruto-oligossacarídeo, fruto-polissacarídeos e a razão poli:oligo em rizóforos de *V. herbacea* tratadas com diferentes concentrações de nitrato. 2,5 □ , 5,0 ■ , 10,0 ■ , 15,0 mM ■ de KNO₃. Determinação realizada no T0 ■ . Controle – solução nutritiva sem nitrato ■. Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as barras representam o erro padrão.

Figura 16 – Análise por cromatografia de troca aniônica de alta resolução de frutano total de plantas de *V. herbacea* após 10 meses de tratamento com diferentes concentrações de nitrato. T0 – determinação realizada no T0. G - glicose, F - frutose, S - sacarose, 1-C - 1-kestose e GP - grau de polimerização

Figura 17 – Atividades da SST, FFT, INV e FEH em rizóforos de *V. herbacea* tratadas com nitrato 2,5 $\square$, 5,0 $\square$, 10,0 $\blacksquare$, 15,0 mM $\square$ de KNO_3 . Determinação realizada no T0 $\square$. Controle – solução nutritiva sem nitrato $\square$. Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as barras representam o erro padrão

Figura 18 – Conteúdo de nitrato endógeno em folhas e rizóforos de *V. herbacea* tratadas com diferentes concentrações de nitrato. 2,5 $\square$, 5,0 $\blacksquare$, 10,0 $\blacksquare$, 15,0 mM $\blacksquare$ de KNO_3 . Determinação realizada no T0 $\blacksquare$. Controle – solução nutritiva sem nitrato $\blacksquare$. Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as barras representam o erro padrão

Figura 19 – Atividade da redutase do nitrato em folhas e rizóforos de *V. herbacea* tratadas com diferentes concentrações de nitrato. 2,5 □, 5,0 ■, 10,0 ■, 15,0 mM ■ de KNO₃. Determinação realizada no T0 ■. Controle – solução nutritiva sem nitrato ■. Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as barras representam o erro padrão

4.3 Aspectos do crescimento e atividade da redutase do nitrato em plantas submetidas a diferentes fontes de nitrogênio

Os resultados apresentados na Figura 20 mostram haver um aumento nos parâmetros de crescimento avaliados nas plantas de *V. herbacea* cultivadas com nitrato (KNO_3), amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e a mistura de nitrato e amônio (NH_4NO_3), ao longo do período de observações. Não foi verificado efeito negativo das três fontes de nitrogênio fornecidas, no crescimento dessas plantas.

Durante os meses de tratamento, tanto a área foliar quanto a massa seca aérea não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Entretanto, foi possível observar que as plantas tratadas com nitrato mostraram maior massa seca aérea e de rizóforos no terceiro mês do período experimental. Em relação à área foliar, os tratamentos com amônio e a mistura nitrogenada propiciaram maior área foliar em relação ao tratamento com nitrato.

Em cultura de batata, Cao & Tibbitts (1992), usando uma mistura de nitrato e amônio, constataram que esse tratamento aumentou a massa seca e a área foliar, quando comparados aos tratamentos contendo somente nitrato ou amônio. Na presença de nitrato, as plantas cresceram melhor do que sob amônio mas, ao final do experimento, não apresentaram massa seca total superior à daquelas que receberam a mistura nitrogenada.

Outros estudos realizados com plantas cultivadas revelaram diferenças quanto à preferência pela fonte nitrogenada. A batata doce, por exemplo, apresentou maior número de tubérculos quando tratada com pequenas concentrações de NO_3^- (Kim et al., 2002). Duas cultivares de arroz (IAC-4440 e IAC-120), tratadas com NH_4^+ , produziram maior número de grãos por planta (Silveira & Machado, 1990). Por outro

lado, a alfafa apresentou maior crescimento e maior número de folhas quando recebeu a mistura de NO_3^- e NH_4^+ (Meuriot, 2003).

Com relação aos parâmetros derivados de crescimento, TCR, RAF e TAL (Figura 21), observou-se que, no primeiro período analisado (0 a 30 dias), as plantas tratadas com nitrato, apresentaram a maior TCR, seguido-se uma queda contínua até o final do experimento. As plantas tratadas com soluções nutritivas contendo apenas amônio ou a mistura nitrogenada apresentaram valores similares entre si e mais baixos, ao longo do período analisado.

De acordo com Poorter (2002), a TCR reflete o incremento de produção de massa de matéria seca em um determinado intervalo de tempo. Dessa forma, foi possível observar que as plantas que receberam nitrato como fonte de nitrogênio apresentaram inicialmente maior ganho de matéria seca. Entretanto, a produção de matéria seca foi decrescendo após o segundo mês até se igualar aos outros dois tratamentos. A queda gradual da TCR, verificada em todos os tratamentos, apresentou um padrão semelhante ao que é detectado na maioria das plantas, ou seja, o incremento de massa tornou-se proporcionalmente decrescente em relação à massa total do indivíduo. Portanto, quanto maior a sua massa total, menor a taxa de crescimento (Beadle, 1993).

No início do crescimento de plantas de *V. herbacea*, o rizóforo atua como fonte de carbono, mobilizando os frutanos deste órgão para o crescimento dos órgãos aéreos. Asega & Carvalho (2004) mostraram que quando plantas de *V. herbacea* foram induzidas à brotação, a atividade da frutano exo-hidrolase, enzima de despolimerização dos frutanos, aumentou temporariamente, indicando a mobilização desse carboidrato para a parte aérea em crescimento.

Segundo Lambers et al. (1998), as respostas de crescimento à adição de nutrientes em plantas nativas refletem uma pequena elevação da TCR, indício de que as plantas possuem baixo potencial de TCR. Baixa TCR é considerada por Grime & Hunt (1975) uma estratégia de sobrevivência de plantas de ambientes menos férteis. Segundo Chapin (1980, 1988), tais plantas, quando cultivadas em solos mais férteis, acumulam os nutrientes ao invés de aproveitá-los imediatamente, vindo a utilizá-los mais tarde, quando sua disponibilidade for limitante, o que corrobora com os resultados encontrados em plantas de *V. herbacea*.

Os tratamentos com nitrogênio causaram variações na RAF (Figura 21), que é uma medida da eficiência da planta como produtora de área assimiladora. As plantas tratadas com nitrato apresentaram um valor de RAF significativamente maior no início do experimento, quando comparadas às outras fontes de nitrogênio. As plantas tratadas com a mistura nitrogenada apresentaram incremento significativo no segundo período de crescimento, mas ao final do período analisado, as plantas sob os três tratamentos não diferiram significativamente entre si.

A TAL (Figura 21), que mede a eficiência da planta como produtora de matéria seca, foi mais elevada nas plantas tratadas com nitrato e apenas no início do experimento. Entretanto, ao final do experimento, plantas de todos os tratamentos apresentaram valores semelhantes.

Valores mais elevados de TAL no início do experimento para as três fontes de nitrogênio sugerem que nesta fase as plantas estejam utilizando os recursos provindos do rizóforo, pois no início do crescimento é esse órgão, e não os órgãos fotossintetizantes, que atua como fonte de carbono, fornecendo compostos indispensáveis para o estabelecimento da parte aérea.

Com base nas características adaptativas para os teores de nutrientes no solo, Chapin (1980, 1988) classificou as espécies nativas em dois grupos: Tipo I – espécies de crescimento lento que, quando cultivadas com maior suprimento nutricional acumulam os nutrientes que podem ser utilizados quando as condições nutricionais forem limitantes, e Tipo II – espécies de crescimento rápido que respondem ao maior suprimento de nutrientes, aumentando a taxa de crescimento, especialmente da parte aérea. Dessa forma, de acordo com a classificação de Chapin (1980, 1988), plantas de *V. herbacea* podem ser classificadas como espécie do Tipo I, pois apresentaram baixas TCR, RAF e TAL. Cuzzuol (2003) também verificou baixos valores de TCR, RAF e TAL quando as plantas de *V. herbacea* foram tratadas com nitrato.

Plantas de *V. herbacea* acumulam nutrientes, como o nitrato (conforme item 4.2), e frutanos no rizóforo, quando há nutrientes disponíveis e quando o suprimento de carbono pela fotossíntese excede a demanda por este elemento. Se houve crescimento da parte aérea (Figura 20), mesmo que lento (Figura 21), essas plantas devem ter armazenado compostos, em detrimento do investimento em crescimento.

Considerando os valores significativamente mais elevados de TCR, RAF e TAL no início do experimento em plantas tratadas com nitrato, podemos sugerir para o cultivo inicial de *V. herbacea*, a utilização de soluções nutritivas contendo nitrato. Posteriormente, para a manutenção da cultura, pode-se recomendar o uso de soluções nutritivas contendo a mistura nitrogenada, já que o amônio pode ser tóxico para a planta (Lea et al. 1992), embora não observado no presente trabalho. A fim de testar essa sugestão, foi analisada a força de dreno aparente nas plantas de *V. herbacea*, no caso, representada pelos rizóforos. A força de dreno aparente, que mede a capacidade potencial do órgão em atrair e armazenar fotoassimilados, encontra-se ilustrada na Figura 22. Os resultados demonstraram que as diferentes fontes de nitrogênio, nos

primeiros 60 dias de tratamento, não levaram a diferenças no acúmulo desses compostos. Entre 60 e 90 dias de aplicação semanal das soluções nutritivas, ocorreram diferenças entre os tratamentos que evidenciaram maior acúmulo de compostos nos rizóforos das plantas tratadas com nitrato. Diferente dos resultados encontrados nesse período de tratamento, entre 90 e 120 dias, as plantas tratadas com nitrato apresentaram diminuição na força de dreno aparente, enquanto as plantas que receberam amônio e a mistura nitrogenada apresentaram maior capacidade de acúmulo de compostos.

Segundo Marcelis (1996), a força de dreno de um órgão será maior quando sua taxa de crescimento for maior, resultando em aumento do tamanho do dreno. Em *V. herbacea*, os rizóforos, são órgãos especializados para o acúmulo de frutanos (Carvalho & Dietrich, 1993) e com o aumento da biomassa subterrânea e de força aparente do dreno, esse terá maior capacidade de armazenar esses carboidratos.

Uma vez que os frutanos são carboidratos solúveis de grande interesse econômico e que sua utilização na indústria nacional depende de importação, é relevante conhecer a viabilidade do cultivo de *Vernonia herbacea*, espécie nativa do cerrado, para a produção de frutanos para fins industriais

A redutase do nitrato (RN) (Figura 23) apresentou maior atividade nas folhas do que nos rizóforos, e em plantas tratadas com nitrato, sugerindo o potencial de indução dessa enzima pelo substrato, como já demonstrado em várias leguminosas (Sprent, 1994). A atividade da RN em folhas de plantas tratadas com nitrato foi mais elevada do que sob os demais tratamentos devido à maior disponibilidade de nitrato translocado nas folhas (Stewart & Schmidt, 1998).

Segundo Dose et al. (1997), a maioria das espécies reduz o nitrato a nitrito pela ação da RN, nas folhas. Essa enzima requer elétrons e compostos redutores, como o

NADPH, além da ferredoxina, proveniente da fotossíntese, para atuar. Dessa forma, a ação da RN nas folhas é favorecida, já que em raízes e outros órgãos subterrâneos há necessidade da translocação desses elementos para a atividade da RN (Aidar et al., 2003).

Nos rizóforos, a atividade da RN (Figura 23) foi mais baixa do que nas folhas e semelhante em todos os tratamentos, não havendo diferenças da atividade ao longo dos meses. Isso sugere que a atividade da RN no rizóforo seja uma atividade constitutiva neste órgão, ou seja, a enzima funcional está presente sem a necessidade da indução pelo substrato.

Pimentel (1998) sugeriu uma estratégia de adaptação de plantas a condições de baixa disponibilidade de N. Segundo esse autor, a rápida absorção e acúmulo de nitrato para posterior utilização durante o desenvolvimento, ocorre quando a sua disponibilidade do nutriente diminui. No cerrado, a diminuição da disponibilidade de N inorgânico pode ocorrer por lixiviação pelas chuvas e pelo uso crescente do nutriente pelos microorganismos do solo, portanto é razoável assumir que a estocagem, para uso posterior, ocorre quando a oferta do nutriente para a planta é elevada.

A análise do conteúdo de nitrogênio total (NT) nas folhas não mostrou haver diferenças significativas entre os tratamentos com diferentes fontes de nitrogênio. Os valores encontrados foram de 1,78 %, 1,91 % e 1,95 % de NT em plantas tratadas com nitrato, amônio e a mistura nitrogenada, respectivamente, estão de acordo com os dados relatados para a maioria das espécies cultivadas, entre 1,35 e 6 % da massa seca total da planta (Marschner, 1995). Entretanto, no presente estudo considerou-se apenas a massa seca foliar. Como os rizóforos apresentam concentrações mais elevadas de nitrato (cerca de 2,5 vezes) do que as folhas (conforme item 4.2), é

possível que a concentração de NT, em função da massa seca total do vegetal da planta, seja mais elevada.

Cuzzuol (2003) observou que a força de dreno em plantas de *V. herbacea* foi estimulada por concentrações mais elevadas de N ($10,7 \text{ mmol L}^{-1}$), que promoveram também o aumento da massa seca do rizóforo. O autor verificou que as plantas que receberam mais N também tinham menor concentração de frutanos nos rizóforos do que as plantas que receberam doses inferiores de nitrato ($1,3 \text{ mmol L}^{-1}$), sugerindo que doses elevadas de nitrato inibiriam a síntese de frutanos. Contudo, resultados obtidos anteriormente (item 4.2) revelaram que plantas submetidas à concentração de 10 mM de nitrato apresentaram os mesmos resultados de Cuzzuol (2003) exceto no que se refere ao teor de frutanos. Desse modo, mais estudos deverão ser realizados em condições experimentais controladas, especialmente quanto à fase de desenvolvimento das plantas e amostragem do material a ser analisado.

Os resultados obtidos no presente trabalho, referentes ao crescimento, incremento de biomassa de rizóforos e força de dreno, permitem concluir que as plantas de *V. herbacea* podem ser cultivadas sob as três fontes de nitrogênio. Entretanto, recomenda-se inicialmente o uso de nitrato e, posteriormente, a aplicação da mistura nitrogenada, uma vez que, a longo prazo, o uso de amônio isoladamente, pode ter efeito tóxico, como relatado para várias outras espécies.

Figura 20 - Medidas de crescimento de plantas de *V. herbacea* tratadas com diferentes fontes de nitrogênio. Determinação realizada após T0 , 1 mês , 2 meses , 3 meses e 4 meses de tratamento. Os dados representam médias de seis repetições ($n=6$) e as barras representam o erro padrão. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos dentro de cada tempo

Figura 21 – Taxa de crescimento relativo (TCR), razão de área foliar (RAF) e taxa de assimilação líquida (TAL) em plantas de *V. herbacea* tratadas com diferentes fontes de nitrogênio. Nitrato ◆, amônio ● e nitrato + amônio ■. Os dados representam médias de seis repetições (n=6). Diferenças significativas entre os tratamentos, quando existentes, são indicadas por letras diferentes ($P < 0,05$)

Figura 22 – Força do dreno aparente em rizóforos de plantas *V. herbacea* tratadas com diferentes fontes de nitrogênio. Nitrato ◆, amônio ● e nitrato + amônio ■. Os dados representam médias de seis repetições (n=6). Diferenças significativas entre os tratamentos, quando existentes, são indicadas por letras diferentes ($P < 0,05$)

Figura 23 – Atividade da redutase do nitrato em folhas e rizóforos de plantas de *V. herbacea* tratadas com diferentes fontes de nitrogênio. Determinação realizada após T0 (hatched), 1 mês (dark grey), 2 meses (white), 3 meses (black) e 4 meses (light grey) de tratamento. Os dados representam médias de seis repetições (n=6) e as barras representam o erro padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos, quando existentes, são indicadas por letras diferentes ($P < 0,05$)

5 CONCLUSÕES

- Plantas de *V. herbacea* tratadas com N-limitado apresentaram maior biomassa aérea e subterrânea e maior conteúdo de frutanos do que as plantas tratadas com N-suficiente, não sendo possível confirmar que baixos níveis de nitrato limitaram o crescimento como relatado em outros trabalhos com plantas acumuladoras de frutanos (Cuzzuol, 2003; Améziane et al., 1995; Van den Ende et al., 1999).
- A melhor concentração de nitrato para o cultivo de *V. herbacea* foi 10 mM. Essa concentração promoveu o incremento da biomassa aérea e dos rizóforos, maior atividade de síntese de frutanos e conseqüentemente maior conteúdo de frutanos.
- Além dos frutanos, plantas de *V. herbacea* também acumulam, nos vacúolos dos rizóforos, concentrações altas de nitrato, quando a disponibilidade deste nutriente para a planta é elevada. Como a concentração de nitrato nesses órgãos é superior à encontrada nas folhas, esses órgãos foram considerados órgãos fonte para esse nutriente. A atividade da RN em folhas foi, em geral, um pouco mais elevada do que nos rizóforos. Assim as folhas foram consideradas órgãos dreno, em cujos tecidos ocorre preferencialmente a assimilação de nitrato.

- Plantas de *V. herbacea* podem ser cultivadas sob nitrato, amônio e a mistura de nitrato e amônio, uma vez que houve incremento de biomassa dos rizóforos, órgão no qual os frutanos são armazenados, sob essas três fontes de nitrogênio. Entretanto, recomenda-se o cultivo inicial com nitrato e, posteriormente, com a mistura nitrogenada, pois, mesmo que não observado neste trabalho, o amônio pode ter efeito tóxico a longo prazo, como encontrado na literatura para outras espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDAR, M.P.M.; SCHMIDT, S.; MOSS, G.; STEWART, G.R.; JOLY, C.A. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. **Plant, Cell and Environment**, v.26, p. 389–399, 2003
- AIRES, M.M. Fisiologia renal. In: AIRES, M.M. (Ed.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 495-476.
- ALBRECHT, G.; KAMMERER, S.; PRAZNIK, W.; WIEDENROTH, E.M. Fructan content of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) under hypoxia and following re-aeration. **New Phytologist**, v.123, p. 471-476, 1993.
- AMÉZIANE, R.; LIMAMI, M.A.; NOCTOR, G.; MOROT-GAUDRY, J.-F. Effect of nitrate concentration during growth on carbon partitioning and sink strenght in chicory. **Journal of Experimental Botany**, v.46, p.1423-1428, 1995.
- AMÉZIANE, R.; CASSAN, L.; DUFOSSÉ, C.; RUFTY Jr., T.W.; LIMAMI, M.A. Phosphate availability in combination with nitrate availability affects root yield and chicon yield and quality of Belgian endive (*Cichorium intybus*). **Plant and Soil**, v.191, p.269-277, 1997a.

- AMÉZIANE, R.; DELÉENS, E.; NOCTOR, G.; MOROT-GAUDRY, J.-F.; LIMAMI, M.A. 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**, v.48, p.25–33, 1997b.
- ARENS, K. As plantas lenhosas dos campos cerrados como flora adaptada as deficiências minerais do solo. In: Simpósio Sobre o Cerrado, São Paulo: EDUSP, 1963. p.265-349.
- ARNON, D.I.; STOUT, P.R. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. **Plant Physiology**, v.14, p. 371-375, 1939.
- ASEGA, A.F.; CARVALHO, M.A.M. Fructan metabolizing enzymes in rhizomes of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby upon excision of aerial organs. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p. 313-319, 2004.
- BACON, J.S.D.; LOXLEY, R. Seasonal changes in the carbohydrates of the Jerusalem artichoke tuber. **Biochemistry Journal**, v.51, p.208-213, 1952.
- BECKER, T.W.; PERROT-RECHENMANN, C.; SUZUKI, A.; HIREL, B. Subcellular and immunocytochemical localization of the enzymes involved in ammonia assimilation in mesophyll and bundle-sheath cells of maize leaves. **Planta**, v.191, p.129-136, 1993.
- BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reductase. **Annual Review of Plant Physiology**, v.20, p. 495-522, 1969.
- BHATIA, I.S.; MANN, S.K.; SINGH, R. Biochemical changes in the water soluble carbohydrates during the development of chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. **Journal of Science, Food and Agriculture**, v.25, p.535-539, 1974.

- BLOOM, A.J.; SUKAPANNA, S.S.; WARNER, R.L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, v.99, p. 1294-1301, 1992.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248–254, 1976.
- CAIRNS, A.J.; POLLOCK, C.J.; GALLAGHER, J.A.; HARRISON, J. Fructans: synthesis and regulation. In: LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T. D.; VON CAEMMERER, S. (Ed.). **Advances photosynthesis: physiology and metabolism**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. v.9, p. 301-320.
- CAO, W.; TIBBITIS, T.W. NH_4/NO_3 . Mixtures enhance growth in potatoes. **HortScience**, v. 27, n.6, p. 177, 1992.
- CARPITA, N.C.; KELLER, F.; GIBEAUT, D.M.; HOUSLEY, T.L.; MATILE, P. Synthesis of inulin oligomers in tissue slices, protoplasts and intact vacuoles of Jerusalem artichoke. **Journal of Plant Physiology**, v.138, p. 204-210, 1991.
- CARVALHO, M.A.M.; DIETRICH, S.M. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. **New Phytologist**, v.123, p. 735-740, 1993.
- CARVALHO, M.A.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Frutanos: ocorrência, estrutura e utilização, com ênfase em plantas do cerrado brasileiro. In: LAJOLO, F.W.; SAURACALIXTO, F.; WITTIG DE PENNA, E.; MENEZES, E.W. (Ed.). **Fibra dietética em Iberoamérica: tecnologia y salud**. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos: projeto CYTEDXI.6. São Paulo: Editora Varela, 2001 p. 77-89.

- CARVALHO, M.A.M.; DIETRICH, S.M.C.; ZAIDAN, L.B.P. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. **New Phytologist**, v.136, p. 153–161, 1997.
- CARVALHO, M.A.M.; PINTO, M.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, p. 275–280, 1998.
- CATALDO, D.A.; HAROON, M.; SCHRADER, L.E.; YONGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Annalysis**, v.6, p. 71–80, 1975.
- CHAPIN, F.S. III. The mineral nutrition of wild plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.11, p. 233-260, 1980.
- CHAPIN, F.S. III. Ecological aspects of plant mineral nutrition. In: TINKER, B.; LÄUCHLI, A. (Ed.). **Advances in plant nutrition**, New York: Praeger, 1988. v.3, p.161-191.
- COUSSEMENT, P.; FRANCK, A. New food application for inulin. **Agro-food-industry Hi-Tech**, v.9, p. 26–28, 1998.
- CORUZZI, G.; BUSH, D.R. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. **Plant Physiology**, v.125, p. 61–64, 2001.
- CRAWFORD, N.M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, v.7, p.859-868, 1995.
- CRAWFORD, N.M.; GLASS, A.D.M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science Reviews**, v.3, p. 389–395, 1998.

- CUZZUOL, G.R.F. Nutrição mineral no crescimento e no metabolismo de carboidratos solúveis em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. São Paulo, 2003. 179 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
- CUZZUOL, G.R.F.; CARVALHO, M.A.M.; BARBEDO, C.J.; ZAIDAN, L.B.P. Crescimento e conteúdo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas à adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p. 81–91, 2003.
- DE ROOVER, J.D.; VANDENBRANDEN, K.; VAN LAERE, A.; VAN den ENDE, W. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). **Planta**, v.210, p. 808-814, 2000.
- DIAS-TAGLIACOZZO, G.M.; DIETRICH, S.M.C.; MELLO-AIRENS, M. Measurement of glomerular filtration rate using prepared from *Vernonia herbacea*, a Brazilian native species. **Brazilian Journal of Medical**, v.29, p. 1393–1396, 1996.
- DYSSELER, P.; HOFFEM, D. Inulin, an alternative dietary fibre: properties and quantitative analysis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.49, p. 147-152, 1995.
- DOSE, M.M.; HIRASAWA, M.; KLEIS-SANFRANCISCO, S.; LEW, E.L.; KNAFF, D.B. The ferredoxin-binding site of ferredoxin: nitrite oxidoreductase. **Plant Physiology**, v.114, p. 1047–1053, 1997.
- DUNCAN, R.R.; BALIGAR, V.C. Genetic and physiological basis of nutrient uptake and use efficiency: an overview. In: DUNCAN, R.R.; BALIGAR, V.C. (Ed.). **Crops as enhancers of nutrient use**. New York: Academic Press, 1991. v.8, p. 238–282.

- EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructose polymers in plants. 4. β -fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. **Biochemical Journal**, v.93, p. 148–161, 1964.
- EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. **New Phytologist**, v.67, p. 517–531, 1968.
- EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review of Plant Physiology**, v.50, p. 641–664, 1999.
- FARRAR, J.F. Sink strength: what is it and how do we measure it? A summary. **Plant Cell and Environment**, v.16, p. 1047-1057, 1993.
- FELLIPE, G.M.; DALLE, J.E. The effects of phosphate supply on growth of plants from Brazilian Cerrado: experiments with seedlings of the annual weed, *Bibens gardneri* Baker (Compositae) and the tree, *Quaeta grandiflora* (Mart.) (Vochysiaceae). **Oecologia**, v.82, p. 81–86, 1990.
- FHEHNER, M; KELLER, F.; WIENKEN, A. Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplast of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.116, p. 197-208, 1984.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C.; CHU, E.P.; CARVALHO, M.A.M.; VIEIRA, C.C.J.; GRAZIANO, T.T. Reserve carbohydrate in underground organs of native Brazilian plants. **Revista Brasileira de Botânica**, v.9, p. 159-166, 1986
- FORDE, B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p. 219-235, 2000.

- FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C.; NEYRA, C.A. Seasonal pattern of nitrate reductase and nitrogenase activities. **Plant Physiology**, v.63, p. 421-424, 1979.
- FUKAI, K.; OHNO, S.; GOTO, K.; NANJO, F.; HARA, Y. Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Science and Plant Nutrition**, v.43, n.1, p. 171-177, 1997.
- GIBSON, G.R.; WILLIS, C.; LOO, J.V. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria: implications for healthy. **International Sugar Journal**. v. 96, n.1150, p. 381-387, 1994.
- GREY, D.; STEPAN-SARKISSAN, B.; POWCER, M.N. Biochemistry of forest tree species in culture. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordredcht: Kluwer Academic, 1987. v.2, p. 31-60.
- GRIME, J.P.; HUNT, R. Relative growth-rate: Its range and adaptive significance in a local flora. **Journal of Ecology**, v.63, p. 393-422, 1975.
- HARIDASSAN, M.; PINHEIRO, A.A.M.C.; TORRES, F.R.R. Resposta de algumas espécies do estrato rasteiro de um cerrado à calagem e à adubação. In: LEITE, L.L.; SAITO, C.H. (Ed.). **Contribuição ao conhecimento ecológico do cerrado**. Brasília: Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília, 1997. p. 87-91.
- HAVLIN, J.L.; BEATON, J.D.; TISDALE, S.L.; NELSON, W.L. **Soil fertility and fertilizers**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 499 p.

- HAYNES, R.J. Nitrification. In: CAMERON, K.C.; GOH, K.M.; SHERLOCK, R.R. (Ed.). **Mineral nitrogen in the plant-soil system**. Orlando : Academic Press, 1986. p.127-164.
- HENDRY, G.A.F.; WALLACE, RK. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: SUZUKI, M.; CHATTERTON, J.N. (Ed.). **Science and technology of fructans**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 119- 39.
- HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M. Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. **Biochemical Society Transactions**, v.19, p. 561-565, 1991.
- HINCHA, D.K.; HELLWEGW, E.M.; HEYER, A.G.; CROWE, J. H. Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p. 535-534, 2000.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. California: California Agricultural Experimental Station, 1950. 32p. (Circular, 347).
- HUNT, R. **Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis**. London: Edward Arnold, 1982.
- HUNT, R.; CAUSTON, D.R.; SHIPLEY, B.; ASKEW, A.P. A modern tool for classical plant growth analysis. **Annals of Botany**, v.90, p. 485-488, 2002.
- INCOLL, L.D.; BONNET, G.D. Fructan in the compositae – a short review. In: CALIGARI, P.D.S.; HIND, D.J.N. (Ed.). **Compositae: biology & utilization**, Kew: Proceedings of the International Compositae Conference, 1996. v.2, p. 401-413.

- ISEGIMA, E.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C. Fructan variation in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae): the influence of phenology. **Plant and Cell Physiology**, v.34, p. 723–727, 1993.
- ISEGIMA, E.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.; ZAIDAN, L.B.P. Fructan composition in adventitious tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by daylength. **New Phytologist**, v.119, p. 149-154, 1991.
- JERMYN, M.A. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. **Nature**, v.177, p. 38-39, 1956.
- KAISER, W.M.; HUBER, S.C. Post-translation regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p. 1981–1989, 2001.
- KIM, S-H.; MIZUNO, K.; SAWADA, S.; FUJIMARA, T. Regulation of tuber and ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by nitrate. **Plant Growth Regulation**, v.37, p. 207–213, 2002.
- KISSMAN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: Basf Brasileira, 1992. 798 p.
- KOOPS, A.J.; JONKER, H.H. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* “Colombia”: II Purification of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferases and reconstitution of fructan synthesis *in vitro* with purified sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and fructan: fructan 1-fructosyltransferase. **Plant Physiology**, v.110, p. 1167–1175, 1996.
- LAMBERS, J.; CHAPIN, F.S.; PONS, T.L. **Plant physiological ecology**. New York: Springer-Verlag, 1998. 540 p.

- LAMBERS, J.; POORTER, H. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. **Advances in Ecological Research**, v.23, p. 187-261, 1992.
- LEA, P.J.; BLACKWELL, R.D.; JOY, K.W. Ammonia assimilation in higher plants. In: K. Mengel; D.J. Pilbeam (Ed.). **Nitrogen metabolism of plants**. Oxford: Clarendon, 1992. p. 153-186.
- LEWIS, D.H. Occurrence and distribution of carbohydrates in vascular plants. In: LEWIS, D.H. (Ed.). **Storage carbohydrates in vascular plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1984. p. 1-52.
- LILLO, C. Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. **Physiologia Plantarum**, v.90, p. 616-620, 1994.
- LIVINGSTON, D.P.; CHATTERTON, N. J.; HARRISON, P.A. Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena spp*). **New Phytologist**, v.123, p. 725-734, 1993.
- LIVINGSTON, D.P.; HENSON, C.A. Apoplastic sugars, fructan exohidrolase, and invertase in winter oat: response to second-phase cold hardening. **Plant Physiology**, v.116, p. 403-408, 1998.
- LUSCHER, M.; ERDIN, C.; SPRENGER, N.; HOCHSTRASSER, U.; BOLLER, T.; WIEMKEM, A. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus*. **FEBS Letters**, v.385, p. 39-42, 1996.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Princípios, métodos e técnicas de avaliação. In: **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo**. Avaliação do estado nutricional das plantas. Piracicaba, 1997. p. 55-114.

- MANTOVANI, W.; MARTINS, F.R. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.11, p. 101–112, 1988.
- MANTOVANI, W. Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, São Paulo, 1983. 147 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
- MARCELIS, L.F.M. Sing strenght as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. **Journal of Experimental Botany**, v.47, p. 1281-1291, 1996.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. Orlando: Academic Press, 1995, 649 p.
- MEIER, H.; REID, J.S.G. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: LOEWUS, F.A.; SRINGER-VERLAG, W. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. Heidelberg: Springer-Verig, 1982. v.13A, p. 4
- MEEKER, G.B.; PURVIS, A.C.; MEYRA, C.A.; HAGEMAN, R.H. Uptake and accumulation of nitrate as a major factor in the regulation of nitrate reductase activity in corn (*Zea mays* L.) leaves: Effects of high ambient CO₂ and malate. IN: Mechanism of regulation of plants growth. **The Royal Society of New Zealand Wellington**. Bulletin, v.12, p. 45-58, 1974.
- MELLO, J.T. Respostas de espécies arbóreas do cerrado a nutrientes em latossolo vermelho escuro. Brasília, 1999. 149 p. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília.

- MEURIOT, F.; AVICE, J-C.; DECAU, M-L.; SIMON, J-C.; LAINÉ, P.; VOLENEC, J.J.; OURRY, A. Accumulation of N reserves and vegetative storage protein (VSP) in taproots of non-nodulated alfafa (*Medicago sativa* L.) are affected by mineral N availability. **Plant Science**, v.165, p. 709-718, 2003.
- MORAES, D.D.A. Resposta de algumas espécies arbóreas nativas do cerrado à adubação e calagem. Brasília, 1994. 89 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília.
- MORCUENDE, R.; KOSTADINOVA, S.; PÉREZ, P.; MARTÍN DEL MOLINO, M.; MARTÍNEZ-CARRASCO, R. Nitrate is a negative signal for fructan synthesis, and the fructosyltransferase-inducing trehalose inhibits nitrogen and carbon assimilation in excised barley leaves. **New Phytologist**, v.161, p. 749–759, 2004.
- NELSON, C. J.; SPOLLEN, W. G. Fructans. **Physiologia Plantarum**, v.71, p. 512–516, 1987.
- NICOLOSO, F.T.; FOGAÇA, M.A.F.; ZANCHETTI, F.; MISSIO, E.L., FORTUNATO, R. P. Exigências nutricionais da grápia (*Apueia leicarpa* Vog. Macbride) em solo podzólico vermelho amarelo – níveis de nitrogênio, fósforo e potássio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, p. 157-159, 1990.
- NIEVOLA, C.C.; MERCIER, H. Variações diurnas da atividade *in vivo* da redutase do nitrato em abacaxizeiro (*Ananas comosus* L.) Merr. Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, n.3, p. 295-301, 2001.

- NILSSON, U.; OSTER, R.; JÄGERSTAD, M.; BIRKHED, D. Cereal fructans: *in vivo* studies on availability in rat and humans. **The Journal of Nutrition**, v.118, p.1325-1330, 1988.
- OAKS, A. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. **Canadian Journal of Botany**, v.72, p. 739–750, 1994.
- PAULILO, M.T.S.; FELIPPE, G. Resposta de plântulas de *Quaeta grandiflora* Mart., uma espécie arbórea de cerrado, à adição de nutrientes minerais. **Revista Brasileira de Botânica**, v.18, p. 109–112, 1995.
- PENSON, S.P.; CAIRNS, A. J. Fructan biosynthesis in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.): comparison of *de novo* synthesis *in vivo* and *in vitro*. **New Phytologist**, v.128, p. 395–402, 1994.
- PEREIRA, P.A.A.; BALDANI, J.I.; BLANA, R.A.G.; NEYRA, C.A. Assimilação e translocação de nitrogênio em relação a produção de grãos e proteínas em milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Ciências do solo**, v.5, p. 28–31, 1981.
- PILON-SMITS, E.A.H.; TERRY, N.; SEARS, T.; VAN DUN, K. Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, p. 313–317, 1999.
- PILON-SMITS, E.A.H.; EBSKAMP, M.J.M.; PAUL, M.J.; JEUKEN, M. J. W.; WEISBEEK, P.J.; SMEEKENS, S.C.M. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. **Plant Physiology**, v.107, p. 125–130, 1995.

- PIMENTEL, C. **Metabolismo de carbono na agricultura tropical**. Rio de Janeiro: EDUR, 1998. 159 p.
- POLLOCK, C.J. Fructan and metabolism of sucrose in vascular plants. **New Phytologist**, v.104, p. 1–24, 1986.
- POLLOCK, C.J.; CHATTERTON, N.J. Fructan. In: PREISS, J. (Ed.). **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1988. v.14, p. 109–140.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J. Fructan metabolism in grasses and cereals. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.42, p.77–101, 1991.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J.; SIMS, I.M.; HOUSLEY, T.L. Fructans reserve carbohydrates in crop plants. In: ZAMSKI, E.; SHAFFER, A.A. (Ed.). **Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 97–113.
- POORTER, H.; NAGEL, O. The role 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**, v. 27, p. 595–607, 2000.
- POORTER, H. Plant growth and carbon economy. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–6, 2002. <http://www.els.net>. (20 nov. 2004).
- PRUD'HOMME, M.P.; GASTAL, F.; BELANGER, G.; BOUCAUD, J. Temperature effects on partitioning of ¹⁴C assimilates in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). **New Phytologist**, v.123, p. 255–261, 1993.

- RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: CERES, 1991. 343 p.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 728.
- RENÓ, N.B.; SIQUEIRA, J.O.; CURI, N.; VALE, F.R. Limitações nutricionais ao crescimento inicial de quatro espécies arbóreas nativas em Latossolo Vermelho-Amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p. 17–25, 1997.
- RICHTER, J.H.; TERRY, J.A. Metabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. (Trad. De RAYMOND, G.). **Press polytechniques et universitaires romandes**. Lausanne: s. ed. 1993. s. v.
- ROBERFROID, M.B.; BORNET, F.; BOULEY, C.; CUMMINGS, J.H. Colonic microflora: nutrition and health. **Nutrition Reviews**, v.53, p. 127–130, 1995.
- SAMART, D.R.; CHATTERTON, N. J.; BUGBEE, B. The influence of elevated CO₂ on non-structural carbohydrate distribution and fructan accumulation in wheat canopies. **Plant Cell and Environment**, v.17, p. 435–422, 1994.
- SASSAKI, R.M.; FELIPPE, G.M. Response of *Dalbergia miscolobium* Benth. Seedlings, a cerrado tree species, to mineral nutrients supply. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, p. 65–72, 1998.
- SCHITTENHELM, S. Agronomic performance of root chicory, Jerusalem artichoke, and sugarbeet in stress and nonstress environments. **Crop Science**, v.39, p. 1815–1823, 1999.
- SCHUBERT, S.; FUERLE, R. Fructan storage in tubers of Jerusalem artichoke characterization of sink strength. **New Phytologist**, v.136, p. 115–122, 1997.

- SIVASANKAR, S.; OAKS, A. Nitrate assimilation in higher plants: the effects of metabolites and light. **Plant Physiology**, v.34, p. 609-620, 1996.
- SILVEIRA, J.A.G.; MACHADO, E.C. Mobilização de nitrogênio e de carboidratos durante o desenvolvimento de panículas de duas cultivares de arroz. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.2, p. 37–46, 1990.
- SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v.160, p. 61–63, 1945.
- SPRENT, J.I. Nitrogen acquisition systems in the Leguminosae. In: SPRENT, J. I.; Mckey, D. (Ed.). **Advances in legume systematics. The Nitrogen factor**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1994, v.5, p. 1–16.
- STEWART, G.R.; SCHMIDT, S. Evolution and ecology of plant mineral nutrition. In: PRESS, M.C.; SCHOLLES, J.D.; BARKER, M.G.; (Ed.). **Physiological Plant Ecology**. England: Blackwell Science, 1998. p. 91-113.
- STEWART, G.R.; POPP, M.; HOLZAPFEL, I.; STEWART, J.I.; DICKIE-ESKEW, A. Localization of nitrate reduction internodes and its relationship to environmental and physiological characteristics. **New Phytologist**, v.104, p. 373–384, 1986.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719 p.
- TEIXEIRA, P.G.; CARVALHO, M.A.M.; ZAIDAN, L.B.P.; KLEIN, A.L. Effect of mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p. 89–96, 1997.
- TERTULIANO, M. F.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. **New Phytologist**, v.123, p.741–749, 1993.

- TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, v.23, p. 1005–1024, 2000.
- TSUKINHASHI, T.; ASAMI, T.; MINASAWA, K.; KUBOTA, M. Effect of nitrogen and potassium fertilizer on the growth and yield of yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Vocacional Agriculture**, v. 38, p. 50–56, 1991.
- TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology october**, 1994, p. 61-65.
- VAN den ENDE, W.; VAN LAERE, A. De-novo synthesis of fructans from sucrose *in vitro* by a combination of two purified enzymes (sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and fructan: fructan 1-fructosyltransferase) from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). **Planta**, v. 200, p. 335-342, 1996.
- VAN den ENDE, W.; MICHIELS, A.; DE ROOVER, J.; VAN LAERE, A. A fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. **The Scientific World Journal**, v.2, p. 1281–1295, 2002.
- VAN den ENDE, W.; ROOVER, J.De.; VAN LAERE, A. Effect of nitrogen concentration of fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). **Physiologia Plantarum**, v.105, p. 2–8, 1999.
- VEEN, B.W.; KLEINENDORST, A. Nitrate accumulation and osmotic regulation in italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) **Journal of Experimental Botany**, v.36, p. 211–218, 1984.
- VEREYKEN, I.J.; ALBERT VAN KUIK, J.; EVERS, T. H.; RIJKEN, P. J.; KRUIJFF, B. Structural requirements of the fructan-lipid interaction. **Biophysical Journal**, v.84, p.3147–3154, 2003.

- VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Fructose containing carbohydrates in tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hill. (Amaranthaceae) at different phenological phases. **Plant Cell and Environment**, v.16, p. 919–928, 1993.
- VILELA, D.M.V.; HARIDASSAN, M. Response of the ground layer community of cerrado vegetation in central Brazil to limiting and irrigation. **Plant and Soil**, v.163, p. 25–31, 1994.
- VINJ, I.; SMEEKENS, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? **Plant Physiology**, v.120, p. 351–359, 1999.
- WANG, C.; TILBERG, J.-E. Effects of nitrogen deficiency on accumulation of fructan and fructan metabolizing enzyme activities in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). **Physiologia Plantarum**, v.97, p. 339–345, 1996.
- WANG, C.; TILBERG, J.-E. Effects of short-term phosphorus deficiency on carbohydrate storage in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). **New Phytologist**, v.136, p.31–135, 1997.
- WANG, C.; VAN den ENDE, W.; TILBERG, J.-E. Fructan accumulation induced by nitrogen deficiency in barley leaves correlates with the level of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase mRNA. **Planta**, v.211, p. 701–707, 2000.
- WARNER, R.L.; KLEINHOF, A. Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v.85, p. 245–252, 1992.
- WEI, J.Z.; CHATERTON, N.J.; LARSON, S.R. Expression of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) and myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS) genes in barley (*Hordeum vulgare*) leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p. 635–643, 2001.