

VANESSA FÁTIMA DE OLIVEIRA

**Interação entre a atmosfera enriquecida em
CO₂ e o déficit hídrico:
efeitos no metabolismo de frutanos em duas
espécies de Asteraceae do cerrado**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2012

VANESSA FÁTIMA DE OLIVEIRA

**Interação entre a atmosfera enriquecida em
CO₂ e o déficit hídrico:
efeitos no metabolismo de frutanos em duas
espécies de Asteraceae do cerrado**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Oliveira, Vanessa Fátima de

O48i Interação entre a atmosfera enriquecida em CO₂ e o déficit hídrico: efeitos no metabolismo de frutanos em duas espécies de Asteraceae do cerrado / Vanessa Fátima de Oliveira -- São Paulo, 2012.

99 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2012

Bibliografia.

1. Inulina. 2. Estresse hídrico. 3. Carboidratos. I. Título

CDU: 547.455.65

Aos meus pais, Celso e Lúcia

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Angela Machado de Carvalho por esses 9 anos de orientação, confiança, paciência, amizade e principalmente por ser esse exemplo de profissional a ser seguido. Meu muito obrigado por todos esses anos de convivência!

Ao Dr. Emerson Alves da Silva pela co-orientação, sugestões nas discussões, na interpretação dos dados de correlação e por me apresentar esse mundo do déficit hídrico. Também não esquecerei pela ajuda na busca por *Vernonias* em meio a espécies invasoras no cerrado! Meu muito obrigado!

À Dra. Lilian Beatriz Penteado Zaidan pela colaboração, leitura crítica dos trabalhos e ensinamentos nesses anos de convivência.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa Reserva Biológica de Mogi Guaçu, em especial aos responsáveis pela reserva João del Giudice Neto e Marcos Mecca Pinto, e aos funcionários Mara, Paulo e Samuel pela atenção e pronto atendimento quando necessário.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica Ana Alice, Maria Aparecida, Mary e Pedro pelas ajudas nos momentos de sufoco burocrático.

Ao Núcleo de Pesquisa em Sementes pelo uso do psicrômetro de ponto de orvalho (Modelo Decagon WP4).

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Botânica pelas facilidades oferecidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (07/59782-7) e apoio financeiro ao projeto temático (05/04139-7).

Aos amigos e companheiros do NP Fisiologia e Bioquímica pelos momentos de alegria e agradável convivência no laboratório.

À todos que ajudaram na maceração das minhas amostras no nitrogênio líquido. Meu muito obrigada! Com certeza eu não teria terminado esse trabalho a tempo sem a ajuda de vocês!

Aos meus amigos Paulo, Kelly, Leonardo, Marcos, Patrícia, Amanda Top., Amanda A. e Aline que souberam compreender a minha ausência nos últimos tempos.

À minha família, pela compreensão e paciência durante a realização desse trabalho.

À Deus, pelo suporte nos momentos de fraqueza.

À todos, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Resumo.....	vi
Abstract	vii
1. Introdução	1
2. Objetivo	12
3. Material e métodos	13
3.1 Material vegetal e condições de cultivo	13
3.1.1 Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração elevada de CO ₂ no metabolismo de frutanos em <i>Viguiera discolor</i>	15
3.1.2. Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração atmosférica elevada de CO ₂ no metabolismo de frutanos em <i>Vernonia herbacea</i> – estudo comparativo em duas estações: primavera e inverno.....	16
3.1.3. Efeito conjunto de diferentes regimes de regas e da concentração elevada de CO ₂ no metabolismo de frutanos em <i>Vernonia herbacea</i>	17
3.2 Umidade e potencial hídrico do solo (Ψ_{wsolo})	18
3.3 Potencial hídrico da parte aérea (Ψ_{wpa}) e dos órgãos subterrâneos de reserva (Ψ_{wsub})	19
3.4 Medidas de trocas gasosas	19
3.5 Conteúdo de água (%)	20
3.6 Extração enzimática	20
3.6.1 Ensaio enzimático	20
3.6.2 Análise das atividades enzimáticas	21
3.7 Extração de carboidratos solúveis	21
3.7.1 Análise quantitativa de carboidratos	22
3.8 Análise estatística	22
4. Resultados	23
4.1 Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração elevada de CO ₂ no metabolismo de frutanos em <i>Viguiera discolor</i>	23
4.2 Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração atmosférica elevada de CO ₂ no metabolismo de frutanos em <i>Vernonia herbacea</i> – estudo comparativo em duas estações: primavera e inverno	34
4.3 Efeito conjunto de diferentes regimes de regas e da concentração elevada de CO ₂ no metabolismo de frutanos em <i>Vernonia herbacea</i>	53
5. Discussão	64

5.1 Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração elevada de CO ₂ no metabolismo de frutanos em <i>Viguiera discolor</i>	64
5.2 Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração atmosférica elevada de CO ₂ no metabolismo de frutanos em <i>Vernonia herbacea</i> – estudo comparativo em duas estações: primavera e inverno	66
5.3 Efeito conjunto de diferentes regimes de regas e da concentração elevada de CO ₂ no metabolismo de frutanos em <i>Vernonia herbacea</i>	70
6. Considerações finais	73
7. Referências bibliográficas	75
Anexos	82

Resumo

Estudos recentes prevêem aumento na concentração de CO₂ atmosférico e, conseqüentemente, mudanças nos padrões de precipitação já para o final desse século. Alguns modelos climáticos sugerem que na América do Sul haverá longos períodos de seca, o que poderá levar a uma substituição de parte da Floresta Amazônica por cerrado. A vegetação desse bioma caracteriza-se por apresentar uma série de estratégias adaptativas para superar condições adversas, como por exemplo, a estiagem no inverno. Dentre essas estratégias, grande parte da vegetação herbácea apresenta diversos tipos de órgãos subterrâneos de reserva que conferem sobrevivência a condições extremas de temperatura e seca, como, por exemplo, os frutanos presentes nas raízes tuberosas de *Viguiera discolor* e nos rizóforos de *Vernonia herbacea*, asteráceas perenes nativas do cerrado que acumulam frutanos do tipo inulina. Frutanos são polímeros de frutose originados da sacarose, sintetizados pela enzima sacarose: sacarose frutossiltransferase (SST), que catalisa a formação do trissacarídeo 1-cestose a partir de duas moléculas de sacarose, e pela frutano: frutano frutossiltransferase (FFT), responsável pelo alongamento da cadeia. A despolimerização dos frutanos se dá pela ação da enzima frutano-exohidrolase (FEH). Poucos trabalhos têm considerado as respostas de plantas aos efeitos combinados do déficit hídrico no solo e da alta [CO₂]_{atm}. Sob essas condições, os autores sugerem que o alto CO₂ mitiga os efeitos observados em plantas sob déficit hídrico quando comparadas àquelas mantidas sob déficit hídrico e atmosfera atual, e que essas respostas variam de acordo com a espécie estudada. Nesse trabalho foram realizados três estudos com o objetivo de se avaliar os efeitos desses dois estresses nas trocas gasosas, no status hídrico, no crescimento e no metabolismo de frutanos em *V. herbacea* e *V. discolor*. Para isso, o déficit hídrico foi aplicado por suspensão total de regas e por diminuição gradual da disponibilidade hídrica, em condições elevadas e ambientais de CO₂. De modo geral, os resultados obtidos demonstram, ao longo do *continuum* solo-plantas, uma relação de dependência entre os parâmetros avaliados e a disponibilidade hídrica, independente da concentração de CO₂ e da espécie estudada. Embora o alto CO₂ tenha diminuído a condutância estomática, como verificado em *V. herbacea*, isso não foi observado em plantas de *V. discolor*, o que ocasionou a rápida diminuição do conteúdo de água nos vasos em plantas submetidas à suspensão de regas. No estudo comparativo entre as duas estações do ano, realizado com *V. herbacea*, fica clara a diferença nas respostas hídricas entre o inverno e a primavera, embora isso não tenha sido verificado em plantas sob alto CO₂. Esse resultado parece estar relacionado com a própria sazonalidade climática característica do cerrado. Sob diferentes níveis de disponibilidade hídrica, as maiores alterações foram verificadas nas plantas sob 25% em ambas as concentrações de CO₂, que apresentaram respostas semelhantes às plantas sob suspensão de regas. Nos demais níveis de reposição de água, em ambas as concentrações de CO₂, verificou-se que as plantas aclimataram-se às novas condições por manterem valores de atividade das enzimas do metabolismo de frutanos e do conteúdo desses carboidratos próximos aos de plantas controle. Os resultados obtidos com *V. herbacea* e *V. discolor* demonstram que o alto CO₂ causou um atraso na mobilização de frutanos em plantas sob déficit hídrico para manutenção de seu metabolismo, fazendo uso primeiramente do carbono em excesso, possivelmente proveniente da fotossíntese, sugerindo que a presença de órgãos de reserva subterrâneos que armazenam frutanos poderá conferir um maior sucesso adaptativo às novas condições hídricas sob elevado CO₂.

Abstract

Recent studies predict increases in the concentration of atmospheric CO₂ and, consequently, changes in the distribution pattern of precipitation towards the end of this century. Climatic models suggest that there will be long drought periods in South America, which might lead to a substitution of part of the Amazon Forest into Cerrado. The cerrado vegetation is characterized by a series of adaptive strategies to undergo adverse conditions, such as the winter drought. Among these strategies, a high number of herbaceous species bear underground reserve organs that allow survival of the plants to extreme temperature and drought conditions due to their reserve substances, such as fructans, carbohydrates stored in the tuberous roots of *Viguiera discolor* and in rhizophores of *Vernonia herbacea*, native perennial herbaceous Asteraceae of the cerrado, which accumulate inulin-type fructans. Fructans are fructose polymers originated from sucrose and synthesized by the combined action of sucrose:sucrose fructosyltransferase (SST) that catalyses the formation of a trisaccharide 1-kestose from two sucrose molecules and of fructan:fructan fructosyltransferase (FFT), responsible for chain elongation. Fructan depolymerization occurs by the action of fructan exohydrolase (FEH). Very few reports have considered the responses of plants to the combined effects of soil water deficit and high (CO₂)_{atm}. Under such conditions, authors suggest that the high CO₂ mitigate the effects of water deficit when compared to the plants kept under water deficit and the normal CO₂ concentration, and that the responses are species-specific. In the present study, three experiments were undertaken aiming to evaluate the effects of these two stress factors on plant gas exchange, water status, growth and fructan metabolism in *V. herbacea* and *V. discolor*. The water deficit was imposed using both the complete water suppression and the gradual water suppression strategies, under ambient (~380ppm) and elevated (~760 ppm) CO₂ concentrations. Generally, it was demonstrated that throughout the *continnum* soil-plant, there is a dependent relation among the evaluated parameters and water availability, independently of the species and of the CO₂ concentration assayed. Although the high CO₂ caused the decrease in stomatal conductance, as detected in *V. herbacea*, this was not observed in *V. discolor*, thus causing a fast decrease in water content of soil from plants submitted to water suppression. In the comparative study performed during two seasons, spring and winter, with *V. herbacea*, the differences in the responses of the water status between them were clearly detected in the ambient CO₂, however not detected under high [CO₂]. This result seems to be related with the climatic seasonality of the cerrado. Under different water reposition levels, the main changes were detected in plants under 25% of water “reposition” in both CO₂ concentrations. Under this condition the responses of plants were similar to the responses observed in plants under total water suppression. Under 50 and 75% of water “reposition” and under both CO₂ concentrations, plants seemed to have acclimated to the new water status, since they maintained the levels of enzyme activity and fructan contents similar to levels detected in control plants. The results obtained with *V. herbacea* and *V. discolor* demonstrate that high CO₂ caused a delay in the mobilization of fructans in plants under drought to maintain their metabolism, using first the excess carbon, possibly from the photosynthesis, suggesting that the presence of underground reserve organs that can store fructans give a greater adaptive success to the new hydric conditions at high CO₂.

1. INTRODUÇÃO

O aumento nos gases causadores do efeito estufa (GEE), em decorrência, principalmente, da queima de combustíveis fósseis, utilizados como fonte de energia, e das mudanças no uso do solo, tem sido destacado nos últimos anos no meio científico e também nos meios de comunicação. Amostras de ar fóssil aprisionadas em testemunhas de gelo antártico, mostraram aumento de aproximadamente 25% nos níveis atmosféricos de dióxido de carbono (CO₂), além do aumento nos níveis de metano (CH₄) e óxidos nítricos (NO_x), quando comparados aos teores pré-industriais dos últimos 400 mil anos (Petit *et al.* 1999).

Medidas em tempo real da concentração de CO₂ atmosférico realizadas em Mauna Loa, Havaí (EUA), mostraram que entre 1959 e 2002 houve um aumento de 55 ppm (partes por milhão) de CO₂ (Keeling & Whorf 2002 *apud* Körner 2006) (figura 1). Previsões estimam que, em 2075, os níveis atmosféricos de CO₂ estarão próximos de 720 ppm (Houghton *et al.* 1996). Segundo dados do relatório de 2007 do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (do inglês - IPCC), a concentração de CO₂ aumentou no período de 1995 a 2005, em média, 1,9 ppm por ano. Em dezembro de 2011, segundo dados do Laboratório de Pesquisa do Sistema Terra (ESRL 2011), órgão do governo dos Estados Unidos, a concentração de CO₂ atmosférico atingiu o valor de 391,80 ppm, cerca de 2 ppm superior ao valor obtido em dezembro de 2010.

O aumento de CO₂, acompanhado de outros GEE, poderá elevar a temperatura global de 1,4 a 5,8 °C e modificar os padrões de precipitação nos próximos 100 anos, levando ao aumento do déficit hídrico no solo em áreas extensas do planeta (Baker *et al.* 1997, Houghton *et al.* 2001, Naumburg *et al.* 2004). Os modelos climáticos sugerem que na América do Sul haverá aumento da precipitação, entretanto esse fenômeno estará limitado a poucos meses do ano, conferindo longos períodos de seca nessa região (IPCC 2007).

Nas plantas, o elevado CO₂ atmosférico promove, em geral, um aumento na taxa fotossintética, maior crescimento, biomassa e eficiência do uso da água (EUA), acompanhados pela diminuição da condutância estomática e transpiração (Körner 2006). Em plantas sob déficit hídrico e sob as condições atmosféricas atuais (~ 380 ppm de CO₂), os principais processos fisiológicos afetados são a abertura estomática, a fotossíntese do mesófilo e, por extensão, o seu crescimento. Entretanto, tais efeitos dependem da espécie em questão bem como da intensidade e duração do déficit hídrico imposto (Chaves e Pereira 1992). Essas respostas, aliadas às previsões para esse século das mudanças no regime hídrico e na concentração de CO₂, sugerem que haverá uma mudança na composição da vegetação (IPCC 2007).

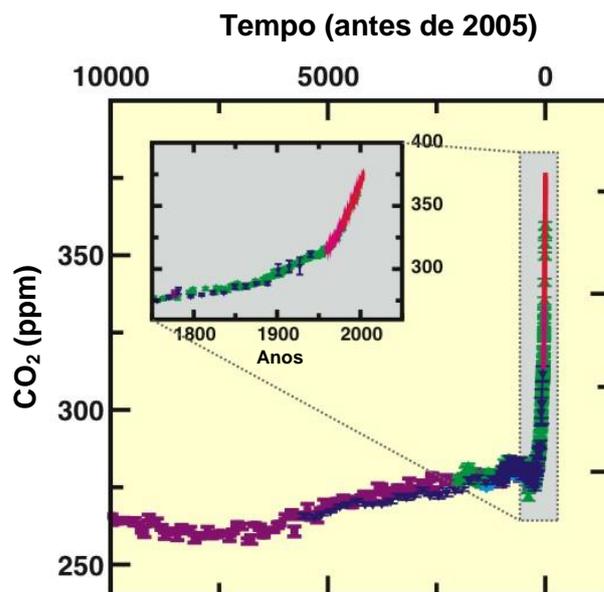


Figura 1. Concentração atmosférica de dióxido de carbono (CO_2) durante os últimos 10.000 anos. No detalhe dados obtidos a partir de 1750. Símbolos de diferentes cores referem-se a dados obtidos de diferentes testemunhas de gelo e a linha rosa refere-se a amostras de ar atmosférico (IPCC 2007, modificado).

No Brasil, por exemplo, prevê-se que haverá uma substituição de parte da Floresta Amazônica por Cerrado (IPCC 2007), bioma marcado por duas estações bem definidas – verão chuvoso e inverno seco (Coutinho 2002). A vegetação deste bioma, por sua vez, apresenta crescimento sazonal e uma série de estratégias adaptativas para superar condições adversas como o fogo, a seca e o estresse nutricional característico do Cerrado. Dentre essas estratégias, inclui-se a presença massiva de órgãos subterrâneos espessados em plantas herbáceas que atravessam períodos de acúmulo de fotoassimilados durante o seu desenvolvimento (Mantovani & Martins 1988). Cerca de 60% das espécies herbáceas de Asteraceae ocorrentes em uma área de cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu, São Paulo, acumulam grande parte dos fotoassimilados na forma de frutanos (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993, Carvalho *et al.* 2007).

Frutanos são polímeros de frutose lineares ou ramificados, originados da sacarose, que ocorrem como compostos de reserva em aproximadamente 15% das Angiospermas, incluindo espécies de ordens evoluídas e economicamente importantes, como Asterales e Poales. Dentre as monocotiledôneas que acumulam frutanos encontram-se principalmente as Poaceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Iridaceae e Agavaceae e entre as dicotiledôneas, os frutanos são encontrados em espécies de Campanulaceae, Lobeliaceae, Stylidiaceae e em aproximadamente 25000 espécies de Asteraceae (Hendry & Wallace 1993). Também são

encontrados em briófitas, algas, fungos e bactérias, razão pela qual Hendry (1993) sugeriu a origem polifilética do metabolismo de frutanos.

A maioria das espécies ricas em frutanos encontra-se fora da região tropical, sendo mais abundantes em regiões onde o crescimento é sazonal. A expansão da flora que contém frutanos coincidiu com o aparecimento de episódios de seca e, particularmente, com a seca sazonal, durante o Eoceno-Mioceno. A flora do Mioceno caracterizou-se pelo aparecimento e expansão das vegetações de savana e de cerrado em regiões quentes (Hendry & Wallace 1993). Não existe uma evidência que associe a expansão da flora que contém frutanos a episódios prolongados de frio. A distribuição geográfica desta flora parece estar mais relacionada à presença de um regime sazonal de chuvas, como ocorre nas savanas tropicais, por exemplo.

Os frutanos consistem de séries homólogas de oligo- e polissacarídeos não redutores, onde cada membro da série contém um resíduo de frutose a mais que o membro anterior (Edelman & Jefford 1968). Esses polímeros de D-frutose apresentam um resíduo de D-glucose geralmente localizado na extremidade da cadeia, unido por uma ligação do tipo α -1,2 como na sacarose. O frutano mais simples é um monofrutosil sacarose, um trissacarídeo.

São conhecidos três isômeros desse trissacarídeo, que diferem entre si pela ligação da frutose a um dos grupos hidroxila da sacarose. Segundo Pollock *et al.* (1996 e referências ali contidas), a 1-cestose (1-F-frutosil sacarose, α -glu-1,2- β -fru-1,2-fru) foi o primeiro a ser caracterizado por Bell e colaboradores e é encontrada em todas as espécies que acumulam frutanos. A 6-cestose (6-F-frutosil sacarose, α -glu-1,2- β -fru-6,2-fru) apresenta o resíduo terminal de frutose ligado ao carbono 6 da frutose, e a neocestose (6-G-frutosil sacarose, β -fru-2,6- α -glu-1,2-fru) apresenta os dois resíduos de frutose ligados à glucose. Assim, a 1-cestose e a 6-cestose possuem uma glucose e uma frutose terminais, enquanto a neocestose apresenta a glucose interna. Baseando-se nos três trissacarídeos e no tipo de ligação glicosídica predominante entre as unidades de frutose, β -2,1 ou β -2,6, cinco tipos diferentes de estruturas de frutanos podem ser distinguidos em plantas superiores (Pollock *et al.* 1996, Ritsema & Smeekens 2003), conforme descrito abaixo e mostrado na figura 2:

- inulina, molécula linear baseada no trissacarídeo 1-cestose, com ligações β -2,1 entre os resíduos de frutose, encontrado principalmente em Asterales (ex.: *Helianthus tuberosus* L.);
- levano, molécula linear baseada na 6-cestose, com ligações β -2,6 entre os resíduos de frutose, característico de Poales (ex.: *Phleum pratense* L.);

- frutanos com ligações mistas, dos tipos β -2,1 e β -2,6, e cadeias ramificadas, com glucose na extremidade da cadeia, também encontrado em Poales (ex.: *Bromus*, *Triticum*);
- frutanos baseados na neocestose ou neosérie da inulina, com ligações β -2,1 entre os resíduos de frutose, encontrado em Liliaceae (ex.: *Asparagus*, *Allium* e alguns membros das Poales) e
- frutano baseado em neocestose ou neosérie do levano, com ligações β -2,6 entre os resíduos de frutose, presente em alguns membros de Poales (ex.: *Avena*).

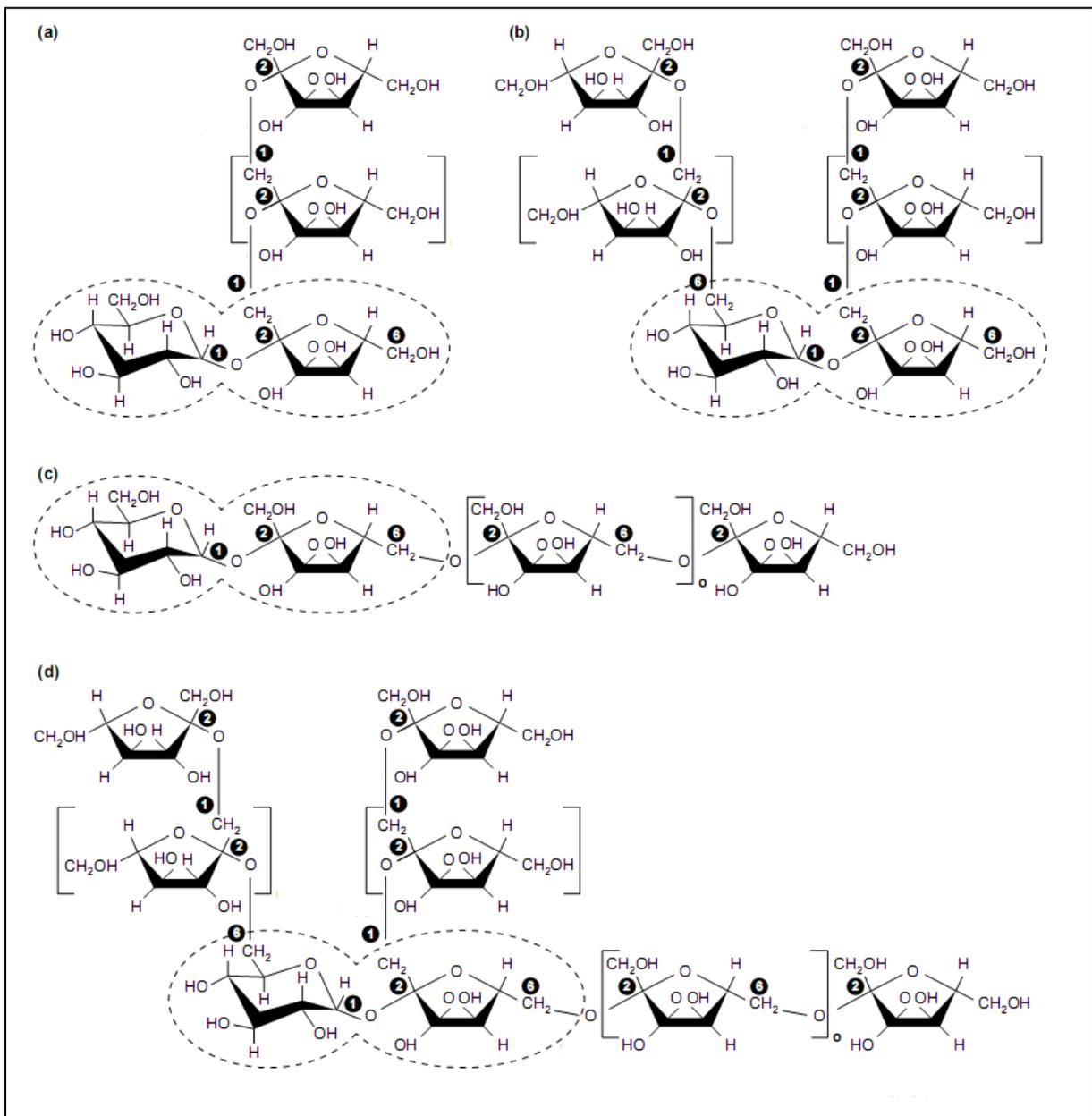
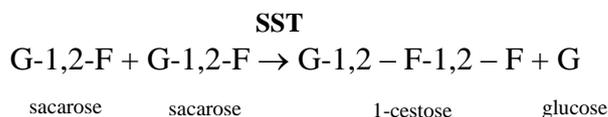
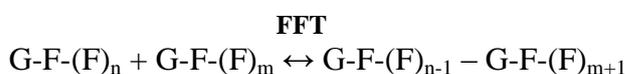


Figura 2. Exemplos de diferentes tipos de frutanos. (a) inulina, (b) neosérie de inulina, (c) levano e (d) levano misto. A molécula de sacarose está circulada (Ritsema & Smeekens 2003, modificado).

Segundo modelo proposto por Edelman & Jefford (1968) para tubérculos de *Helianthus tuberosus*, os frutanos são sintetizados pela ação de duas frutossiltransferases. A sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99), que catalisa irreversivelmente a formação da 1-cestose a partir de duas moléculas de sacarose, liberando uma molécula de glucose que, após fosforilação, é novamente utilizada na síntese de sacarose. Essa enzima apresenta alta especificidade pela sacarose.

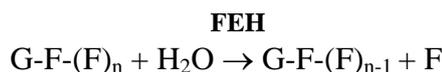


A outra frutossiltransferase envolvida na síntese de frutanos é a 1-FFT (frutano:frutano 1-frutossiltransferase, EC 2.4.1.100), responsável pelo alongamento da cadeia de frutanos, catalisando a transferência reversível de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora. Nesta reação, a menor molécula receptora é a sacarose que nunca pode ser doadora (Edelman & Jefford 1968). Como a reação é reversível, essa enzima também atua na redistribuição das unidades de frutose, podendo promover também a diminuição do comprimento das cadeias. Esse modelo ainda é aceito atualmente, tendo sido confirmado por estudos de Koops & Jonker (1996) em *H. tuberosus* e por Van den Ende & Van Laere (1996) em *Cichorium intybus* L.



n = nº de resíduos de frutose extra-sacarose da molécula doadora
m = nº desses resíduos da molécula receptora

A despolimerização das moléculas de frutanos é catalisada por frutano-exohidrolases (FEHs) e ocorre pela remoção seqüencial dos resíduos terminais de frutose. Os produtos finais da FEH são a frutose e a sacarose, sendo a enzima fortemente inibida por esse dissacarídeo (Edelman & Jefford 1964, Van den Ende *et al.* 2002).



Dois tipos principais de FEHs podem ser distinguidos, dependendo do tipo de ligação que esta hidrolisa: a 1-FEH (EC 3.2.1.153), que atua sobre ligações β-2,1, e a 6-FEH (EC 3.2.1.154), que atua sobre ligações β-2,6 (Van den Ende *et al.* 2002). Entretanto, uma FEH que hidrolisa ambas as ligações foi purificada de *Hordeum vulgare* L. (Henson & Livingston

1998). Adicionalmente, a presença de isoformas de FEH atuando na mobilização de frutanos foi descrita para diferentes espécies, como exemplificado para *H. tuberosus* (Edelman & Jefford 1964), *C. intybus* (Claessens *et al.* 1990, Van den Ende *et al.* 2002), *Lolium rigidum* L. (Bonnett & Simpson 1993), *Triticum aestivum* L. (Van den Ende *et al.* 2003, Van den Ende *et al.* 2005, Van Riet *et al.* 2006) e *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asega *et al.* 2004).

Nas células, os frutanos e as enzimas de seu metabolismo são acumulados nos vacúolos (Frehner *et al.* 1984), embora sua presença e a da FEH tenham sido detectadas também no fluído apoplástico (Henson & Livingston 1998, Van den Ende *et al.* 2005). Os frutanos são encontrados em órgãos subterrâneos de reserva, como raízes tuberosas, rizóforos, tubérculos e bulbos e em órgãos fotossintetizantes, como folhas, caules, inflorescências e sementes (Meier & Reid 1982, Carvalho *et al.* 2007, Ritsema & Smeekens 2003).

A atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo de frutanos é influenciada por níveis endógenos de carboidratos (Farrar 1996). Altas concentrações de sacarose promovem a biossíntese, aumentando a capacidade do órgão dreno de atrair e acumular fotossintatos (Pollock & Cairns 1991). A SST, por exemplo, é induzida em condições que elevam a concentração de sacarose e que, portanto, promovem o aumento de frutanos. Entre estas citam-se: anoxia (Albretch *et al.* 1993), baixa temperatura (Jeong & Housley 1990, Prud'homme *et al.* 1993), iluminação contínua de folhas (Simmen *et al.* 1993, Penson & Cairns 1994), alta irradiância (Cairns *et al.* 2000), exposição à seca (De Roover *et al.* 2000) e deficiência de nitrogênio (Améziane *et al.* 1997, Wang *et al.* 2000).

Por outro lado, a mobilização dos frutanos ocorre quando há um aumento da demanda por compostos de carbono para o crescimento da planta ou para permitir ajustes metabólicos em situações de estresses. Assim, o aumento da atividade da FEH foi observado em espécies de Asteraceae durante a brotação de órgãos aéreos no ciclo anual de desenvolvimento, ou durante a rebrota de plantas desfolhadas, conforme relatado em Asega & Carvalho (2004 e referências ali contidas). Baixas temperaturas também induzem a atividade da FEH (Van den Ende & Van Laere 1996, Portes 2005, Asega *et al.* 2011) que, ao promover a diminuição do tamanho médio das cadeias de frutanos, permite o ajuste osmótico nas células, promovendo a tolerância das plantas ao frio.

Os frutanos são, em geral, armazenados quando a produção de fotoassimilados excede a demanda, e são mobilizados quando há necessidade de energia (Ritsema & Smeekens 2003). Em tecidos fotossintéticos, os frutanos armazenados nos vacúolos servem como uma reserva de sacarose, evitando a retro-inibição da fotossíntese induzida por açúcares. Em tecidos drenos, a polimerização da sacarose em frutanos é importante para manutenção do

gradiente de sacarose entre os tecidos de armazenamento e o floema, garantindo sua translocação para esses tecidos (Pollock 1986, Pollock & Cairns 1991).

Os frutanos são acumulados durante o crescimento e desenvolvimento das plantas. Contudo, alterações em sua concentração e composição, bem como nas atividades das enzimas do seu metabolismo, conforme relatado anteriormente, podem estar associadas a variações sazonais de temperatura e outros fatores ambientais (Pollock 1986, Pontis 1989, Housley & Pollock 1993) indicando que, além do papel de carboidrato de reserva, os frutanos apresentam outras funções fisiológicas. Estes polímeros parecem estar associados à proteção das plantas contra o frio e a seca, por atuarem na regulação osmótica da célula, através da variação do grau de polimerização de suas moléculas (Pontis & Del Campillo 1985, Pilon-Smits *et al.* 1995, Van den Ende *et al.* 2002) e por prevenir danos à membrana celular, mantendo sua integridade e o funcionamento celular (Demel *et al.* 1998, Vereyken *et al.* 2001). Em espécies de cerrado, esses compostos atuam possivelmente aumentando a tolerância das plantas à baixa disponibilidade de água durante o inverno, contribuindo para sua sobrevivência nessas condições (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro 2001, Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2011).

Além de sua função como carboidrato de reserva e na adaptação das plantas ao ambiente, os frutanos vêm sendo utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica. Nos últimos anos tem havido um interesse crescente pelo uso da inulina como ingrediente alimentar; na forma de frutose livre é indicada como adoçante dietético, na forma de fruto-oligossacarídeos (FOS) é empregada como fibra solúvel e alimento funcional (Ritsema & Smeekens 2003).

Os frutanos são, portanto, considerados compostos pré-bióticos, uma vez que não são hidrolisados pelas enzimas digestivas e promovem o crescimento seletivo de bactérias, como lactobacilus e bifidobactérias no cólon (Hartemink *et al.* 1997, Cummings *et al.* 2001). Os FOS propiciam a diminuição dos níveis de triglicérido sérico (Hidaka *et al.* 1986), estimulam a absorção de cálcio, magnésio e ferro no cólon (Roberfroid 2002) e, possivelmente atuam na prevenção do câncer de cólon (Roberfroid 2005). Quando misturada à água, a inulina forma uma emulsão de baixo teor calórico com textura similar à gordura e adequada à fabricação de iogurtes, sorvetes, mousses, chocolates e produtos de panificação (Ritsema & Smeekens 2003).

Atualmente, o principal frutano usado na indústria alimentícia mundial é a inulina de raízes de *C. intybus* proveniente de cultivos na Bélgica e Holanda. Segundo Van den Ende *et al.* (2002), a produção anual de inulina proveniente das raízes tuberosas de chicória cresceu na

última década de mil para mais de 100 mil toneladas, devido ao aumento da demanda por este composto.

Vernonia herbacea (Vell.) Rusby (figura 3) é uma Asteraceae perene ocorrente no cerrado que apresenta crescimento sazonal bem definido (Carvalho & Dietrich 1993). Possui órgãos subterrâneos espessados, de origem caulinar, denominados rizóforos por Menezes *et al.* (1979), para outras espécies do gênero. Os rizóforos são responsáveis pela reprodução vegetativa da espécie, pois apresentam gemas axilares que dão origem a ramos aéreos, além de se ramificar subterraneamente (Hayashi & Appezatto-da-Glória 2005), e também atuam como órgãos de reserva da planta (Carvalho & Dietrich 1993). Das espécies do gênero *Vernonia* encontradas em áreas de cerrado do estado de São Paulo e conhecidas até o momento, *V. herbacea* destaca-se pelas altas concentrações de frutanos, que atingem até 80% da massa seca dos rizóforos (Carvalho & Dietrich 1993, Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1986).

Outra espécie que também acumula cerca de 80% da massa seca em frutanos é *Viguiera discolor* Baker (figura 4), Asteraceae herbácea perene, ocorrente no cerrado, que apresenta raízes tuberosas adventícias (Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1986). Uma característica interessante em *V. discolor* é a presença de cadeias atipicamente longas de frutanos que atingem um grau de polimerização (GP) de até 170 (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993). Com base nesta característica, a enzima FFT desta espécie foi clonada e sua expressão heteróloga em *Pichia pastoris* confirmou sua capacidade de sintetizar frutanos de cadeias longas, sendo, portanto considerada uma das poucas enzimas que apresentam esta importante característica dentre as espécies de Asteraceae (Van den Ende *et al.* 2005).

Os trabalhos realizados com Asteraceae do Cerrado acumuladoras de frutanos demonstraram o excelente potencial de *V. herbacea* e *V. discolor* para estudos sobre o efeito de fatores ambientais no crescimento, alocação de biomassa, produção e metabolismo de frutanos, e sobre o papel ecofisiológico dos frutanos nessas espécies. Estudos com *V. discolor* incluíram análises da composição de frutanos durante o ciclo fenológico (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1993), da partição da matéria seca durante o desenvolvimento (Isejima & Figueiredo-Ribeiro 1991) e das atividades de biossíntese (Itaya *et al.* 1997, 1999) e degradação (Degasperi *et al.* 2003) de frutanos, entre outros.



Figura 3. Aspecto geral de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. Note os órgãos subterrâneos de reserva, rizoforos, responsáveis pelo armazenamento dos frutanos. Foto: Maria Angela Machado de Carvalho.



Figura 4. Aspecto geral de *Viguiera discolor* Baker. Note as raízes tuberosas, responsáveis pelo armazenamento dos frutanos. Foto: Maria Angela Machado de Carvalho.

Dentre os fatores ambientais estudados, avaliaram-se os efeitos de temperaturas baixas, déficit hídrico e aumento da concentração de CO₂ no crescimento e no metabolismo de frutanos em plantas de *V. herbacea*. Tanto sob baixa temperatura (Dias-Tagliacozzo *et al.* 1999, Asega 2007, Portes 2005) como sob déficit hídrico (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004, Garcia 2009, Garcia *et al.* 2011), ocorreu um nítido aumento de frutose, sacarose e da razão oligossacarídeos:polissacarídeos, sugerindo o possível papel desses açúcares na regulação osmótica nestas condições. Quando submetidas à concentração elevada de CO₂, as plantas apresentaram maior crescimento, biomassa aérea e subterrânea, produtividade de frutanos, em especial de fruto-polissacarídeos, taxa fotossintética e eficiência do uso da água (EUA), sugerindo que a presença de órgãos de reserva subterrâneos com concentração elevada de frutanos poderá conferir um maior sucesso adaptativo às novas condições hídricas sob condições de elevada [CO₂], uma vez que esta espécie já possui mecanismos de adaptação à baixa disponibilidade de água nas condições atmosféricas atuais (Oliveira *et al.* 2010).

Poucos trabalhos têm considerado as respostas de plantas aos efeitos combinados dos déficits hídricos no solo e das altas concentrações de CO₂. Sob essas condições, foi observado que as plantas aumentam significativamente seu crescimento e produtividade (Wall *et al.* 2001, Xiao *et al.* 2005) quando comparadas às plantas mantidas sob déficit hídrico e nas condições atmosféricas atuais, sugerindo que a atmosfera enriquecida com CO₂ ameniza os efeitos do déficit hídrico, diminuindo a importância da limitação estomática para a assimilação do carbono, inibindo a fotorrespiração, estimulando a partição de açúcares solúveis e aumentando a eficiência do uso da água (Chaves & Pereira 1992).

A maioria dos trabalhos disponíveis sobre déficit hídrico e alto CO₂ foram realizados com plantas cultivadas e de crescimento rápido, com ciclos de vida curtos (Samarakoon & Gifford 1996a,b, Sgherri *et al.* 1998) enquanto que em plantas nativas os estudos ainda são escassos. Em bases globais, os fluxos de carbono entre a biosfera e a atmosfera são determinados em grande parte pelos ecossistemas florestais sendo as árvores um potencial dreno de carbono (Mousseau & Sargier 1992). Lee & Jarvis (1995) destacam que plantas nativas diferem das cultivadas em suas respostas às altas [CO_{2atm}] e ao déficit hídrico por uma série de fatores como tempo de vida, taxas e padrões de crescimento, além da alocação e partição de carbono (C) e nitrogênio (N).

Assim, é importante considerar o efeito conjunto do aumento da concentração de CO₂ e da diminuição da disponibilidade de água no solo, de modo a estimar os possíveis efeitos das mudanças climáticas projetadas para esse século na vegetação nativa.

2. OBJETIVO

Tendo em vista os elevados níveis de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* e *Viguiera discolor*, da ampla ocorrência de espécies acumuladoras desses polímeros no cerrado e considerando as previsões para esse século de aumento da concentração de CO₂ e de mudanças nos padrões de distribuição de chuvas, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos interativos do elevado CO₂ e do déficit hídrico no metabolismo de frutanos nessas duas espécies herbáceas do cerrado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições de cultivo

Para a realização do experimento com *Viguiera discolor*, plantas com aproximadamente 2 anos de idade, obtidas por germinação de sementes coletadas em área de cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu (RBEE), SP (22° 18' S, 47° 11' W), foram transplantadas, em julho de 2009, para vasos de 2 L, em número de duas plantas por vaso.

Para os experimentos com *Vernonia herbacea*, foram utilizadas plantas obtidas por propagação vegetativa a partir de fragmentos de rizóforos de plantas adultas coletadas na mesma área, como descrito por Carvalho *et al.* (1997). Após atingirem cerca de 5 cm de altura, foram transferidas para vasos de 3 L em número de duas ou três por vaso (Oliveira *et al.* 2010).

Para todos os experimentos, as plantas foram cultivadas em solo de cerrado e separadas em dois lotes e distribuídas em câmaras de topo aberto (OTC “open-top chambers”) de 1,5 m de diâmetro e 2 m de altura, providas de um sistema de circulação de ar (figura 5) e instaladas no interior de uma Casa de Vegetação do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica (Aidar *et al.* 2002). Um lote de 81 plantas foi mantido sob atmosfera ambiente de 380 ppm de CO₂, enquanto o outro foi submetido à atmosfera de 760 ppm de CO₂, através de injeção de gás a partir de um cilindro de CO₂ comprimido acoplado ao sistema. Nos 2 dois primeiros experimentos com *V. discolor* e *V. herbacea*, as concentrações do gás no interior das câmaras foram monitoradas a cada três dias com um medidor de CO₂ modelo Testo 435. Esse sistema foi aperfeiçoado posteriormente com a automatização do monitoramento do microclima e da concentração do CO₂ no interior das OTCs. O sistema conta com sensores de monitoramento contínuo da temperatura (T °C) e umidade relativa (UR) do ar (modelo 107L em abrigo 41303-5A, Campbell Sci., Utah, EUA), da radiação fotossinteticamente ativa - PAR (modelo Li-190SB, Li-Cor, Nebraska, EUA) e controle da concentração de CO₂ [CO₂], utilizando um analisador de gases no infravermelho - IRGA (modelo WMA-4, PPSsystem). Todos os dados de temperatura, UR, PAR e [CO₂] foram coletados a cada 15 minutos e armazenados em um Datalogger (modelo CR1000, Campbell Sci., EUA) utilizando o Software de controle do sistema (modelo Datalogger Support Software PC400 1.5, Campbell Sci., EUA). As plantas foram regadas quinzenalmente com solução Vernonia (Cuzzuol *et al.* 2005). Nesta ocasião, era realizada a redistribuição dos vasos dentro das câmaras, de forma a se evitar a aclimação das plantas ao microambiente.

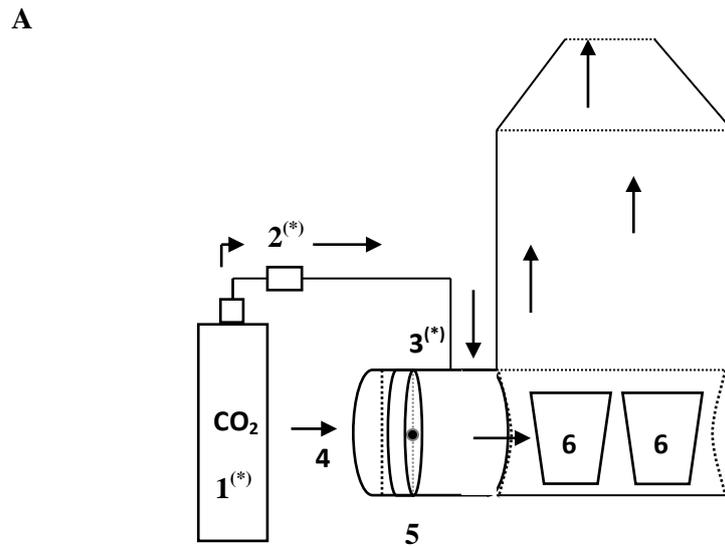


Figura 5. **(A)** Esquema da câmara de topo aberto: 1 - Cilindro de gás de CO₂, 2- Válvula de regulagem, 3- Mangueira de gás, 4- Entrada para ar, 5- Ventilador, 6- Vasos. (*) Itens presentes somente na câmara de atmosfera enriquecida de CO₂. As setas indicam a direção do fluxo de gás ou de ar atmosférico. **(B)** Câmaras instaladas na Casa de Vegetação do Núcleo de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica contendo plantas de *V. herbacea* mantidas em elevada concentração atmosférica de CO₂ e também atmosfera ambiente.

3.1.1. Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração elevada de CO₂ no metabolismo de frutanos em *Viguiera discolor*

Inicialmente, as plantas foram mantidas por 21 dias nas OTCs, nos respectivos ambientes de CO₂ para adaptação às condições atmosféricas impostas. Como não se conhecia as respostas de trocas gasosas de *V. discolor* sob alto CO₂, medidas destes parâmetros (conforme item 3.4) foram realizadas a cada 3 dias após a entrada nas OTCs, com o objetivo de se verificar alterações nestas medidas que poderiam sugerir uma aclimação a essa nova condição atmosférica, especialmente o aumento da eficiência do uso da água.

Em seguida, as plantas de cada tratamento de CO₂ foram separadas em dois lotes: um lote foi irrigado diariamente (C - controle) e outro foi submetido ao déficit hídrico pela suspensão da regas (SR). As coletas foram realizadas no início do tratamento (T0) e aos 5, 8 e 11 dias após o início da suspensão de regas. Aos 11 dias, parte das plantas sob déficit hídrico foram re-irrigadas (R) e, novamente, após 4 e 7 dias, foram realizadas coletas. O experimento foi realizado entre os meses de agosto e outubro de 2009. Nesse período, a temperatura média na casa de vegetação foi de 18 °C, com máxima de 30,2 °C e mínima de 12,2 °C (Figura 6). A umidade relativa do ar foi de 86%, com máxima de 97% e mínima de 42%. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em fatorial 2x3 sendo duas concentrações atmosféricas de CO₂ (380 e 760 ppm) e três regimes hídricos (suspensão total de regas, regas diária e re-irrigação), totalizando 6 tratamentos. Todas as análises foram realizadas em triplicata e cada replicata foi composta por duas plantas.

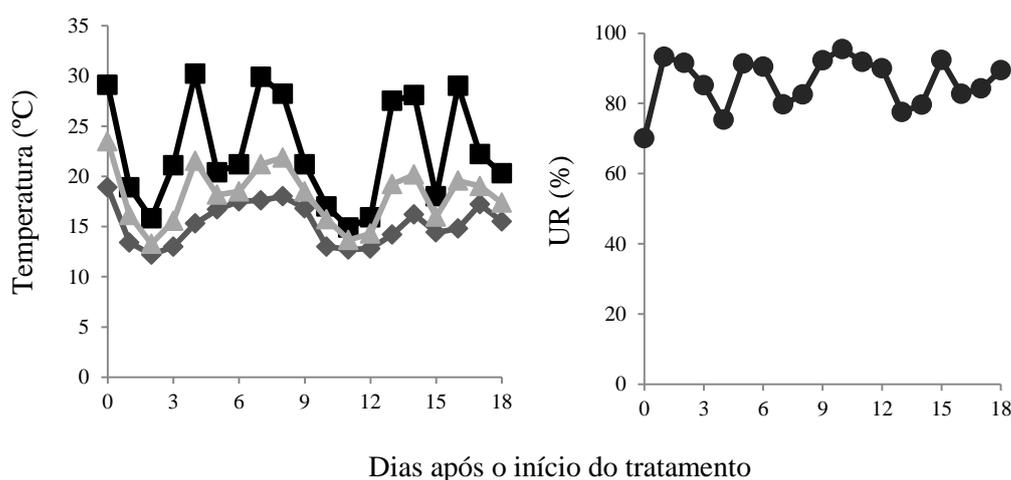


Figura 6 – Medidas diárias da temperatura máxima (■), mínima (◆) e média (▲) do ar e medidas médias de umidade relativa do ar (●).

Em cada ponto de amostragem foram realizadas coletas de solo para determinação do potencial hídrico, análises do potencial hídrico da parte aérea (Ψ_{wpa}) e da raiz tuberosa (Ψ_{wsub}), medidas de trocas gasosas e coletas de raízes tuberosas para realização das extrações enzimáticas e de carboidratos. Após lavagem das plantas e congelamento em nitrogênio líquido, amostras de raízes tuberosas foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até se proceder às análises bioquímicas.

3.1.2. Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração atmosférica elevada de CO_2 no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* – estudo comparativo em duas estações: primavera e inverno

Inicialmente as plantas foram mantidas por 15 dias nas OTCs, nos respectivos ambientes de CO_2 para adaptação às condições atmosféricas impostas, conforme verificado por Oliveira *et al.* (2010). Em seguida, as plantas de cada tratamento de CO_2 foram separadas em dois lotes: um lote foi irrigado diariamente (C) e outro foi submetido à imposição do déficit hídrico (SR) pela suspensão da regas.

Foram conduzidos dois experimentos sob essas condições. No primeiro, realizado no período considerado úmido nos meses de outubro e novembro de 2009, que neste trabalho será denominado de primavera, o material foi coletado no início do tratamento (T0) e aos 3, 7 e 10 dias após o início da suspensão de regas. Aos 10 dias, parte das plantas sob déficit hídrico foram re-irrigadas (R) e, novamente após 2 e 7 dias, foram realizadas coletas. Nesse período, a temperatura média da casa de vegetação foi de $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, com máxima de $32,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mínima de $18,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A umidade relativa do ar foi de 82%, com máxima de 92% e mínima de 67% (Figura 7).

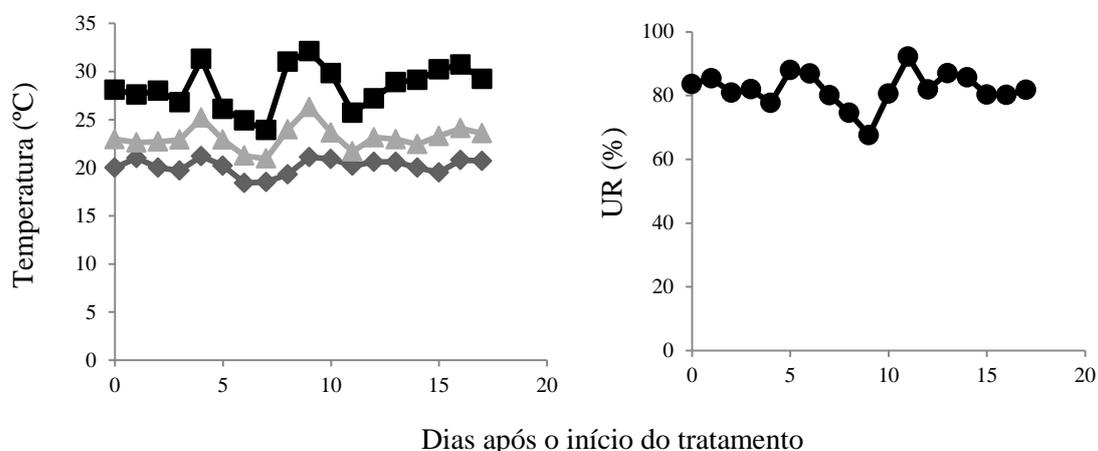


Figura 7 – Medidas diárias da temperatura máxima (■), mínima (◆) e média (▲) do ar e medidas médias de umidade relativa do ar (●).

No segundo experimento, desenvolvido no período considerado seco, nos meses de julho e agosto de 2011, que neste trabalho será denominado de inverno, as coletas foram realizadas no início do tratamento (T0) e aos 3, 7, 15 dias após o início da suspensão de rega. Aos 15 dias, parte das plantas sob déficit hídrico foram re-irrigadas e, novamente após 2 e 5 dias, foram realizadas coletas. Nesse período, a temperatura média da casa de vegetação foi de 18,5 °C, com máxima de 39,8 °C e mínima de 6 °C. A umidade relativa do ar foi de 72%, com máxima de 86% e mínima de 58,1% (Figura 8).

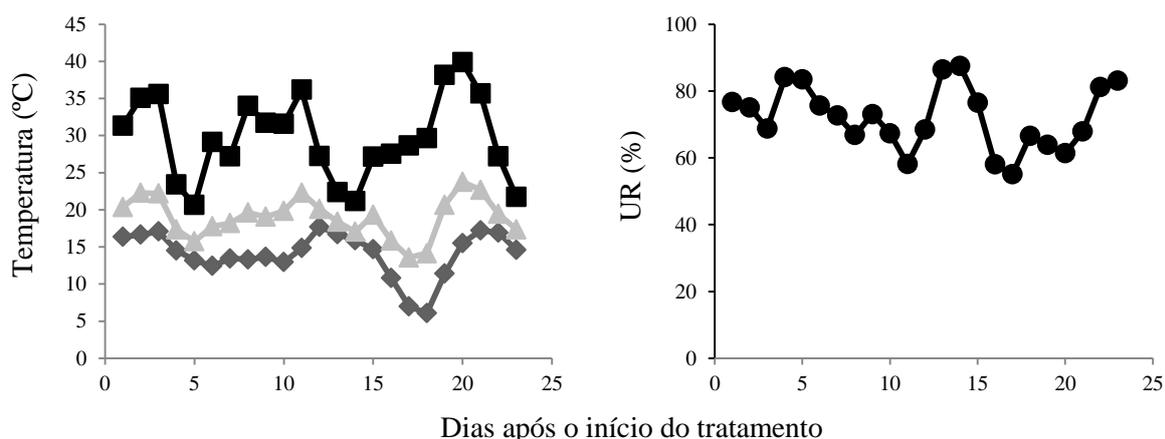


Figura 8 – Medidas diárias da temperatura máxima (■), mínima (◆) e média (▲) do ar e medidas médias de umidade relativa do ar (●).

O delineamento experimental em ambos os experimentos foi inteiramente casualizado em fatorial 2x3 sendo duas concentrações atmosféricas de CO₂ (360 e 760 ppm) e dois regimes hídricos (suspensão total de regas, regas diária e re-irrigação), totalizando 6 tratamentos em cada experimento. Todas as análises foram realizadas em triplicata e cada replicata foi composta por duas plantas.

Em cada ponto de amostragem o material foi tratado conforme mencionado acima, armazenado a -80° C até a realização das análises listadas no item 3.1.1.

3.1.3. Efeito conjunto de diferentes regimes de regas e da concentração elevada de CO₂ no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea*

Inicialmente as plantas foram mantidas por 45 dias nas OTCs, conforme descrito no item 3.1.2. Antes do início dos diferentes regimes de rega, todas os vasos foram levados à capacidade de campo. Em seguida, as plantas de cada tratamento de CO₂ foram separadas em quatro lotes, conforme o regime de rega: no primeiro lote foi repostado 100% da água evaporada

no período anterior, no segundo foi repostado 75% da água, no terceiro foi repostado 50% e no último lote foi repostado 25% da água evaporada. Para isso, os vasos foram pesados a cada dois dias e a diferença entre o peso do dia e do período anterior foi considerada o total de água evaporada de cada vaso. As coletas foram realizadas no início do tratamento (T0) e aos 9, 18 e 27 dias após o início da imposição dos regimes de rega. Após 27 dias, os lotes com restrição hídrica foram re-irrigados até a capacidade de campo e, após 5 dias nessa condição hídrica, foram realizadas novas coletas. O experimento foi desenvolvido entre os meses de maio e junho de 2011. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em fatorial 2x4 sendo duas concentrações atmosféricas de CO₂ (380 e 760 ppm) e quatro regimes de regas (100%, 75%, 50% e 25% de reposição de água), totalizando 8 tratamentos. Todas as análises foram realizadas em triplicata e cada replicata foi composta por duas plantas.

No período de realização do experimento, a temperatura média da casa de vegetação foi de 18 °C, com máxima de 36,1 °C e mínima de 8,7 °C. A umidade relativa do ar foi de 86%, com máxima de 87% e mínima de 67% (Figura 9).

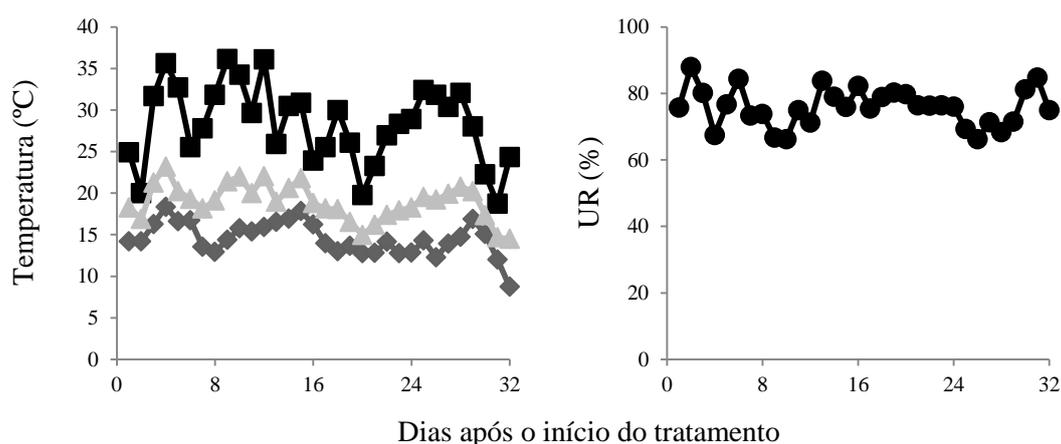


Figura 9 – Medidas diárias da temperatura máxima (■), mínima (◆) e média (▲) do ar e medidas médias de umidade relativa do ar (●).

Em cada ponto de amostragem, as plantas foram coletadas e as amostras foram armazenadas a -80° C até a realização das análises listadas no item 3.1.1.

3.2 Umidade e potencial hídrico do solo (Ψ_{wsolo})

Em cada ponto de amostragem, a umidade do solo nos vasos foi determinada por gravimetria (Blake 1965). Para tal, amostras de solo foram obtidas de cada vaso utilizando-se anéis volumétricos de 80 cm³, sendo determinada a massa fresca imediatamente após a coleta

e a massa seca após 72 h de secagem da amostra em estufa ventilada a 70 °C. A umidade do solo foi calculada a partir da fórmula:

$$U_{\text{solo}}(\%) = \frac{MF - MS}{MS - Ta} \times 100$$

onde

MF é a massa fresca da amostra de solo, **MS** é a massa seca da amostra de solo e **Ta** é a tara do anel volumétrico.

Em uma fração de cada amostra para a determinação da umidade do solo, foram realizadas medidas do Ψ_w solo. Para tal, utilizou-se um psicrometro de ponto de orvalho (Modelo Decagon WP4).

3.3 Potencial hídrico da parte aérea (Ψ_{wpa}) e dos órgãos subterrâneos de reserva (Ψ_{wsub})

Foram realizadas medidas do Ψ_{wpa} das plantas no período da manhã, entre 6:00 e 7:00 h. Para tal foi utilizada uma bomba de pressão tipo Scholander, Modelo 1000 (PMS Instrument Co., UTAH, EUA).

O Ψ_{wsub} foi determinado no suco celular das raízes tuberosas (*V. discolor*) e dos rizóforos (*V. herbacea*) coletados com auxílio de um espremedor de alho, armazenado em tubos tipo *eppendorf* e congelado a -20° C até o momento das medidas. O Ψ_{wsub} foi medido utilizando-se um osmômetro de pressão de vapor (VAPRO) modelo 5520. O valor obtido em mmol/kg foi transformado em MPa segundo a seguinte fórmula: MPa = -2,5 X mmol/Kg.

3.4 Medidas de trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas foram realizadas na primeira folha totalmente expandida de cada planta, a partir do ápice, utilizando-se um analisador de gases no infravermelho (IRGA; modelo Li 6400XT, Li-Cor, Nebraska, EUA), com controle de luz, temperatura e concentração de CO₂. Os dados foram obtidos a partir de medidas instantâneas das taxas de assimilação líquida de CO₂ (**A**), condutância estomática (**g_s**) e transpiração (**E**) sob as densidades de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de 450 e 720 μmol fons m⁻² s⁻¹ para *V. herbacea* (Oliveira *et al.* 2010) e *V. discolor*, respectivamente, sendo esta última determinada a partir de curvas de resposta à luz (AxDFFFA) realizadas previamente para esta espécie. As medidas foram realizadas entre 9 e 12 horas e a concentração de CO₂ dentro da câmara foi de 380 ppm ou 760 ppm, de acordo com o tratamento da planta em análise. A eficiência do uso da água (**EUA**) foi calculada a partir da relação entre a assimilação de CO₂ (**A**) e a transpiração (**T**) (EUA = A/T).

3.5 Conteúdo de água (%)

O conteúdo de água da parte aérea e dos órgãos subterrâneos (rizóforo e raízes tuberosas para *V. herbacea* e *V. discolor*, respectivamente) foi determinado a partir da fórmula:

$$TU(\%) = \frac{MF - MS}{MF} \times 100$$

onde

MF é a massa fresca da amostra, determinada imediatamente após a coleta e **MS** é a massa seca da amostra após secagem em estufa a 60 °C (parte aérea) e após liofilização (órgãos subterrâneos).

3.6 Extração enzimática

Amostras congeladas de 100 mg de rizóforos (*V. herbacea*) e raízes tuberosas (*V. discolor*) foram homogeneizadas em tampão citrato-fosfato (McIlvaine) 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). O homogeneizado foi mantido em repouso por 60 min e, em seguida, centrifugado a 12000 g por 15 min a 5 °C. Ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 20% de saturação, mantido em repouso por 120 min e centrifugado a 12000 g por 20 min a 5 °C. O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio a 80% de saturação e a mistura foi mantida em repouso por 120 min. Após centrifugação por 20 min a 12000 g a 5 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em tampão de extração.

3.6.1 Ensaio enzimático

As misturas de incubação foram constituídas de extrato enzimático e substratos na proporção de 1:1 (v/v). Os substratos foram preparados em tampão Mc Ilvaine 50 mM, pH 5,5. Os extratos foram incubados a 30 °C utilizando-se substratos nas concentrações finais de 200 mM de sacarose (Sigma) para a atividade de SST, 200 mM de 1-cestose para a atividade de FFT e 5% de inulina de *Vernonia herbacea* para a atividade de FEH. O tempo de incubação foi de 6 horas para a atividade da SST e da FFT, e de 1 hora para a FEH. As misturas de incubação foram submetidas à fervura por 5 min para interrupção da reação.

3.6.2 Análise das atividades enzimáticas

Para a determinação das atividades de SST e FFT, amostras das misturas de incubação foram diluídas (10x) em água deionizada e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema de cromatografia Dionex modelo ICS-3000, utilizando-se coluna CarboPac PA-1 (2 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) com a seguinte programação: 0 - 2 min, 15 mM; 2,1 - 17 min, 185 mM; 17,1 - 21 min, 500 mM; 21,1 - 30 min, 15 mM. Para a análise da atividade de FEH, as amostras das misturas de incubação foram diluídas (5X) e analisadas por HPAEC/PAD, no mesmo sistema descrito acima, utilizando-se os mesmos eluentes na seguinte programação: 0 - 2 min, 25 mM; 2,1 - 8 min, 50 mM; 8,1 - 8,5 min, 75 mM; 8,6 - 10 min, 100 mM; 10,1 - 28 min, 450 mM; 28,1 - 30, 500 mM; 30,1 - 40, 25mM. Os potenciais aplicados ao PAD em ambas as programações para 0 - 0,4 s; 0,41 - 0,42 s; 0,43 s; 0,44 - 1 s foram 0,1; -2,0; 0,6; -0,1, respectivamente e o fluxo aplicado foi de 0,25 mL min⁻¹. A quantificação foi feita comparando-se as áreas dos picos da 1-cestose, nistose e frutose, para atividades da SST, FFT e FEH respectivamente, utilizando-se padrões externos.

3. 7 Extração de carboidratos solúveis

Amostras de 100 mg de massa fresca de rizóforos (*V. herbacea*) e raízes tuberosas (*V. discolor*) foram liofilizadas, pesadas para a determinação da massa de matéria seca e, então, submetidas à extração de carboidratos conforme Carvalho *et al.* (1998) modificado. As amostras foram pulverizadas em almofariz, colocadas em etanol 80% e mantidas em banho-maria a 80 °C por 15 min, sendo então centrifugadas a 1082 g por 15 min. Os precipitados foram re-extraídos em etanol 80% por duas vezes. Os sobrenadantes etanólicos foram reunidos e reservados. Os resíduos finais foram extraídos duas vezes em água a 60 °C por 30 min e centrifugadas a 1082 g por 15 min. Os sobrenadantes etanólicos e aquosos foram reunidos, concentrados e o extrato final foi submetido à precipitação a frio com três volumes de etanol, para separação das frações de fruto-oligo (sobrenadante) e fruto-polissacarídeos (precipitado) após centrifugação a 2900 g por 15 min a 5 °C. O sobrenadante, contendo a fração de fruto-oligosacarídeos, foi concentrado, e o precipitado que consistiu da fração de polissacarídeos foi ressuscitado e solubilizado em água.

3.7.1 Análise quantitativa de carboidratos

Os conteúdos de frutose livre e combinada foram determinados nas frações de fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos, separadamente, pelo método de antrona modificado (Jermyn 1956) para cetoses. Na fração de fruto-oligossacarídeos foi determinado também o conteúdo de açúcar redutor (Somogyi 1945). Em ambas as análises colorimétricas foi utilizada frutose como padrão.

3.8 Análise estatística

Os coeficientes de correlações entre os valores de Ψ_{solo} , U_{solo} , Ψ_{folha} , Ψ_{sub} , A e EUA e entre os parâmetros fisiológicos e bioquímicos avaliados foram calculados usando correlação simples de Pearson. O teste de significância para as correlações foi o Teste "t" de Student em nível de 5% de probabilidade. Em adição foram utilizadas estatística descritiva, calculando-se o erro padrão ($n=3$) da média.

4. Resultados

4.1 Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração elevada de CO₂ no metabolismo de frutanos em *Viguiera discolor*

Nas figuras 6 e 7 estão apresentados os dados de potencial hídrico (Ψ_{wsolo}) e umidade do solo durante os 18 dias de experimento. Tanto nos vasos mantidos sob 380 ppm (figuras 10A, 11A) quanto naqueles sob 760 ppm (figuras 10B, 11B), a suspensão de regas imposta foi suficiente para resultar na diminuição do Ψ_{wsolo} e da umidade do solo, de maneira mais acentuada nas plantas sob alto CO₂.

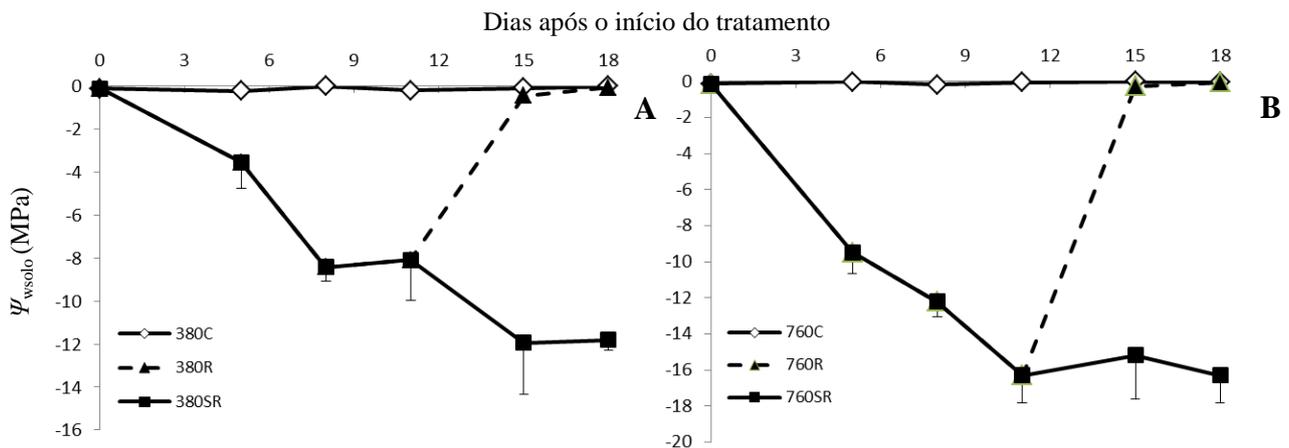


Figura 10 – Potencial hídrico do solo (Ψ_{wsolo}) dos vasos de *Viguiera discolor* submetidos à rega diária (\diamond), à suspensão de rega (\blacksquare) e à re-irrigação (\blacktriangle), mantidos em condições ambiente (~ 380 ppm - **A**) e elevada (~ 760 ppm - **B**) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3)

Nos vasos sob suspensão de regas e 380ppm de CO₂, o valor mínimo de Ψ_{wsolo} foi de aproximadamente -12 MPa, com umidade de cerca de 5,7%, enquanto naqueles mantidos sob 760 ppm, os valores mínimos obtidos foram de $\Psi_w = -16$ MPa e umidade de 4,6%, ao final do período experimental.

Em ambas as concentrações de CO₂, a re-irrigação do solo, realizada no 11º dia do experimento, possibilitou a recuperação do Ψ_{wsolo} e da umidade do solo a níveis próximos aos das plantas controle, que apresentaram valores constantes durante todo o período experimental.

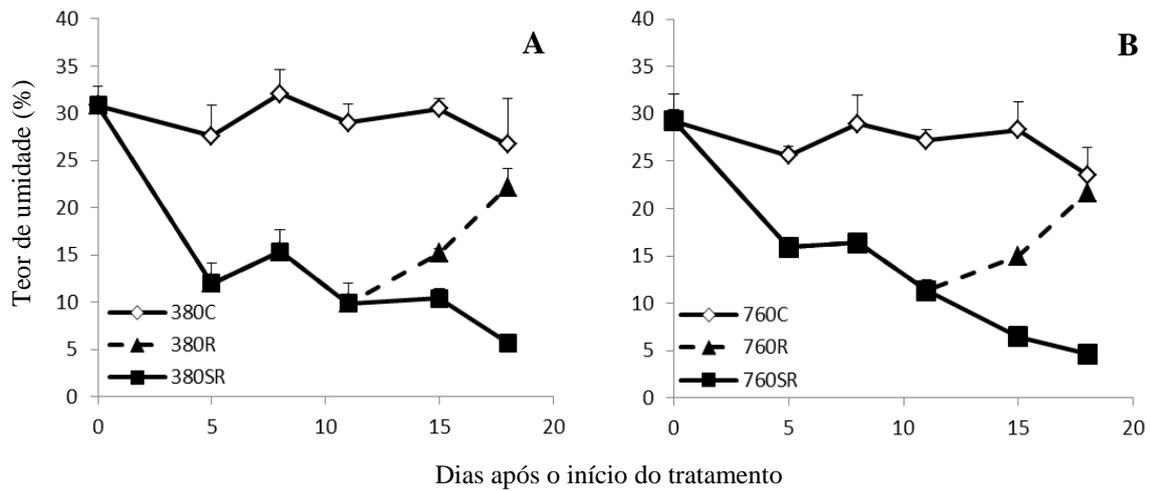


Figura 11 – Teor de umidade (%) do solo dos vasos de *Viguiera discolor* submetidos à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidos em condições ambiente (~380 ppm - A) e elevada (~760 ppm - B) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

A suspensão de regas também foi suficiente para promover uma diminuição do potencial hídrico das folhas (Ψ_{wpa}) mantidas tanto nos 380 ppm (figura 12A) quanto nos 760 ppm de CO₂ (figura 12B), embora nas primeiras, o menor potencial hídrico, atingido aos 8 dias, foi inferior ao das plantas sob 760 ppm. Após os 11 dias de suspensão de regas, as plantas mantidas nas duas concentrações de CO₂ apresentaram senescência da parte aérea, não sendo mais possível mensurar o Ψ_{wpa} após essa coleta.

Quanto ao potencial hídrico das raízes tuberosas (Ψ_{wsub}), a suspensão de regas foi suficiente para causar a diminuição desses valores tanto nas plantas sob 380 ppm (figura 12C) quanto naquelas sob 760 ppm (figura 12D), embora nas primeiras a diminuição tenha sido anterior (após o 5º dia) e mais pronunciada do que nas plantas sob 760 ppm, quando esta ocorreu apenas após o 8º dia. Nas plantas controle os Ψ_{wpa} e Ψ_{wsub} não baixaram além de -1,0 MPa, independente do tratamento de CO₂ imposto. Assim como ocorreu no solo, a re-irrigação também possibilitou, ao final do período experimental, a recuperação dos Ψ_{wpa} e Ψ_{wsub} a níveis próximos das plantas controle.

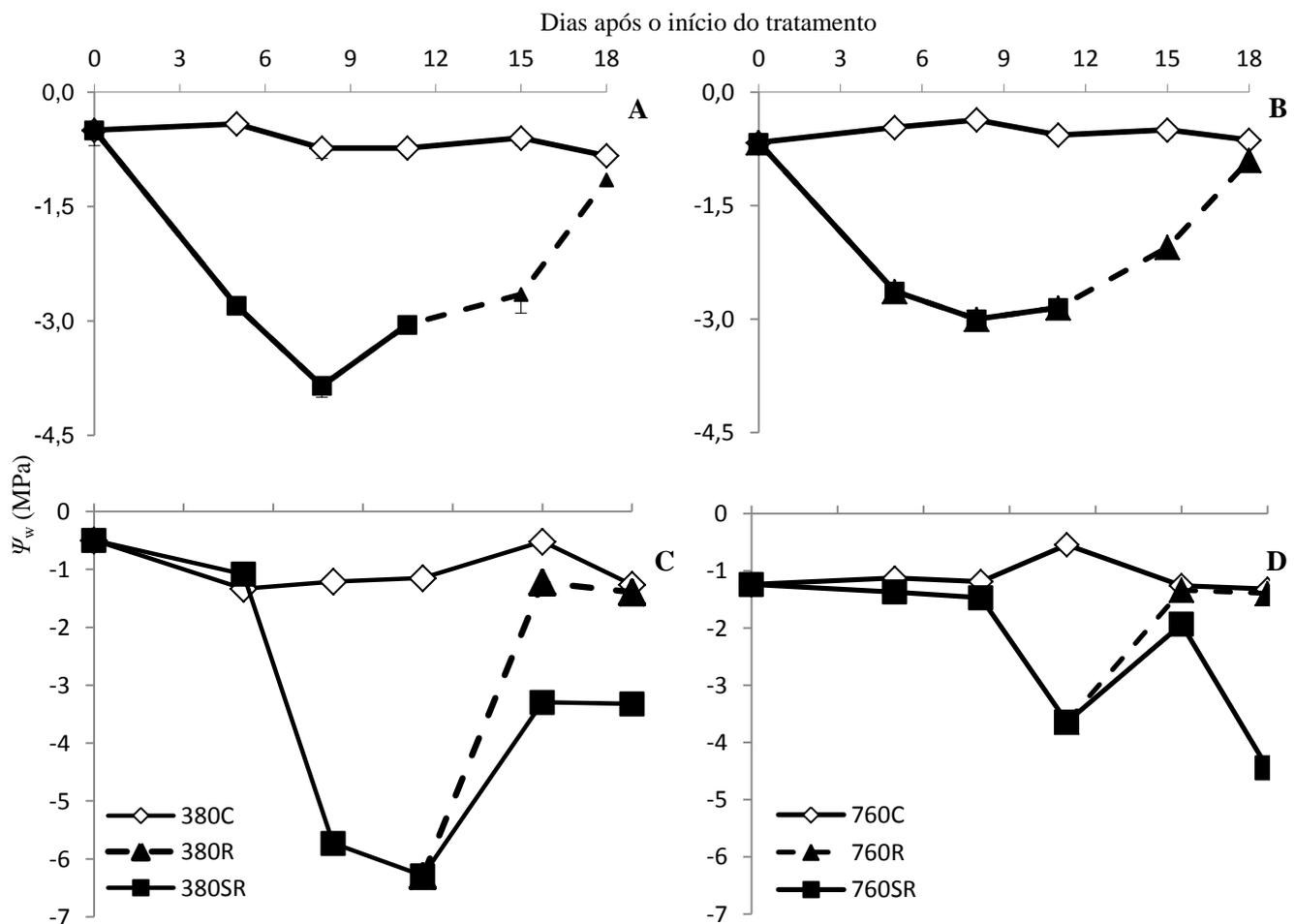


Figura 12 – Potencial hídrico das folhas (A – B) e das raízes tuberosas (C – D) de plantas de *Viguiera discolor* submetidas à rega diária (\diamond), à suspensão de rega (\blacksquare) e à re-irrigação (\blacktriangle), mantidas em condições ambiente (~ 380 ppm – A - C) e elevada (~ 760 ppm – B - D) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3)

Sob 380 ppm de CO₂, a assimilação fotossintética, a transpiração e a condutância estomática foram menores nas plantas sob suspensão de regas do que nas plantas controle (figuras 13A, B e C), embora tenham apresentado perfis semelhantes de assimilação e transpiração ao longo do período. A eficiência do uso da água (EUA) nas plantas sob suspensão de regas aumentou no 5º dia, diferentemente das plantas controle e, em seguida, diminuiu até o 11º dia. A partir dessa coleta não foi mais possível realizar medidas de trocas gasosas devido à senescência dos órgãos aéreos (figura 13A). Após a re-irrigação, as plantas apresentaram aumento desses parâmetros, em especial a EUA, que foi superior à verificada nas plantas controle (figura 13D).

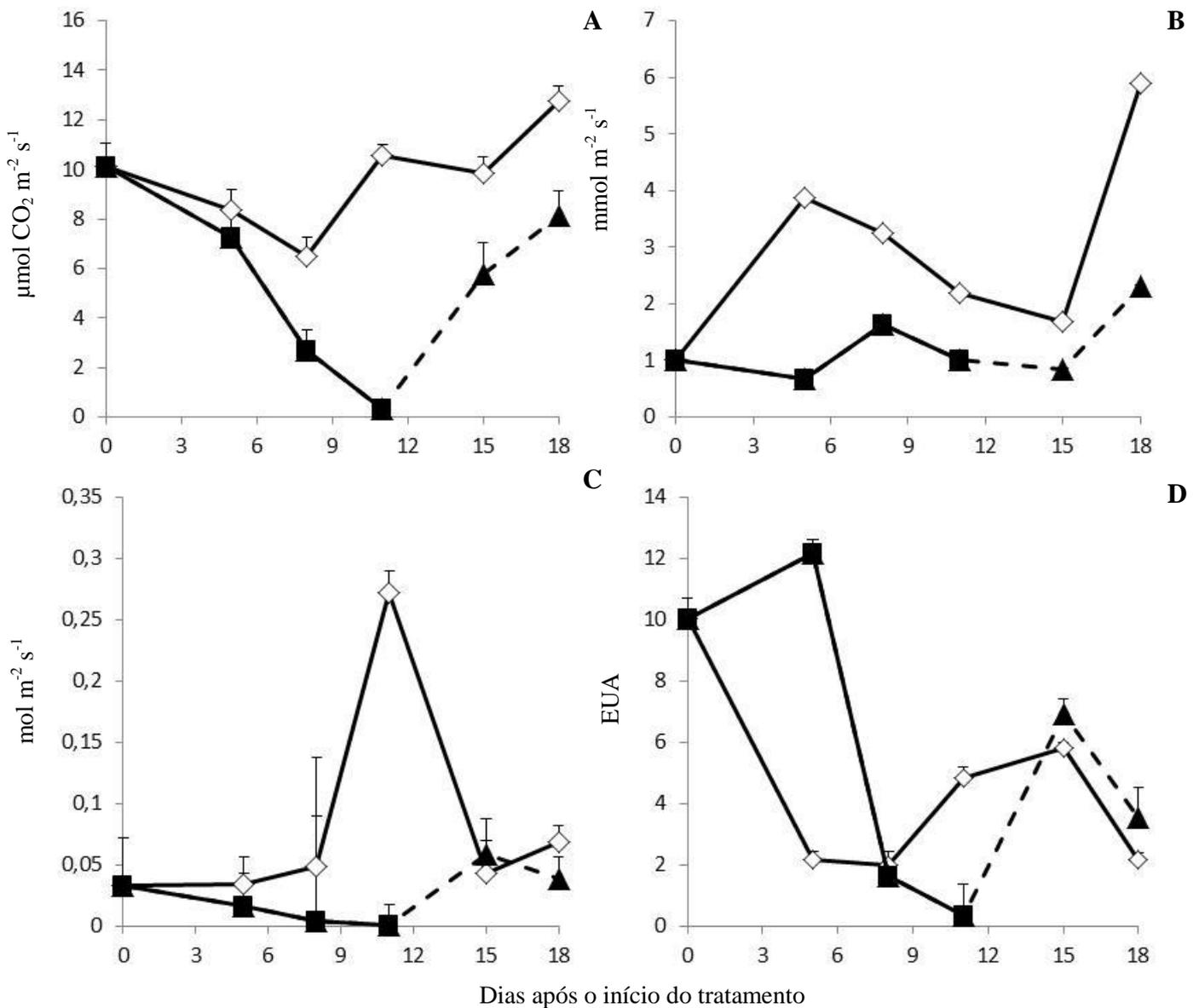


Figura 13 – Assimilação fotossintética (A), transpiração (B), condutância estomática (C) e eficiência do uso da água (D) a $720 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de folhas de *Viguiera discolor* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas sob atmosfera de $\sim 380 \text{ ppm CO}_2$. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

De maneira semelhante ao observado nas plantas mantidas sob 380 ppm, plantas sob 760 ppm de CO_2 e suspensão de regas também apresentaram diminuição pronunciada da assimilação fotossintética (figura 14A), da transpiração (figura 14B) e da condutância estomática (figura 14C) já no 5º dia. Plantas sob 760 ppm e déficit hídrico apresentaram EUA mais elevada do que as plantas controle no 5º dia, seguida de queda até o 11º dia, sendo que a partir dessa coleta não foi mais possível realizar medidas de trocas gasosas devido à senescência dos órgãos aéreos (figura 14B). Nas plantas controle a EUA foi constante ao longo do experimento, exceto pelo aumento pronunciado aos 11 dias. Após a re-irrigação

ocorreu aumento da assimilação líquida e da EUA, e nesse último parâmetro, o valor encontrado foi superior ao das plantas controle (figura 14D).

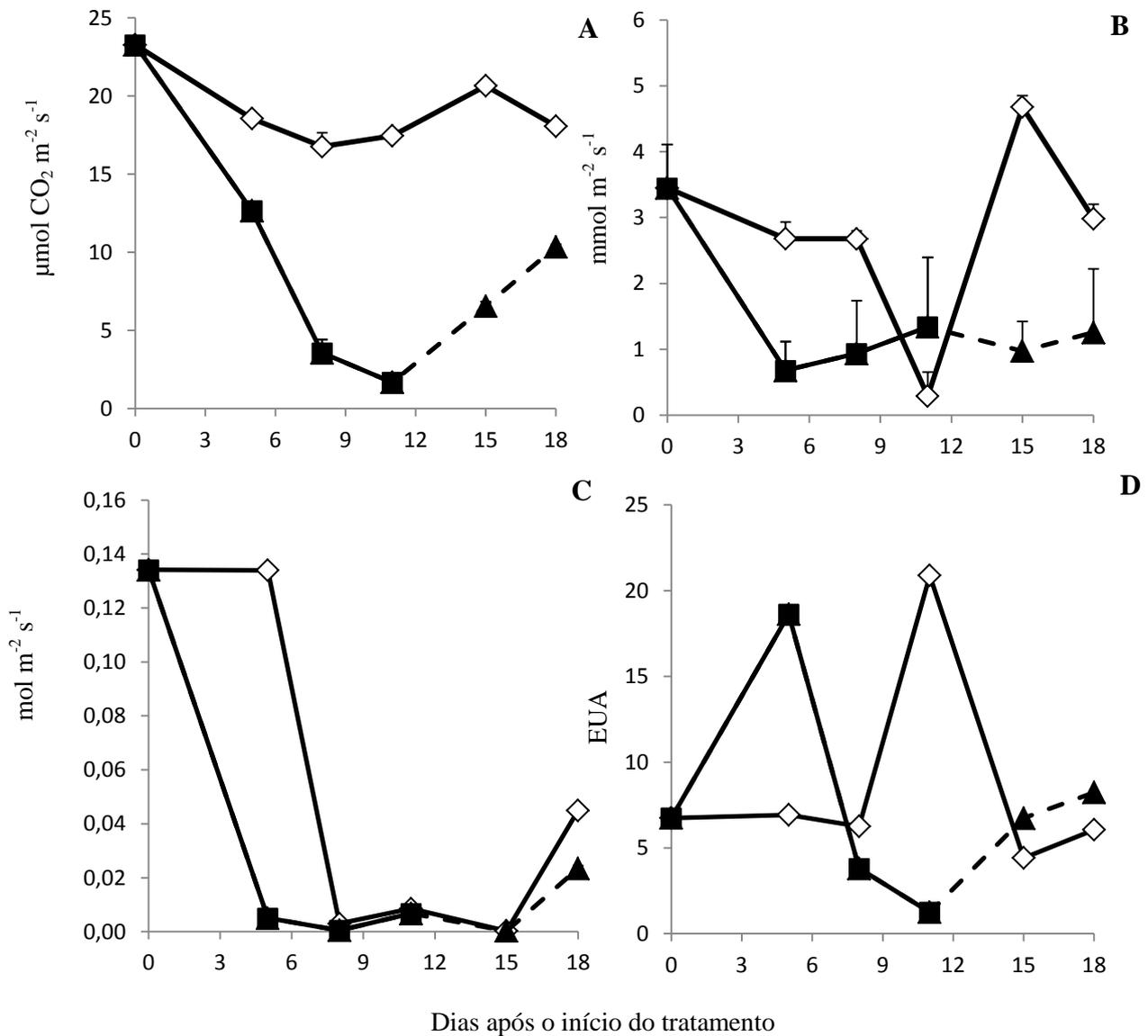


Figura 14 – Assimilação fotossintética (A), transpiração (B), condutância estomática (C) e eficiência do uso da água (D) a $720 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de folhas de *Viguiera discolor* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas sob atmosfera de $\sim 760 \text{ ppm CO}_2$. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

A figura 15 apresenta os dados de biomassa seca e teor de umidade da parte aérea das plantas sob 380 ppm e 760 ppm de CO_2 . A biomassa foi, em geral, superior nas plantas controle em ambas as condições de CO_2 (figuras 15A, B). Ao final do experimento, em todas as condições hídricas e de CO_2 , foi observada uma queda na biomassa da parte aérea, possivelmente devido à senescência desses órgãos a partir do 11º dia. O teor de umidade da

parte aérea das plantas controle não apresentou alterações durante o período experimental, mantendo-se ao redor de 70% e 80% nas plantas sob 380 ppm e 760 ppm de CO₂, respectivamente (figuras 15C, D). Já as plantas submetidas à suspensão de regas, independentemente do tratamento de CO₂, apresentaram reduções no teor de umidade logo no início do experimento, atingindo valores próximos de 20%. Após a re-irrigação, as plantas recuperaram parcialmente o conteúdo de água.

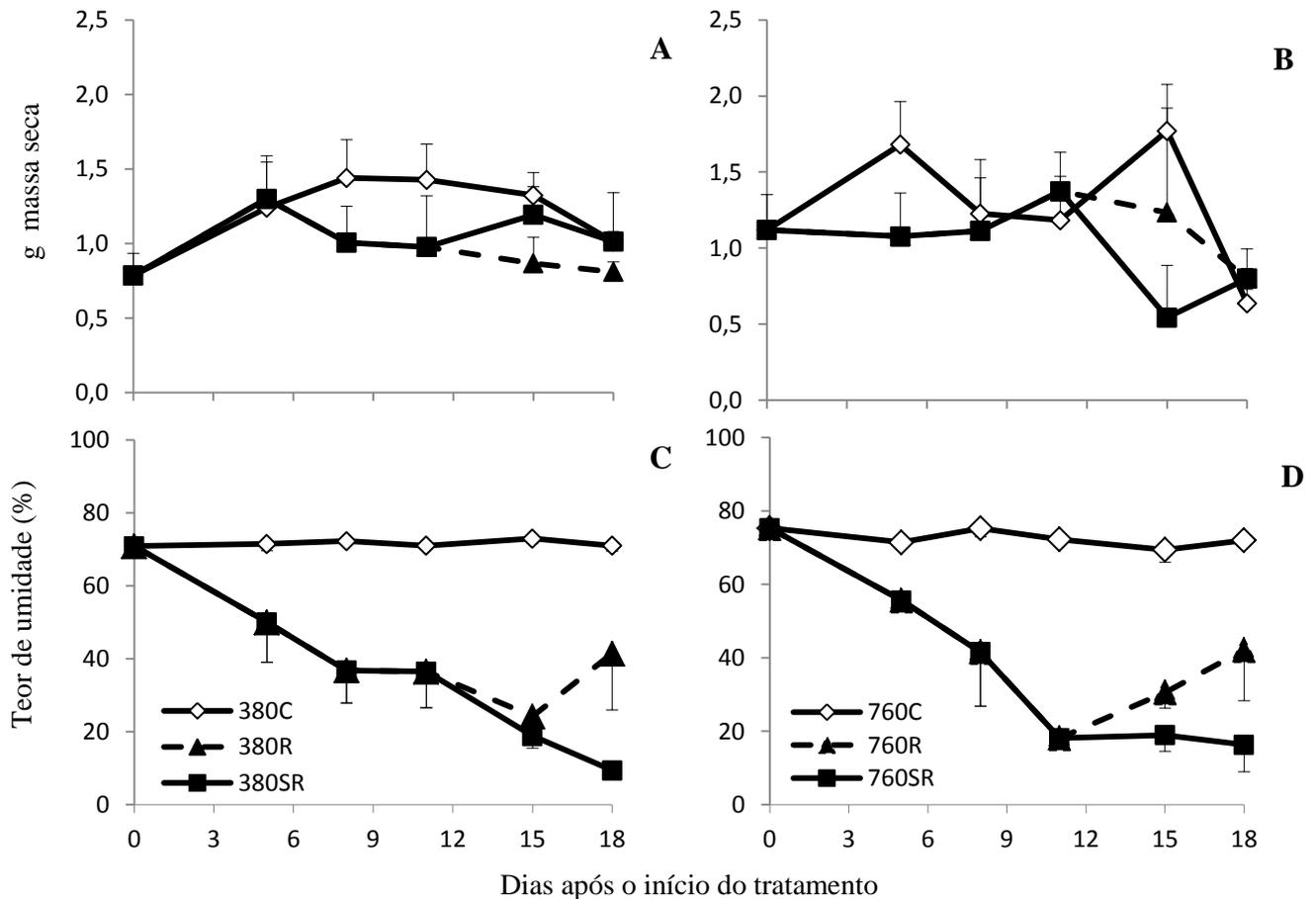


Figura 15 – Biomassa seca (A – B) e teor de umidade (%) (C – D) da árte aérea de plantas de *Viguiera discolor* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas sob atmosfera ambiente (~380 ppm A – C) e elevada (~760 ppm B – D) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3)

A biomassa seca e a umidade das raízes tuberosas estão apresentadas na figura 16. A biomassa foi, em geral, superior nas plantas controle em ambas as condições de CO₂, embora nas plantas sob 760 ppm esta tenha apresentado valores superiores aos observados nas plantas em condições ambientais naturais de CO₂, especialmente após o 11º dia (figuras 16A, B).

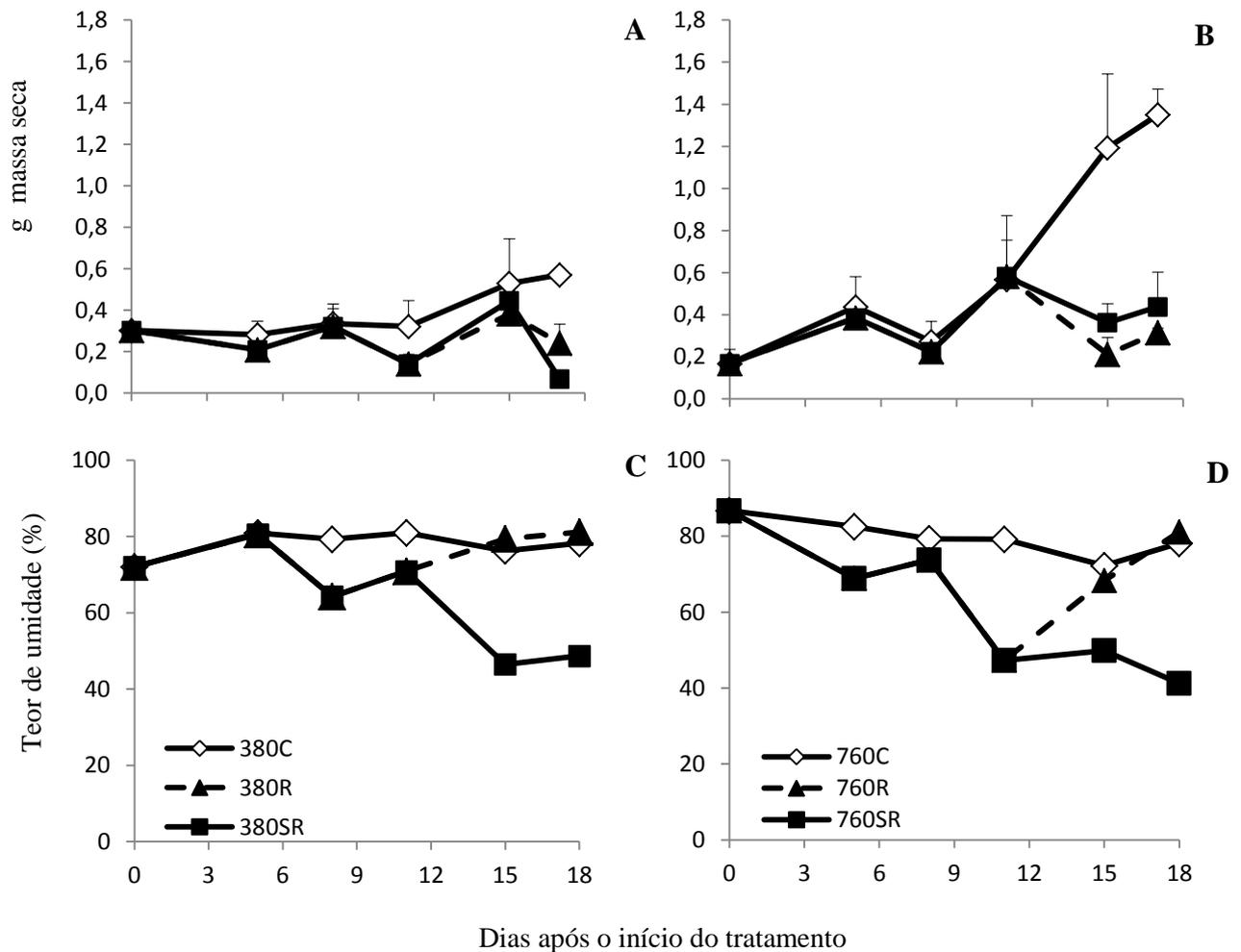


Figura 16 – Biomassa seca (A – B) e teor de umidade (%) (C – D) das raízes tuberosas de plantas de *Viguiera discolor* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas sob atmosfera ambiente (~380 ppm A – C) e elevada (~760 ppm B – D) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3)

Não houve variação no teor de umidade das raízes tuberosas das plantas controle, independente da concentração de CO₂ imposta; o valor manteve-se em torno de 80% nas duas condições (figuras 16C, D). A suspensão de regas levou à diminuição do teor de umidade das raízes tuberosas em ambas as condições atmosféricas, entretanto nas plantas sob 760 ppm de CO₂ esta diminuição ocorreu já no 5º dia, enquanto que nas plantas sob 380 ppm o teor de umidade detectado neste dia ainda foi semelhante ao observado nas plantas sob rega diária. Ao final do experimento, as plantas sob alto CO₂ e suspensão de regas apresentaram teor de umidade inferior (40%) ao verificado nas plantas sob condição ambiente de CO₂ (50%). A re-irrigação no 10º dia permitiu a recuperação do teor de umidade próximo ao verificado nas plantas controle em ambas as concentrações de CO₂.

Na figura 17 estão apresentadas as atividades das enzimas do metabolismo de frutanos. A partir do 8º dia, nas duas condições atmosféricas, as plantas sob suspensão de regas apresentaram diminuição da atividade de SST (figuras 17A, B). Por sua vez, a re-irrigação promoveu um aumento na atividade dessa enzima, especialmente nas plantas sob 760 ppm.

A atividade da FFT foi, em geral, superior nas plantas controle do que naquelas sob suspensão de regas (figuras 17C, D). Nas plantas sob suspensão de regas e 380 ppm de CO₂, a atividade de FFT apresentou aumento até o 11º dia, seguido de queda no 15º e aumento até o final do período experimental. Nas plantas sob 760 ppm e suspensão de regas, a atividade de FFT foi constante até o 8º dia, seguido de queda no 11º e novamente aumento até o final do experimento. Sob 380, as plantas re-irrigadas apresentaram atividades discretamente mais elevadas do que as plantas sob suspensão de regas. Entretanto, nas plantas sob 760 ppm, não foi observada diferença na atividade dessa enzima após a re-irrigação, quando comparadas às plantas sob suspensão de regas.

Sob condição ambiental natural de CO₂ e rega diária as plantas apresentaram aumento da atividade de FEH no início do experimento e declínio aos 8 dias (figura 17E). A partir do 11º dia e até o final do experimento, a atividade permaneceu constante. Sob 380 ppm e suspensão de regas, as plantas apresentaram aumento da atividade de FEH ao longo do período experimental, enquanto a re-irrigação acarretou em uma queda na atividade dessa enzima. Nas plantas sob 760 ppm de CO₂, as atividades mais elevadas de FEH foram observadas nas plantas sob suspensão de regas, exceto ao final do experimento, quando as plantas controle apresentaram valores superiores de atividade (figura 17F). Após a re-irrigação verificou-se um pico na atividade dessa enzima no 12º dia, seguido de queda até o final do período experimental.

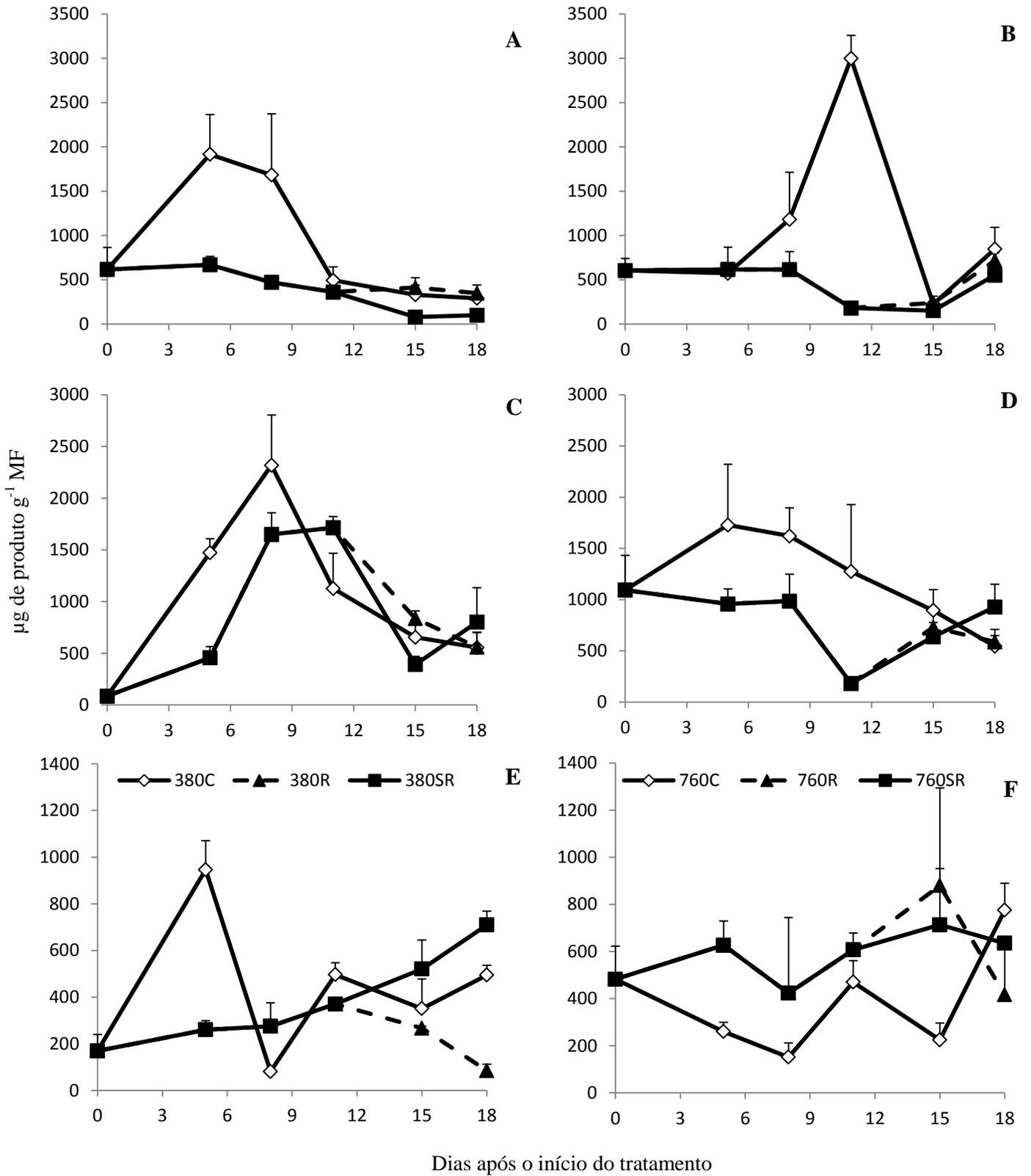


Figura 17 – Atividade da SST (A-B), FFT (C-D) e FEH (E-F) em raízes tuberosas de plantas de *Viguiera discolor* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm – A, C, E) e elevada (~760 ppm – B, D, F) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

O conteúdo de fruto-polissacarídeos nas raízes tuberosas das plantas controle mantidas sob 380 ppm de CO₂ aumentou após o 8º dia, e voltou a apresentar níveis semelhantes aos iniciais aos 18 dias (figura 18A). Nas plantas sob suspensão de regas, observou-se também um aumento mais acentuado após o 11º dia, seguido de uma queda entre os 15 e 18 dias.

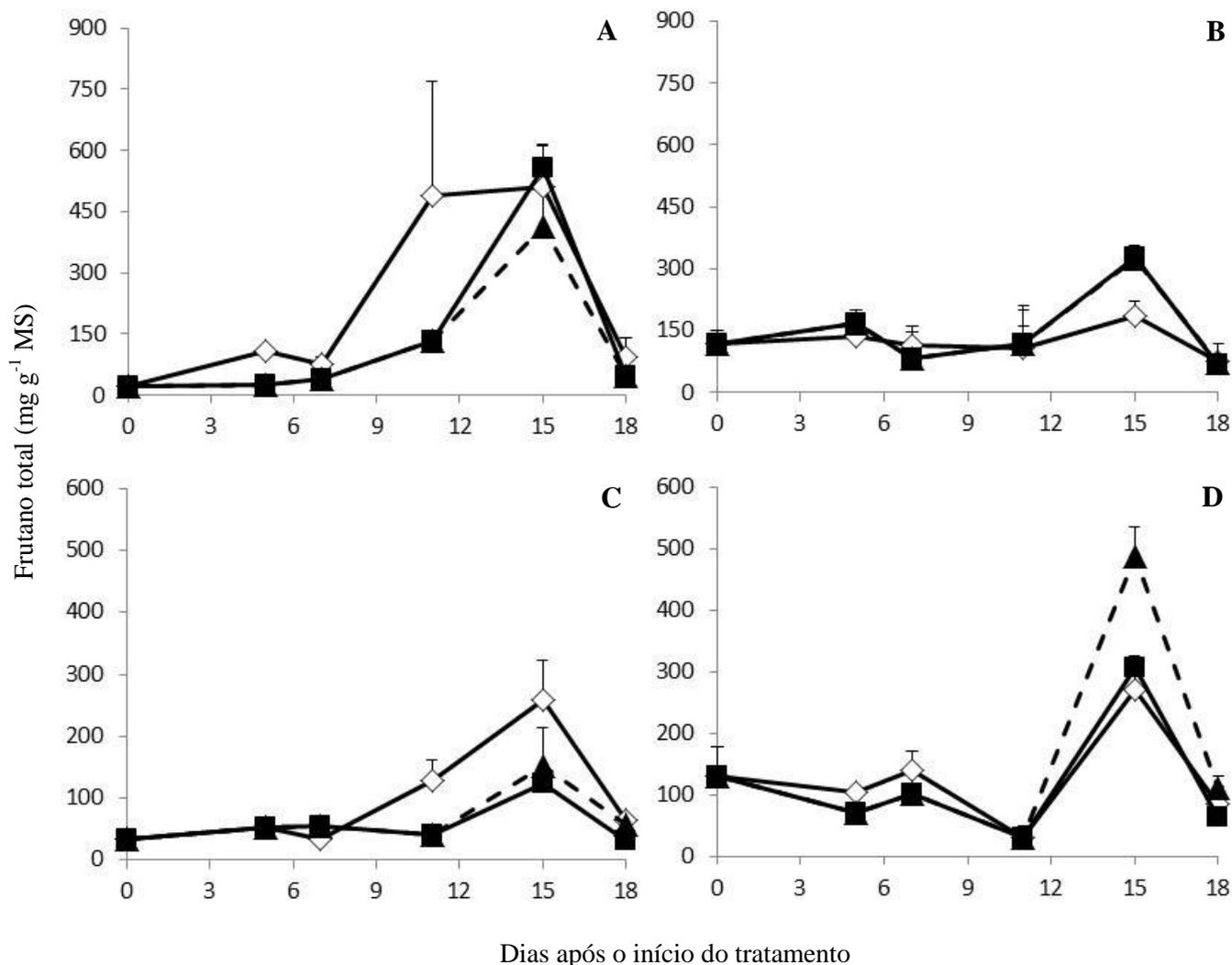


Figura 18 – Fruto-polissacarídeos (A-B) e fruto-oligossacarídeos (C-D) de raízes tuberosas de plantas de *Viguiera discolor* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Sob alto CO₂, tanto nas plantas controle quanto naquelas submetidas à suspensão de regas, o conteúdo de polissacarídeos apresentou apenas uma pequena variação ao longo do período experimental (figura 18B), com um pequeno aumento aos 15 dias, mais acentuado nas plantas sob suspensão de regas. O maior conteúdo desses compostos nas plantas re-irrigadas foi verificado aos 15 dias, acompanhando o aumento verificado nas plantas sob suspensão de regas no mesmo período, em ambas as condições atmosféricas de CO₂.

O conteúdo de fruto-oligossacarídeos nas plantas controle e suspensão de regas sob 380 ppm foi constante até o 11º dia. A partir desse ponto, as plantas controle apresentaram aumento no conteúdo desses compostos até o 15º dia, sendo superior aos demais tratamentos hídricos. (figuras 18C). Sob 760 ppm, não houve diferenças entre os tratamentos no conteúdo de oligossacarídeos até o 11º dia (figura 18D). A re-irrigação levou ao aumento no conteúdo desses compostos aos 15 dias, seguido de queda ao final do experimento, de forma mais clara nas plantas sob 760 ppm.

A razão fruto-oligo e fruto-polissacarídeos nas plantas sob 380 ppm de CO₂ foi superior nas plantas sob suspensão de regas, quando comparadas às plantas controle (figura 19). A re-irrigação também promoveu aumento discreto dessa razão no 15º dia. Nas plantas sob 760 ppm de CO₂, por sua vez, os maiores valores foram observados nas plantas controle, especialmente até o 8º dia. Após esse período, as plantas em todas as condições hídricas apresentaram valores próximos.

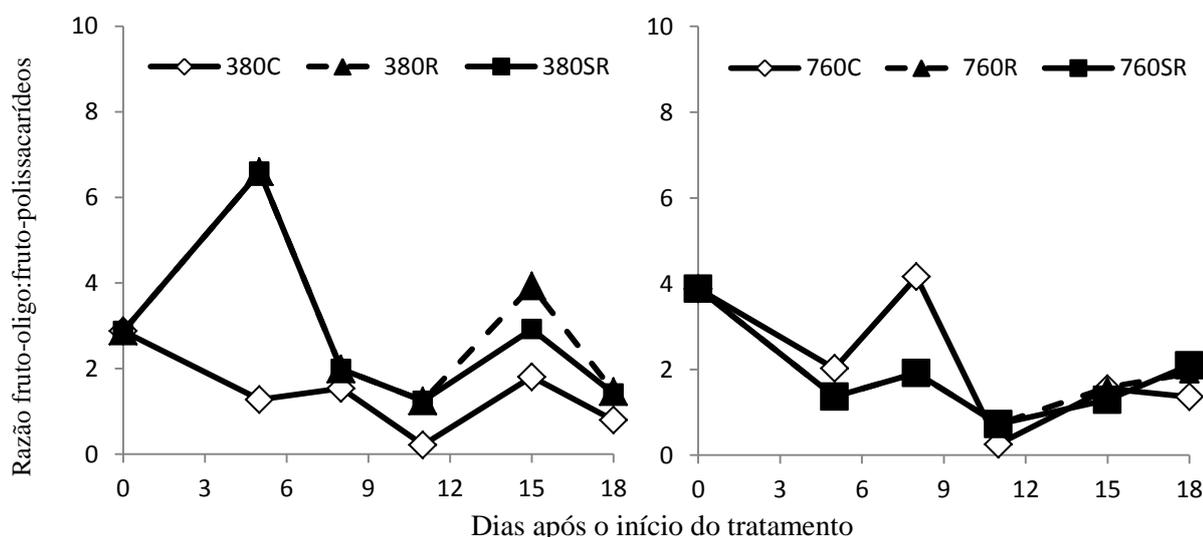


Figura 19 – Razão entre fructo-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos extraídos das raízes tuberosas de plantas de *Viguiera discolor* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂.

As plantas sob ambas as condições atmosféricas de CO₂ apresentaram, de maneira geral, aumento do conteúdo de açúcar redutor sob suspensão de regas, seguido de diminuição, em ambas as condições hídricas, até aproximadamente os 15 dias e aumento aos 18 dias (figura 20).

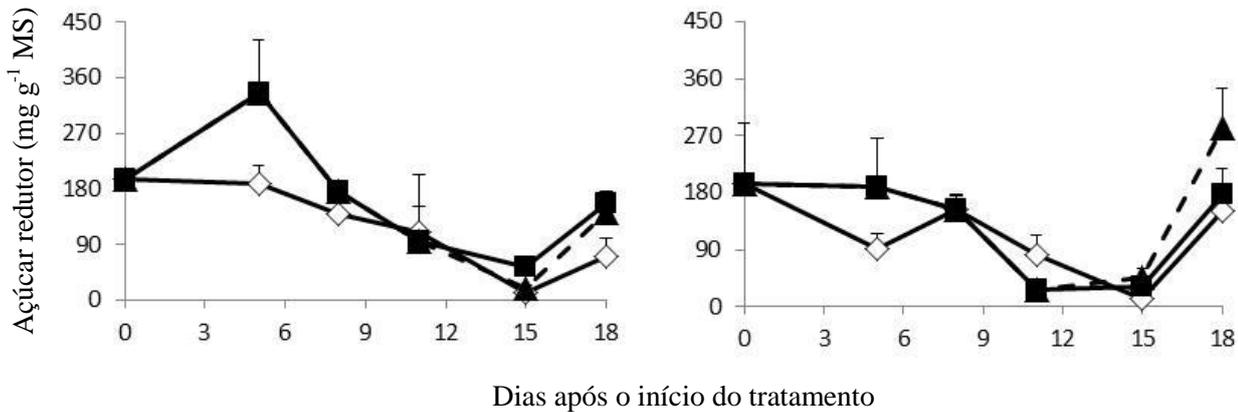


Figura 20 – Conteúdo de açúcar redutor em raízes tuberosas de plantas de *Viguiera discolor* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Aos 15 dias, nas plantas sob suspensão de regas, o conteúdo de açúcares redutores foi mais elevado do que o detectado nas plantas controle nas duas concentrações de CO₂. No 18º dia, houve aumento no conteúdo destes compostos nos 3 grupos de plantas, em ambas as concentrações de CO₂, sendo mais pronunciado nas plantas re-irrigadas sob 760 ppm.

4.2 Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração atmosférica elevada de CO₂ no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* – estudo comparativo em duas estações: primavera e inverno

Na figura 21 estão apresentados os valores de potencial hídrico do solo (Ψ_{wsolo}) do experimento realizado na primavera evidenciando que não houve alterações no controle, independente da condição de CO₂ imposta. Por outro lado, a suspensão de regas foi suficiente para causar a diminuição do Ψ_{wsolo} , sendo mais acentuada sob 380 ppm. Os menores valores foram detectados 17 dias após a suspensão de regas: aproximadamente -18 MPa no solo sob 380 ppm e -12 MPa sob 760 ppm. A re-irrigação, realizada no 10º dia, foi suficiente para promover a rápida recuperação do Ψ_{wsolo} nas duas condições atmosféricas de CO₂.

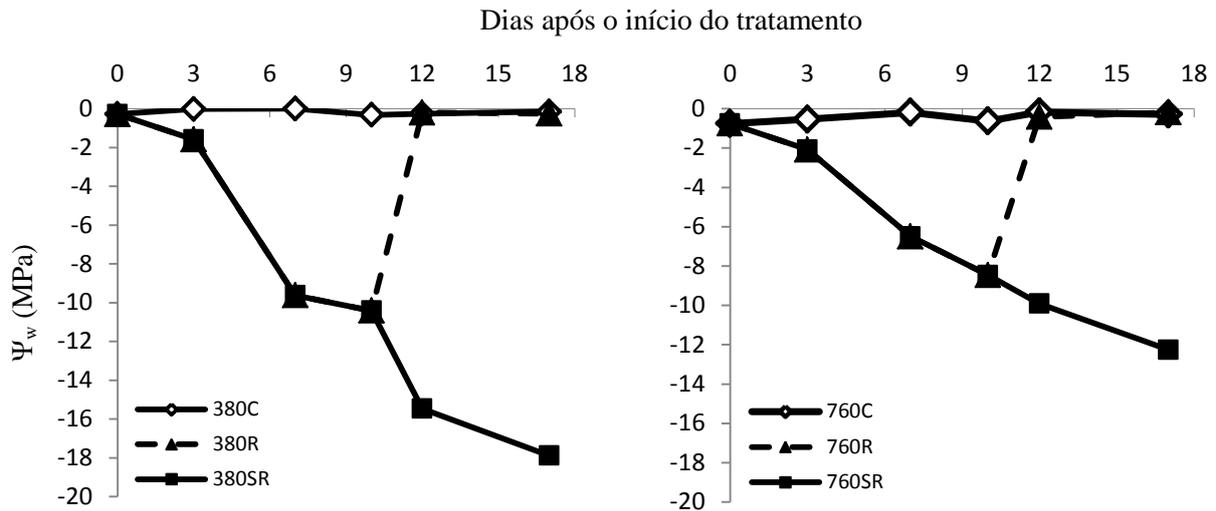


Figura 21 – Potencial hídrico do solo ($\Psi_{w\text{solo}}$) dos vasos de *Vernonia herbacea* submetidos à rega diária (\diamond), à suspensão de rega (\blacksquare) e à re-irrigação (\blacktriangle), mantidos em condições ambiente (~ 380 ppm) e elevada (~ 760 ppm) de CO_2 na primavera.

De maneira semelhante ao potencial hídrico, a suspensão de regas causou diminuição do teor de umidade do solo em ambas as condições atmosféricas de CO_2 , independente da época de realização do experimento (figura 22). Entretanto, essa diminuição foi mais acentuada no início do experimento nas plantas sob 380 ppm, tanto na primavera quanto no inverno. Ao final do experimento, as plantas sob suspensão de regas em ambas as concentrações de CO_2 e épocas a umidade do solo chegou próxima a 5%. A re-irrigação possibilitou a recuperação do teor de umidade a níveis próximos aos das plantas controle, especialmente naquelas sob 380 ppm, em ambos os experimentos.

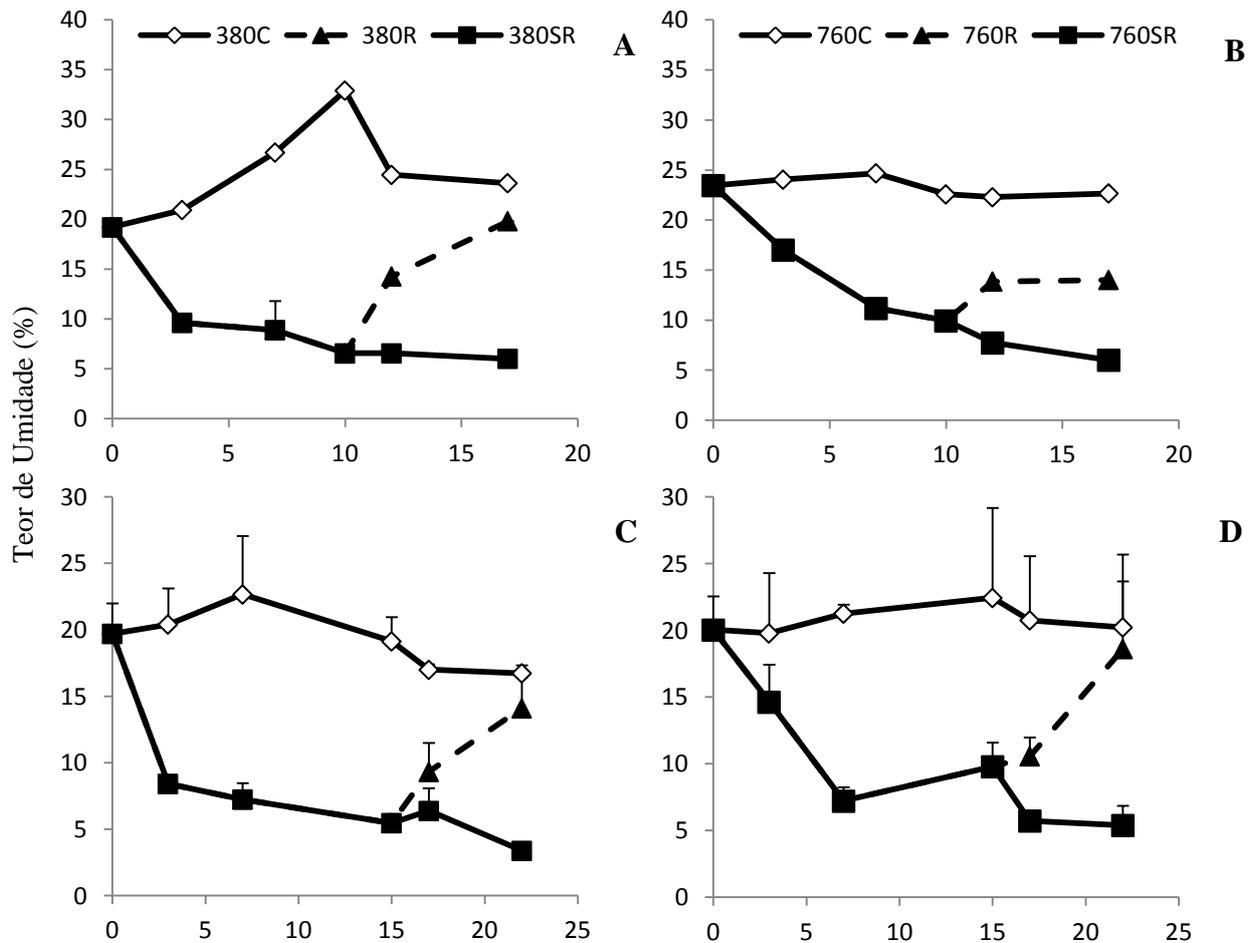


Figura 22 – Teor de umidade dos vasos de *Vernonia herbacea* submetidos à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidos em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂, na primavera (A-B) e no inverno (C-D). As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

O potencial hídrico da parte aérea (Ψ_{wpa}) manteve-se praticamente constante nas plantas controle, em ambas as concentrações de CO₂ na primavera (figuras 23A, B) e no inverno (figuras 24A, B). A suspensão de regas causou uma queda no Ψ_{wpa} , mais acentuada nas plantas sob 380 ppm de CO₂. Na primavera, a queda ocorreu já no 3º dia, enquanto no inverno esta ocorreu a partir do 7ª dia. Na primavera, a partir 10º dia e em ambas as condições atmosféricas de CO₂, não foi possível determinar o Ψ_{wpa} em plantas sob suspensão de regas, devido à senescência dos órgãos.

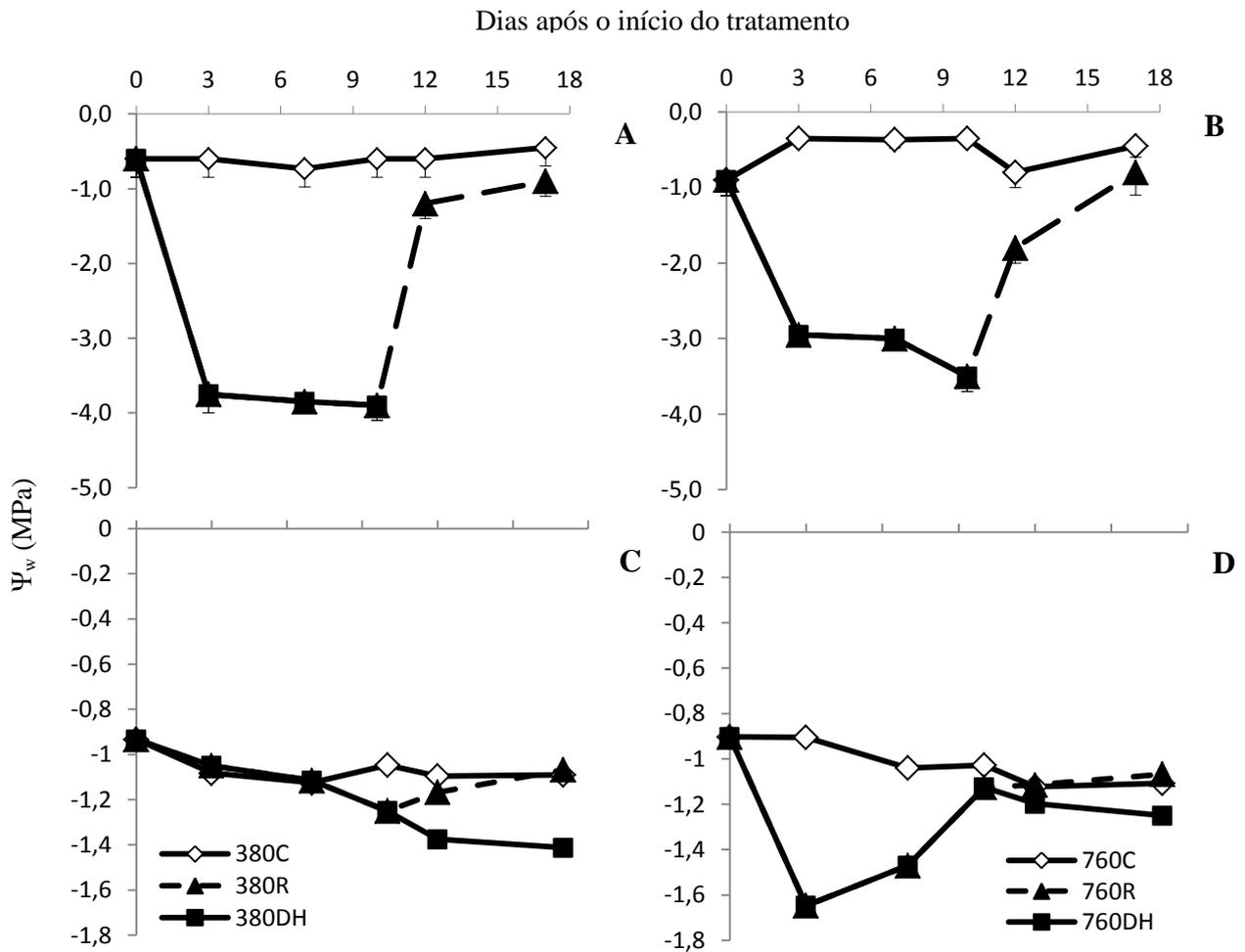


Figura 23 – Potencial hídrico das folhas (A-B) e dos rizóforos (C-D) de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂ na primavera. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

No inverno, por sua vez, plantas sob 380 ppm apresentaram senescência a partir do 15º dia, enquanto plantas sob 760 ppm mantiveram a parte aérea durante todo o período experimental. Assim como ocorreu no solo, a re-irrigação aos 10 dias na primavera e aos 15 dias no inverno, possibilitou a recuperação do Ψ_{wpa} a níveis próximos aos das plantas controle, especialmente ao final do período experimental.

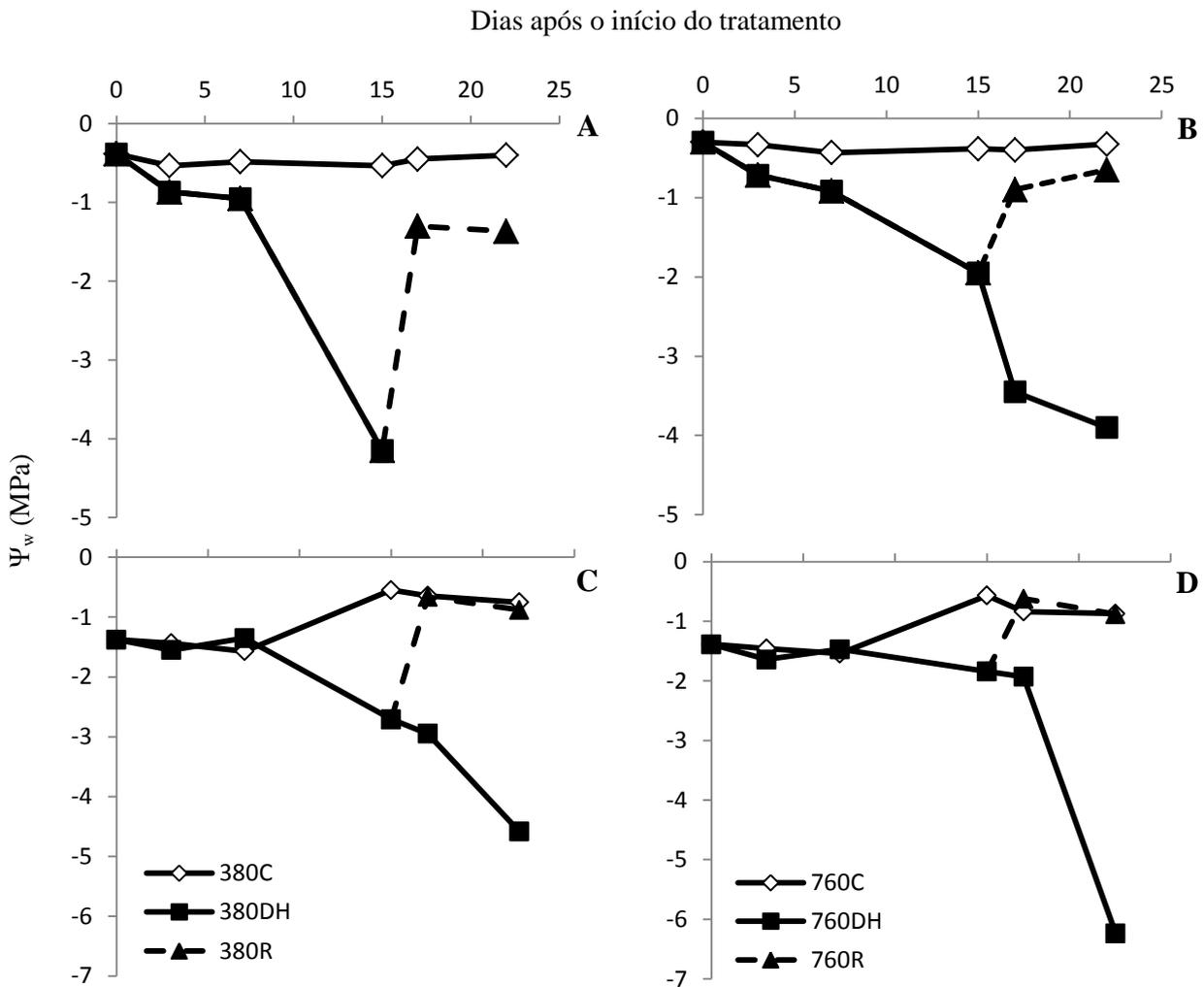


Figura 24 – Potencial hídrico das folhas (A-B) e dos rizóforos (C-D) de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (\diamond), à suspensão de rega (\blacksquare) e à re-irrigação (\blacktriangle), mantidas em condições ambiente (~ 380 ppm – A - C) e elevada (760 ppm – B - D) de CO_2 no inverno.

Quanto ao potencial hídrico dos órgãos subterrâneos (Ψ_{wsub}), os rizóforos, a suspensão de regas resultou na sua diminuição tanto nas plantas sob 380 ppm (figuras 23C, 24C) quanto naquelas sob 760 ppm (figura 23D, 24D). No experimento realizado na primavera (figuras 23C, D), o Ψ_{wsub} , que inicialmente situava-se em -0,80 MPa, diminuiu em plantas sob 380 ppm e déficit hídrico a partir do 7º dia, atingindo o valor de -1,4 MPa ao final do experimento. Por outro lado, em plantas sob 760 ppm a diminuição do potencial hídrico dos rizóforos foi mais rápida e acentuada, atingindo no 3º dia -1,6 MPa que foi seguido de um aumento ao final o experimento para -1,25 MPa.

No experimento do inverno (figuras 24C, D), o Ψ_{wsub} de plantas sob suspensão de regas em ambas as concentrações de CO_2 manteve-se constante, com valores próximos à -1,2 MPa desde o início do período experimental, até o 7º dia, quando apresentou queda até

-4,5 MPa e -6,2 MPa nas plantas sob 380 e 760 ppm de CO₂, respectivamente. A re-irrigação aos 10 dias na primavera e aos 15 dias no inverno possibilitou a recuperação do potencial hídrico dos rizóforos a níveis próximos ao das plantas controle.

A assimilação fotossintética (figura 25A), a transpiração (figura 25B) e a condutância estomática (figura 25C) foram, em geral, menores nas plantas sob déficit hídrico e 380 ppm de CO₂ do que nas plantas controle. A eficiência do uso da água (EUA) nas plantas sob déficit hídrico apresentou variações ao longo do período (figura 25D), com queda acentuada a partir do 7º dia. A partir do 15º dia não foi possível realizar medidas de trocas gasosas nestas plantas devido à senescência dos órgãos aéreos. Após a re-irrigação, as plantas apresentaram aumento desses parâmetros, em especial da EUA, que no 17º dia foi superior à verificada nas plantas controle.

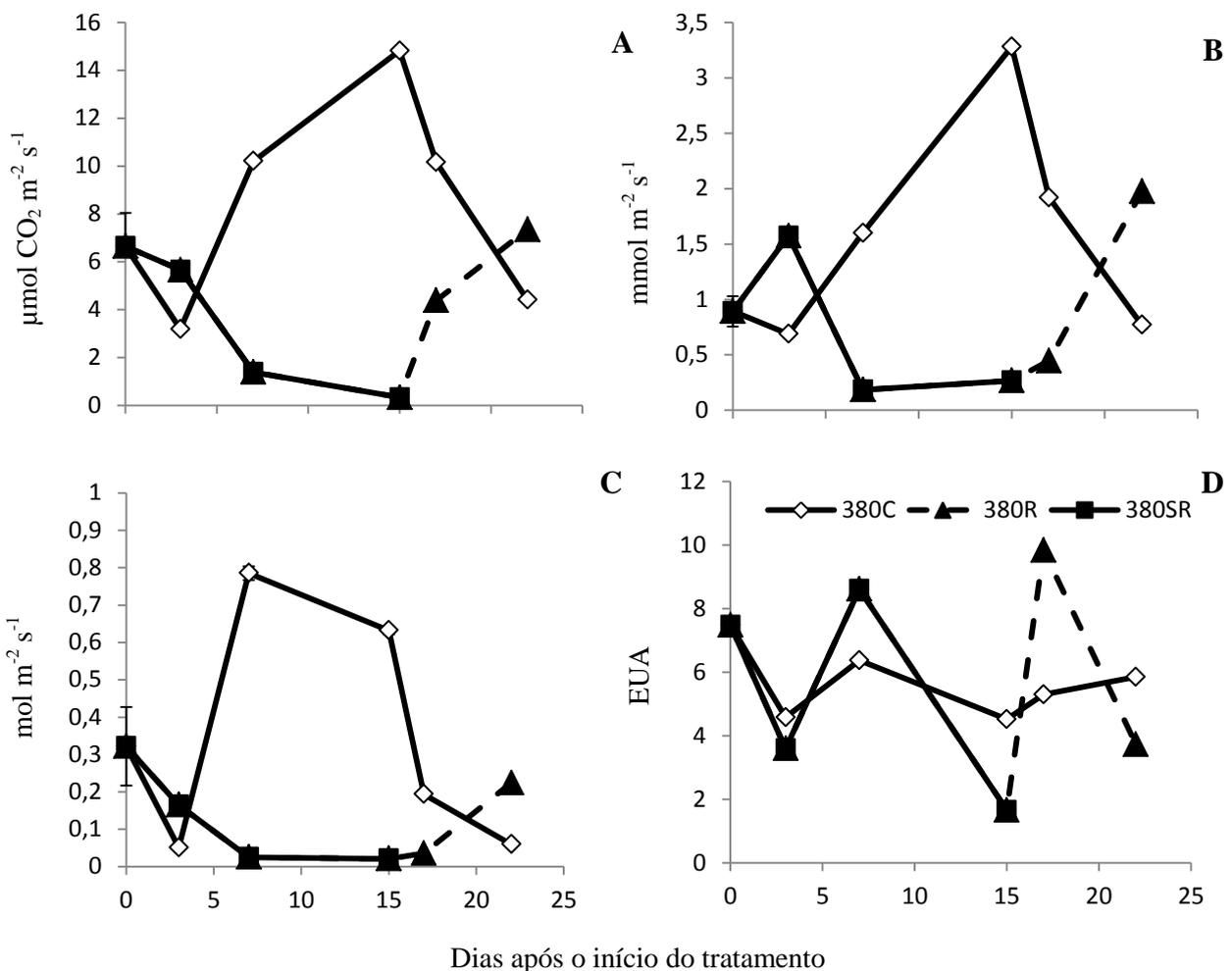


Figura 25 – Assimilação fotossintética (A), transpiração (B), condutância estomática (C) e eficiência do uso da água instantânea (D) à $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de folhas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (\diamond), à suspensão de rega (\blacksquare) e à re-irrigação (\blacktriangle), mantidas em condições ambiente (~ 380 ppm) de CO₂ no inverno (n=3).

Ao contrário do observado nas plantas mantidas sob 380 ppm, plantas sob 760 ppm de CO₂ e déficit hídrico apresentaram aumento da assimilação fotossintética (figura 26A), da transpiração (figura 26B) e da condutância estomática (figura 26C) após o 3º dia. Após este aumento, ocorreu uma queda acentuada dos parâmetros analisados. A EUA (figura 26D) não diferiu entre os tratamentos hídricos até o 17º dia, após o qual as plantas sob suspensão de regas apresentaram um declínio acentuado. A re-irrigação, aos 15 dias, promoveu aumento dos parâmetros analisados a valores próximos aos das plantas controle.

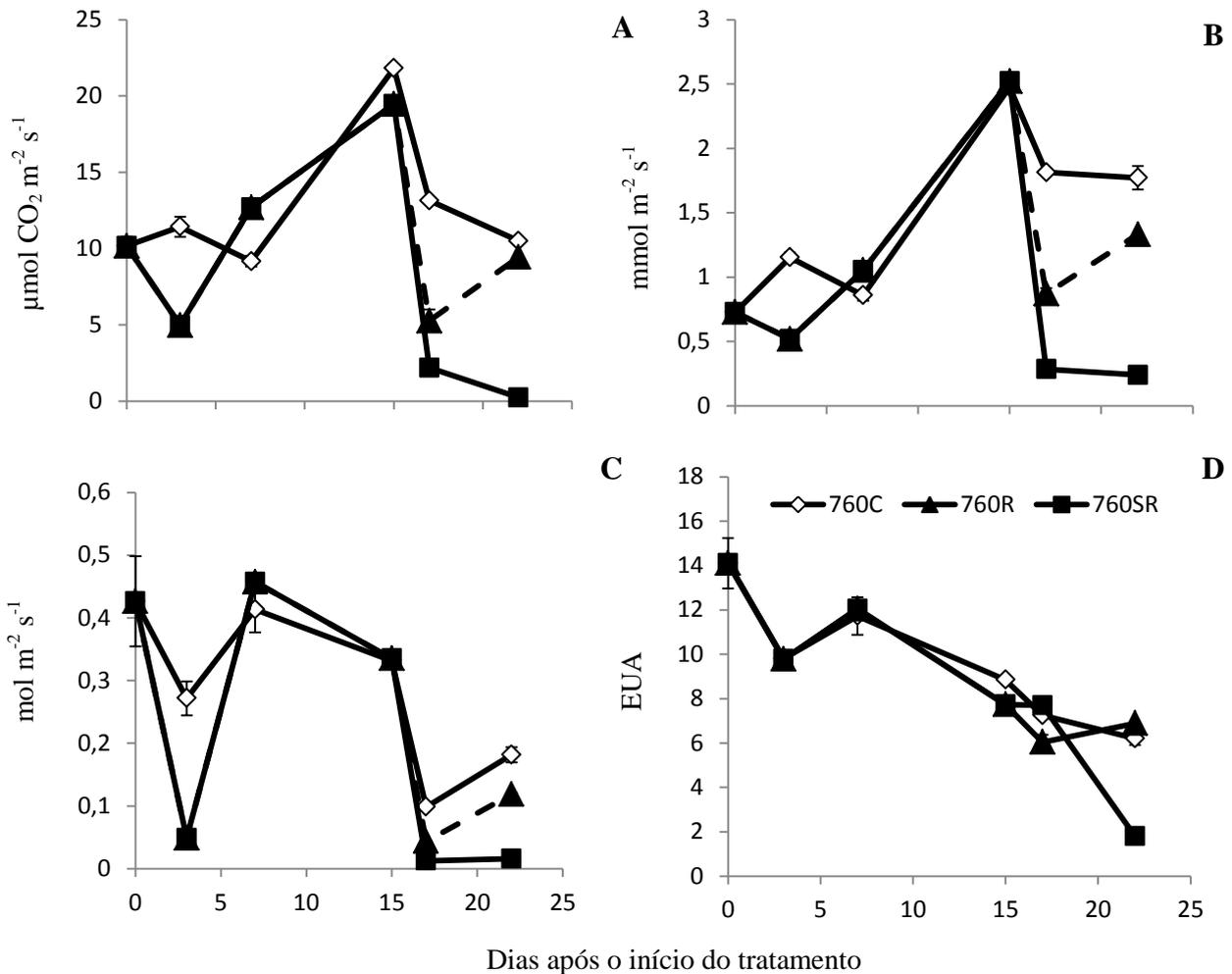


Figura 26 – Assimilação fotossintética (A), transpiração (B), condutância estomática (C) e eficiência do uso da água instantânea (D) à $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de folhas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (\diamond), à suspensão de rega (\blacksquare) e à re-irrigação (\blacktriangle), mantidas em condições elevadas (~ 760 ppm) de CO₂ no inverno (n=3).

Nos experimentos realizados na primavera e no inverno, a biomassa seca da parte aérea foi superior nas plantas sob suspensão de regas e 380 ppm de CO₂, exceto nos 7 primeiros dias de experimento, quando os valores encontrados foram semelhantes aos observados nas plantas controle (figura 27A, 28A). Na primavera, as plantas sob 760 ppm e suspensão de regas também apresentaram, em geral, valores superiores às plantas controle (figura 27B). No inverno, as plantas mantidas sob 760 ppm e suspensão de regas apresentaram valores de biomassa seca superiores às plantas controle no início do período experimental (figura 28B). Na primavera, a re-irrigação promoveu aumento na biomassa aérea somente nas plantas sob 760 ppm, enquanto que no experimento realizado no inverno esse aumento foi observado em ambas as [CO₂] no 22º dia.

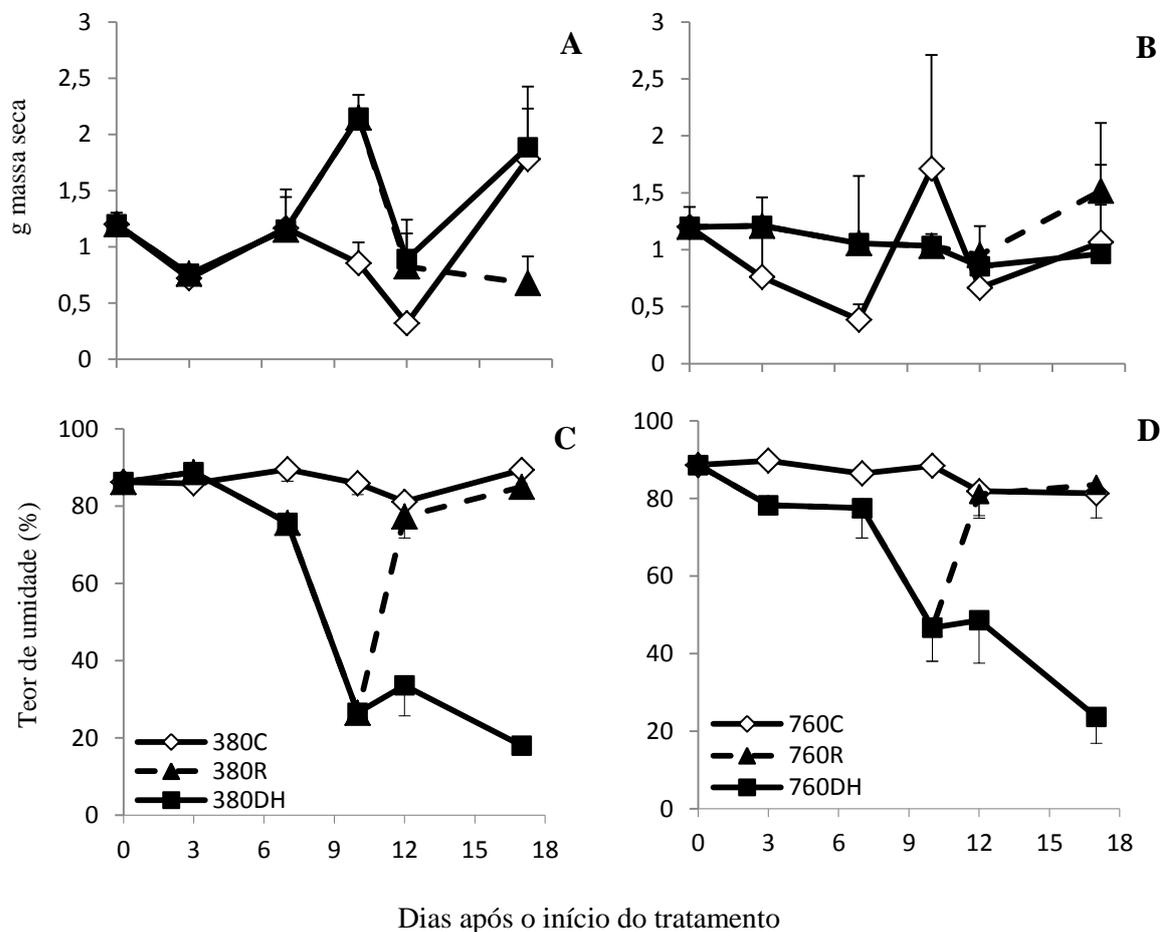


Figura 27 – Biomassa seca (A - B) e teor de umidade (%) (C - D) da parte aérea de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂ na primavera. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

O teor de umidade da parte aérea nas plantas controle não apresentou grandes variações ao longo do período experimental, independente da concentração de CO₂ à qual estavam expostas e da época de realização do experimento (figuras 27C, D, 28C, D). Já nas plantas sob suspensão de regas no experimento realizado na primavera, o teor de umidade apresentou reduções a partir do 3º dia, nas plantas sob 760 ppm de CO₂, e a partir do 7º dia, nas plantas sob 380 ppm. No inverno, essa redução ocorreu a partir do 7º dia nas plantas sob 760 ppm e no 15º dia nas plantas sob 380 ppm de CO₂.

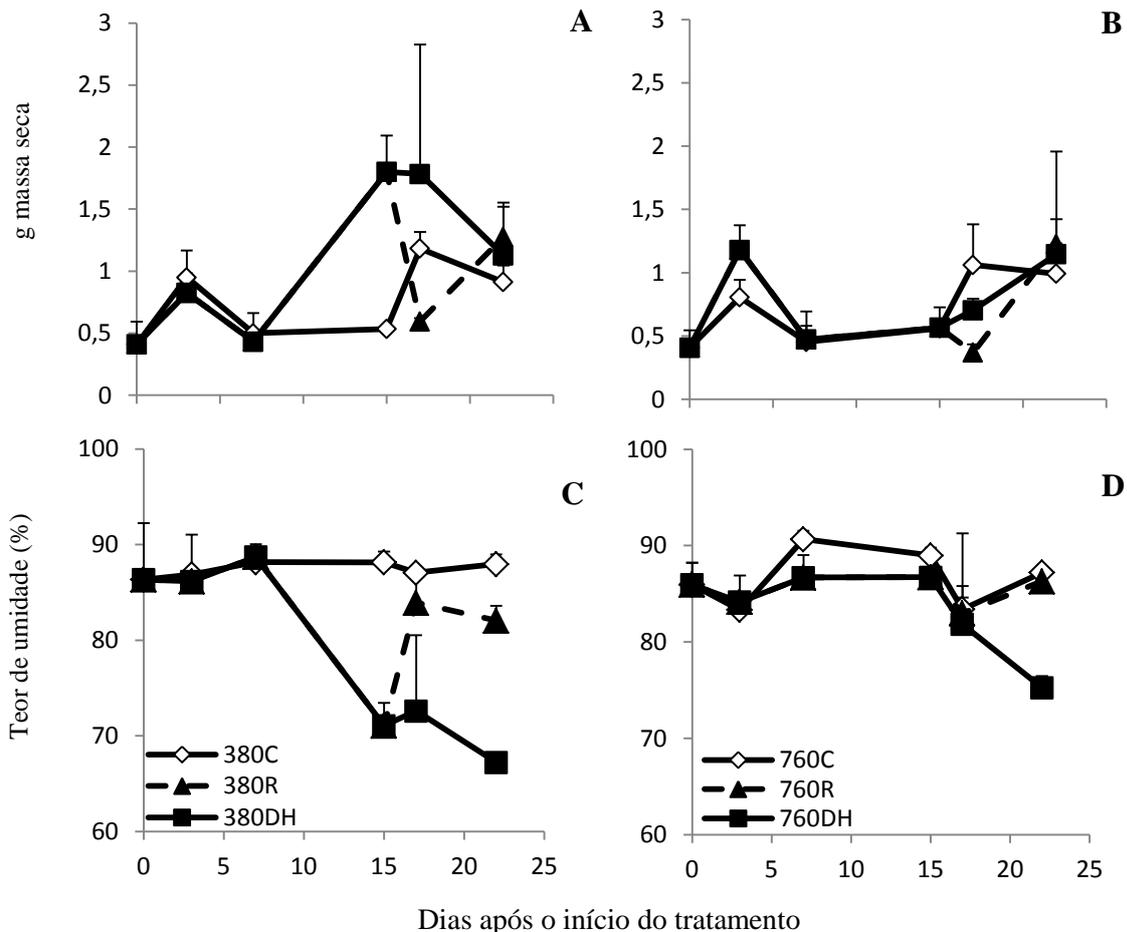


Figura 28 – Biomassa seca (A - B) e teor de umidade (%) (C - D) da parte aérea de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂ no inverno. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Portanto, em ambos os experimentos as plantas sob alto CO₂ mantiveram um teor de água superior por um período maior do que as plantas sob 380 ppm. Na primavera, o teor de umidade inicial foi de cerca de 85% e atingiu, ao final do experimento, valores próximos à 20%, enquanto que no inverno este valor iniciou-se em cerca de 85% nas plantas nas duas condições atmosféricas, diminuindo para cerca de 70% nas plantas sob 380ppm e 75%

naquelas sob 760 ppm. Após a re-irrigação, em ambos os experimentos, as plantas recuperaram aproximadamente 100% do teor de água original, e atingiram valores próximos aos encontrados nas plantas controle.

A biomassa seca dos rizóforos foi, em geral, superior nas plantas sob suspensão de regas em ambas as condições de CO₂ e nos dois experimentos realizados (figuras 29A, B, 30A, B), exceto nas plantas sob 380 ppm do experimento de inverno, no qual o valor mais elevado foi verificado somente aos 22 dias. A re-irrigação causou diminuição na biomassa do rizóforo sob 760 ppm na primavera, enquanto que no inverno, houve aumento da biomassa desse órgão ao final do experimento, nas duas condições atmosféricas.

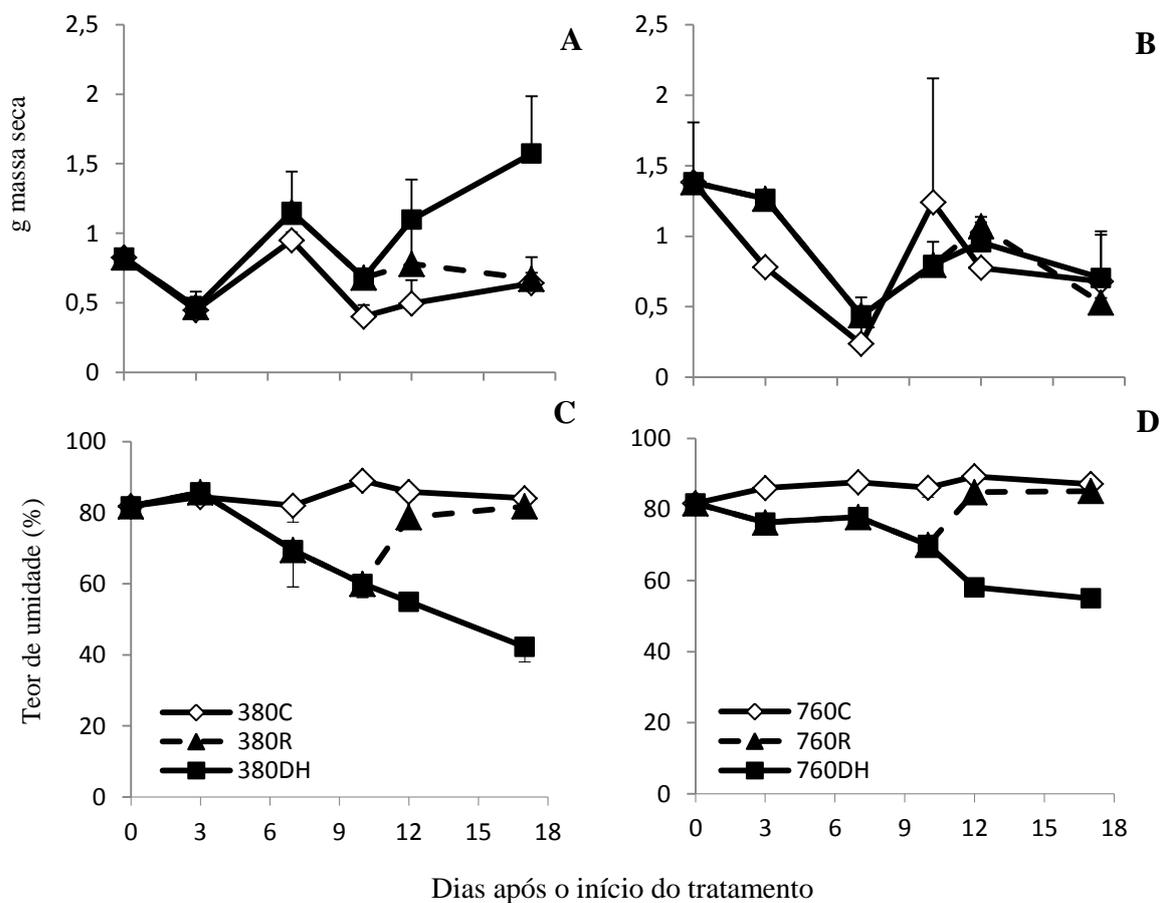


Figura 29 – Biomassa seca (A - B) e teor de umidade (%) (C - D) dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂ na primavera. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Nas figuras 29 (C, D) e 30 (C, D) verifica-se que o teor de umidade dos rizóforos das plantas controle manteve-se praticamente constante com valores próximos a 80%. Em ambas as épocas, primavera e inverno, observa-se que a suspensão de regas causou uma diminuição do teor de umidade dos rizóforos em ambas as condições atmosféricas. Na primavera, esta diminuição foi mais intensa sob 380 ppm, embora tenha se diferenciado do controle apenas após o 3º dia, enquanto que sob 760 ppm, a diferença ocorreu logo após o início da imposição do déficit hídrico. Ao término do período experimental, as plantas sob 380 ppm e suspensão de regas perderam metade do seu conteúdo de água, enquanto que no alto CO₂, o valor obtido no mesmo período foi próximo de 60%. Já no inverno, em que o teor de umidade inicial era de cerca de 50% em ambas concentrações de CO₂, a diminuição ocorreu a partir do 7º dia nas plantas sob 380 ppm e do 17º dia naquelas sob 760 ppm de CO₂, embora ao final do experimento ambas tenham apresentado valores semelhantes entre si (50%).

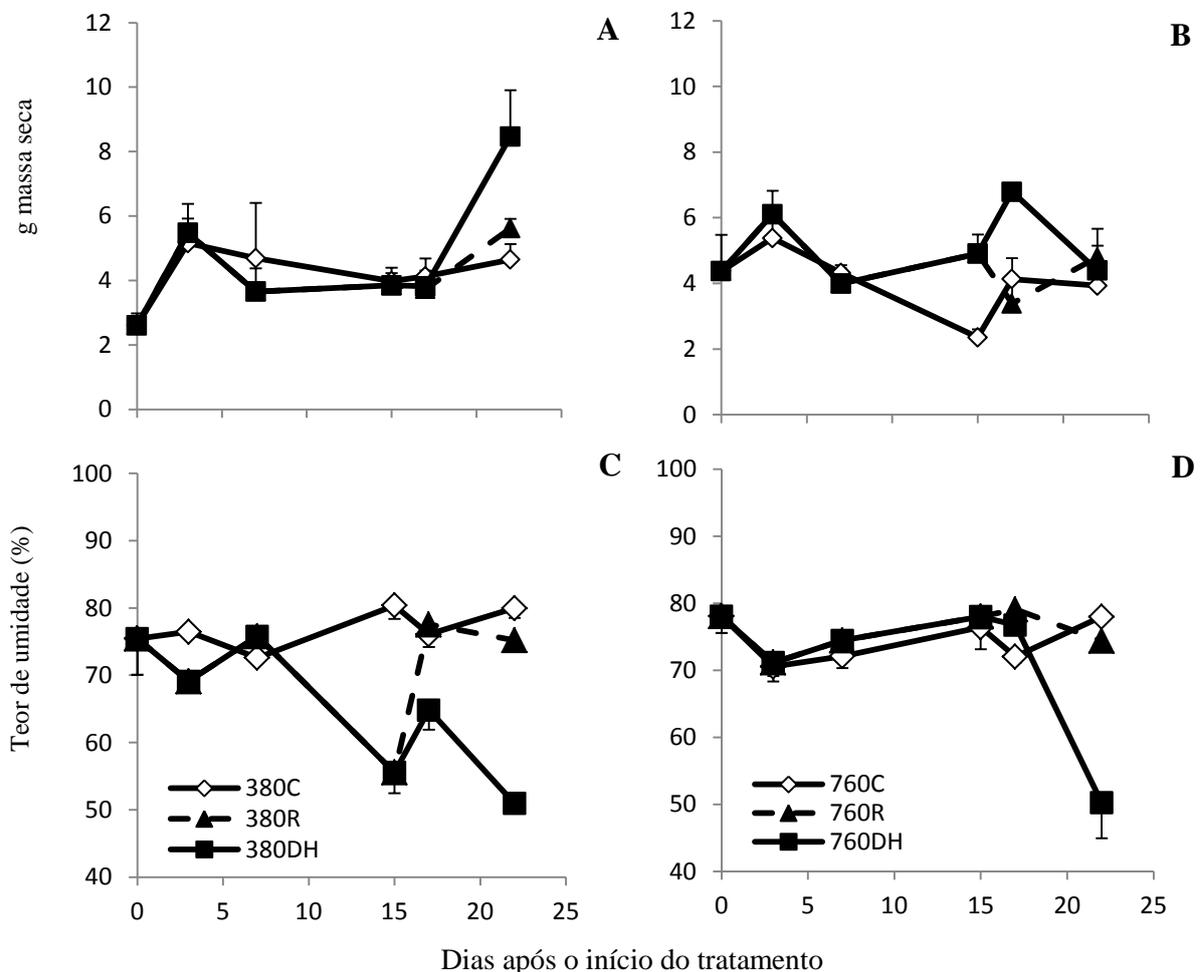


Figura 30 – Biomassa seca (A - B) e teor de umidade (%) (C - D) dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂ no inverno. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

As plantas submetidas à re-irrigação, em ambos os experimentos, recuperaram o teor de umidade dos rizóforos em 2 dias, atingindo níveis próximos às plantas controle aos 12 dias, na primavera, e aos 17 dias, no inverno.

As figuras 31 e 32 mostram a atividade das enzimas do metabolismo de frutanos nos experimentos realizados na primavera e no inverno, respectivamente. No experimento de primavera, a SST apresentou aumento de atividade no 3º dia nas plantas controle sob 380 ppm e nas planta controle e sob suspensão de regas sob 760 ppm (figuras 31A, B). Após o 3º dia, as plantas sob 760 ppm apresentaram queda da atividade até o final do período. Nas plantas sob suspensão de regas e 380 ppm, o aumento ocorreu no 7º dia, superando a atividade detectada nas plantas controle apenas neste ponto de amostragem. No inverno, a SST apresentou aumento de atividade do início do experimento até o dia 7 nas plantas sob 380 ppm e suspensão de regas, após o que apresentou declínio até o final do período (figura 32A), enquanto sob 760 ppm de CO₂, as plantas controle foram as que apresentaram as maiores atividades de SST (figura 32B).

Das enzimas estudadas, a FFT foi a que apresentou atividade mais elevada nos dois experimentos. Na primavera, as plantas sob déficit hídrico e 380 ppm apresentaram atividade de FFT mais estável que as plantas controle até o 12º dia, após o qual apresentou aumento pronunciado (figura 31C). Após a re-irrigação, aos 10 dias, também ocorreu aumento pronunciado dessa atividade. Sob 760 ppm, ocorreram pequenas variações ao longo do período nas plantas sob suspensão hídrica, enquanto nas plantas controle a atividade dessa enzima foi mais estável (Figura 31D). No inverno, as plantas sob suspensão de regas e 380 ppm apresentaram valores mais elevados até o 15º dia (Figura 32C), enquanto que nas plantas sob 760 ppm este aumento foi mais pronunciado após o 15º dia. A re-irrigação permitiu um aumento da atividade dessa enzima somente nas plantas mantidas sob 380 ppm na primavera.

Com relação à FEH, as plantas sob déficit hídrico apresentaram, em geral, atividades mais elevadas do que as plantas controle, em ambas as condições atmosféricas de CO₂ e nos dois experimentos. Enquanto na primavera a atividade se manteve constante até o final do experimento em ambas as condições atmosféricas de CO₂, no inverno, tanto as plantas sob 380 ppm quanto aquelas sob 760 ppm apresentaram diminuição da atividade de FEH a partir do 15º dia. A re-irrigação promoveu aumento na atividade dessa enzima somente nas plantas sob 380 ppm no inverno e 760 ppm na primavera.

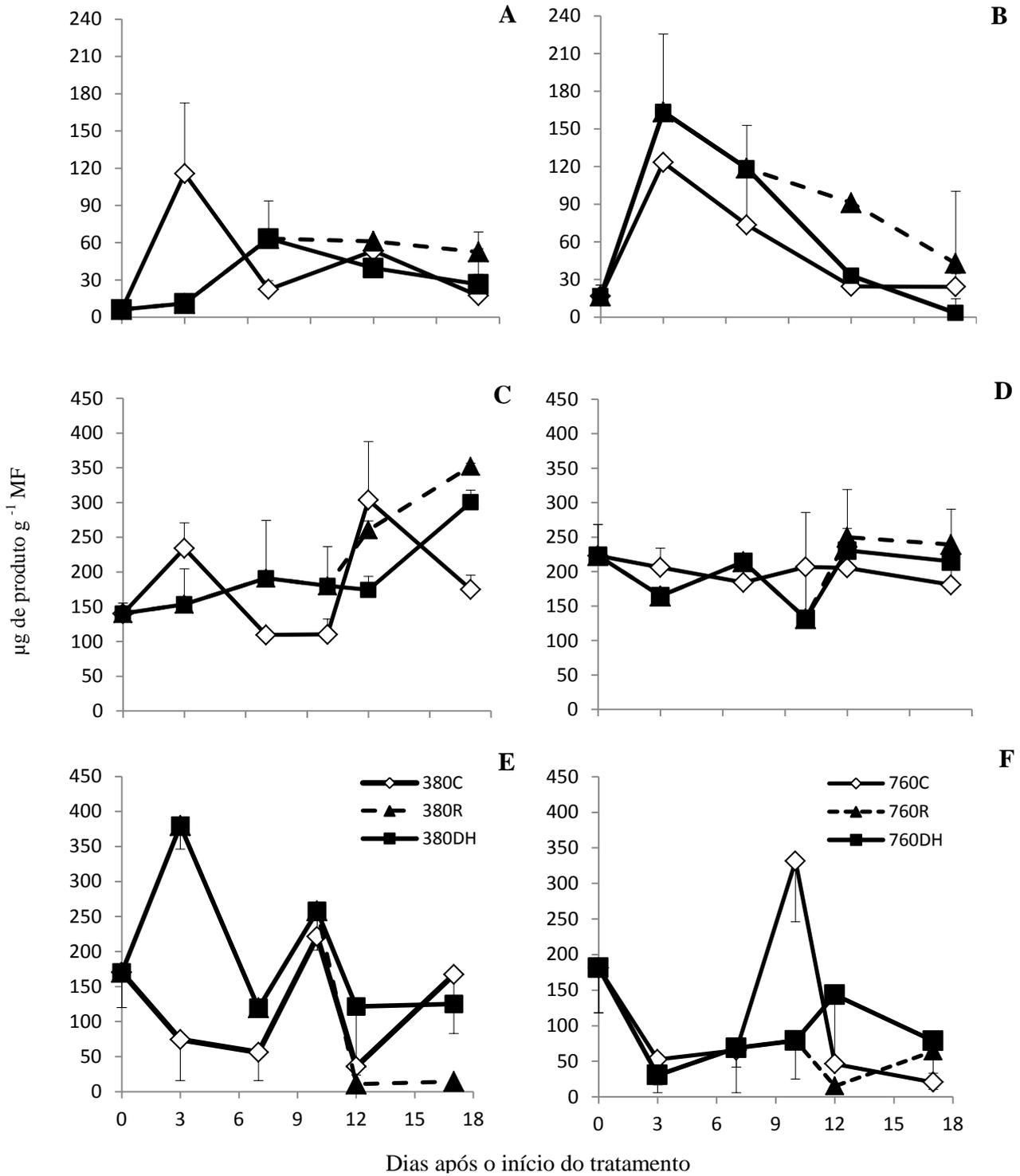


Figura 31 – Atividade da SST (A - B), FFT (C - D) e FEH (E - F) em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂ na primavera. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

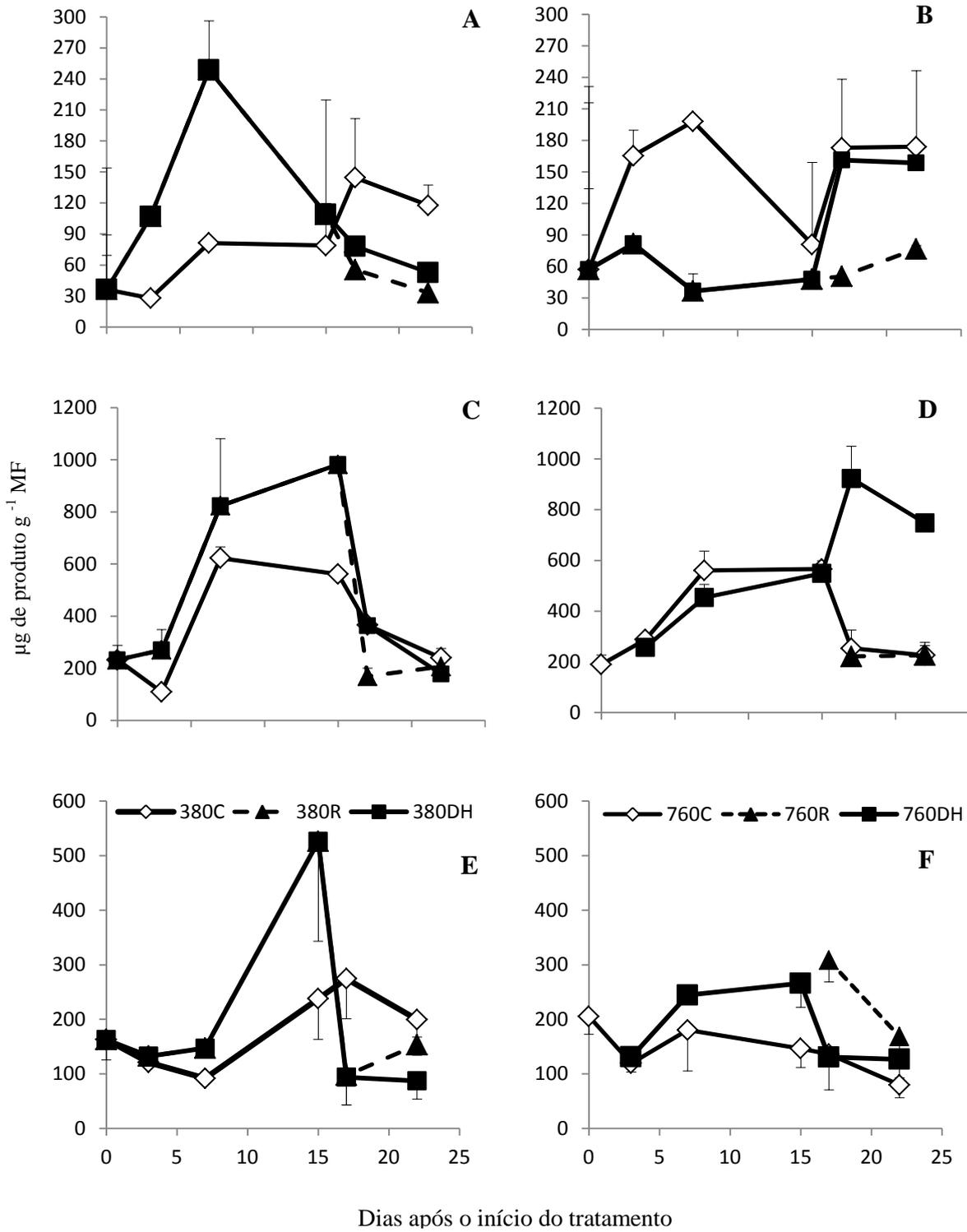


Figura 32 – Atividade da SST (A - B), FFT (C - D) e FEH (E - F) em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (\diamond), à suspensão de rega (\blacksquare) e à re-irrigação (\blacktriangle), mantidas em condições ambiente (~ 380 ppm – A – C – E) e elevada (~ 760 ppm – B – D – F) de CO₂ no inverno. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

O conteúdo de fruto-polissacarídeos nos rizóforos das plantas controle sob 380 ppm de CO₂, em ambos os experimentos, apresentou poucas variações (figuras 33A, 34A), como aos 10 dias, no experimento realizado na primavera, quando se verificou um aumento considerável destes compostos. Nas plantas sob suspensão de regas, observou-se um aumento desses compostos no 7º dia, mais pronunciado no experimento realizado no inverno.

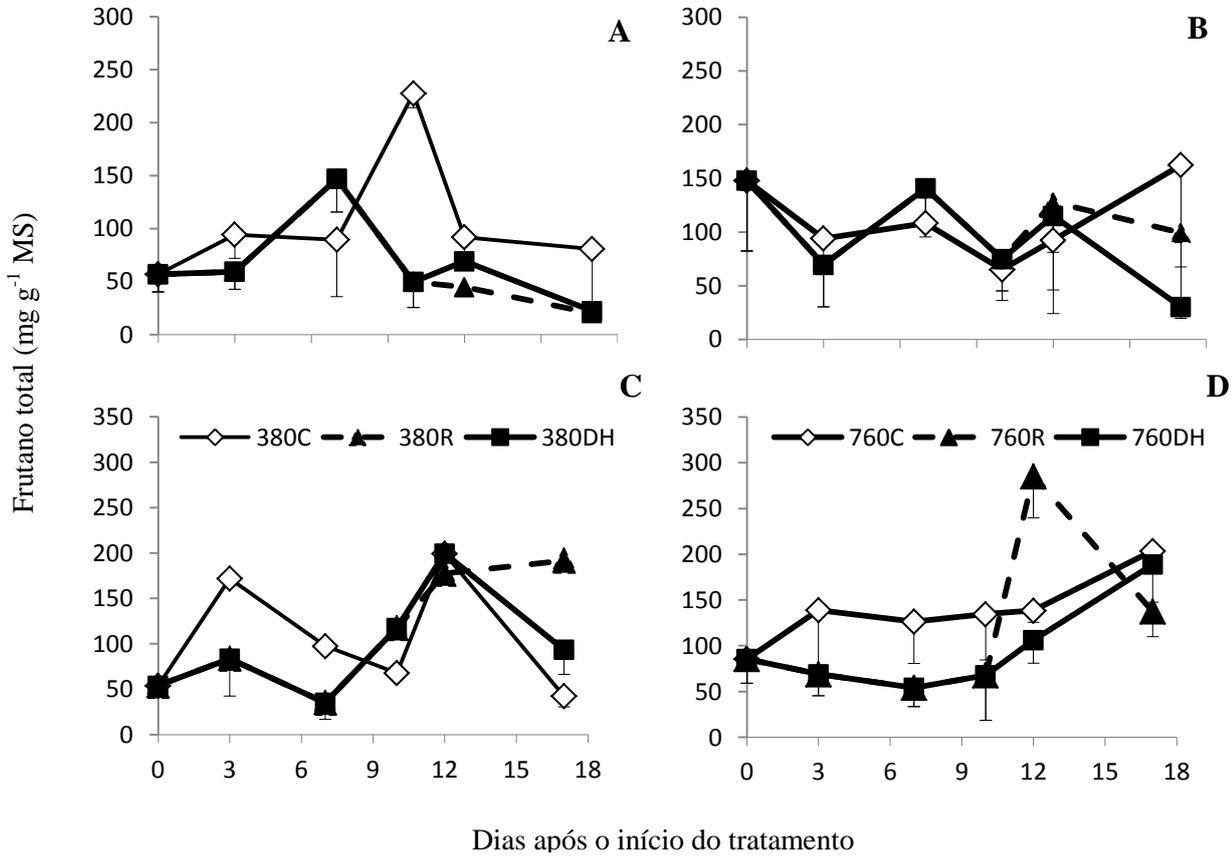


Figura 33 – Fruto-polissacarídeos (A - B) e fruto-oligossacarídeos (C - D) em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂ na primavera. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

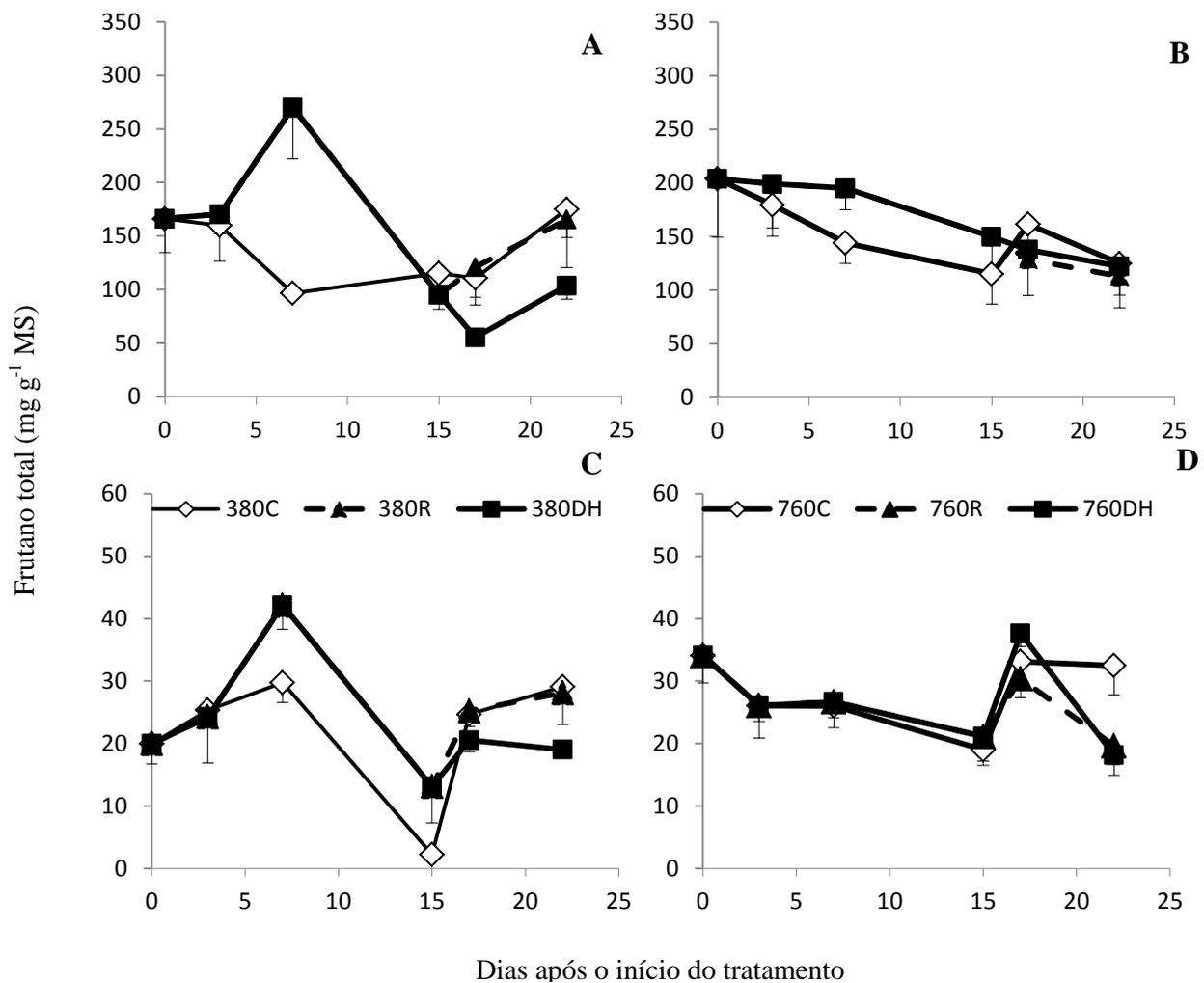


Figura 34 – Fruto-polissacarídeos (A - B) e fruto-oligosacarídeos (C - D) em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲) e mantidas em condições ambiente (~380 ppm – A, C) e elevada (~760 ppm – B, D) de CO₂ no inverno. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Sob alto CO₂, as plantas sob déficit hídrico apresentaram, em geral, maiores conteúdos de fruto-polissacarídeos do que as plantas controle, em ambos os experimentos. Na primavera foram observadas variações um pouco mais intensas nas plantas sob suspensão de regas do que no controle, enquanto que no inverno houve uma diminuição no conteúdo desses compostos nas plantas sob suspensão de regas de forma mais pronunciada nas plantas controle. Nas plantas re-irrigadas, este conteúdo apresentou uma discreta diminuição em ambas as condições atmosféricas, em ambos os experimentos, ao final do período experimental, exceto nas plantas sob 380 ppm do experimento realizado no inverno, que apresentou um aumento a partir do 17º dia.

Nas plantas sob rega diária, o conteúdo de fruto-oligosacarídeos variou em ambas as concentrações de CO₂, de ambos os experimentos (figuras 33C, D, 34C, D). Na primavera, o

conteúdo de oligossacarídeos nas plantas sob suspensão de regas apresentou aumento a partir do 7º dia e ao longo do período experimental, independente do tratamento de CO₂ imposto. Nas plantas sob 760 ppm, este aumento foi mais lento e constante do que o observado nas plantas sob 380 ppm.

No inverno, nas plantas sob suspensão de regas e 380 ppm, o conteúdo de oligossacarídeos foi superior ao das plantas controle entre o 7º e 15º dias. Entre plantas sob 760 ppm de CO₂ não foram verificadas diferenças entre os conteúdos de oligossacarídeos indiferente do tratamento hídrico aplicado, até o 17º dia, quando as plantas sob suspensão de regas e re-irrigadas apresentaram decréscimo desses compostos.

Plantas re-irrigadas e sob ambas as concentrações de CO₂ apresentaram aumento no conteúdo de oligossacarídeos logo aos 12 dias, na primavera, e aos 17 dias no inverno. Entretanto, sob 760 ppm de CO₂, em ambos os experimentos, o conteúdo de oligossacarídeos diminuiu aos 12 dias na primavera e aos 17 dias no inverno.

Na primavera, a razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos nas duas concentrações de CO₂ apresentaram valores semelhantes até ocorrer aumento nas plantas sob suspensão de regas após 7 dias sob 380 ppm e 12 dias em 760 ppm (figura 35). A re-irrigação promoveu um aumento pronunciado nessa razão nas plantas sob 380.

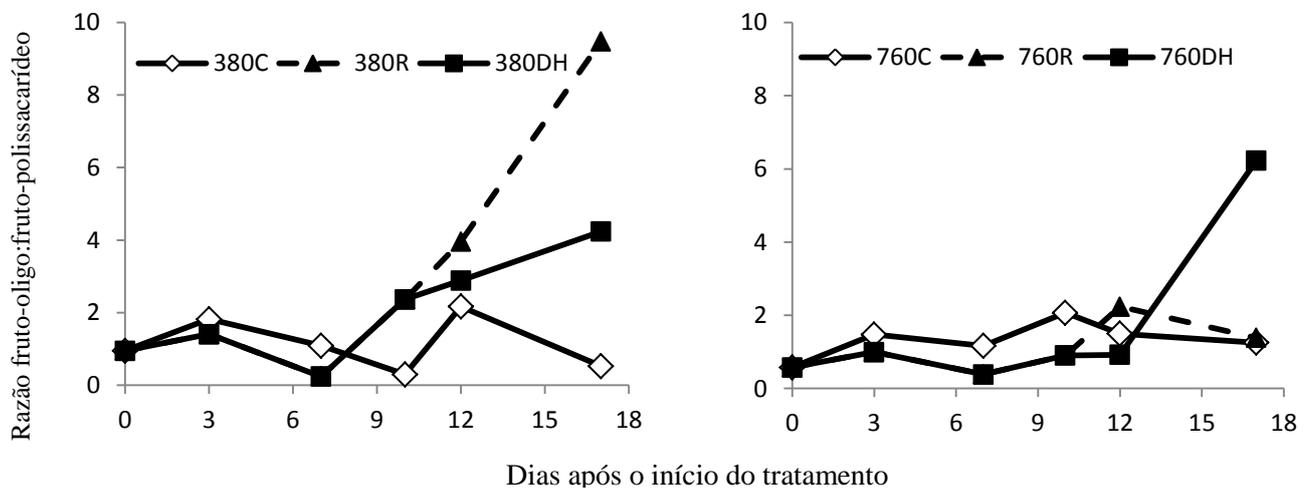


Figura 35 – Razão entre fruto-oligosacarídeos e fruto-polissacarídeos extraídos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂ na primavera. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

No experimento realizado no inverno, a razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos nas plantas controle sob 380 variou ao longo do período experimental, enquanto que nas plantas sob 760 ppm os valores foram constantes. Sob suspensão de regas, esta razão apresentou um pico aos 17 dias em ambas as concentrações de CO₂, sendo maior nas plantas sob 380 ppm (figura 36). Após a re-irrigação, verificou-se uma tendência de aumento, acompanhando as plantas sob suspensão de regas, seguida de uma diminuição nesta razão após o 17º dia.

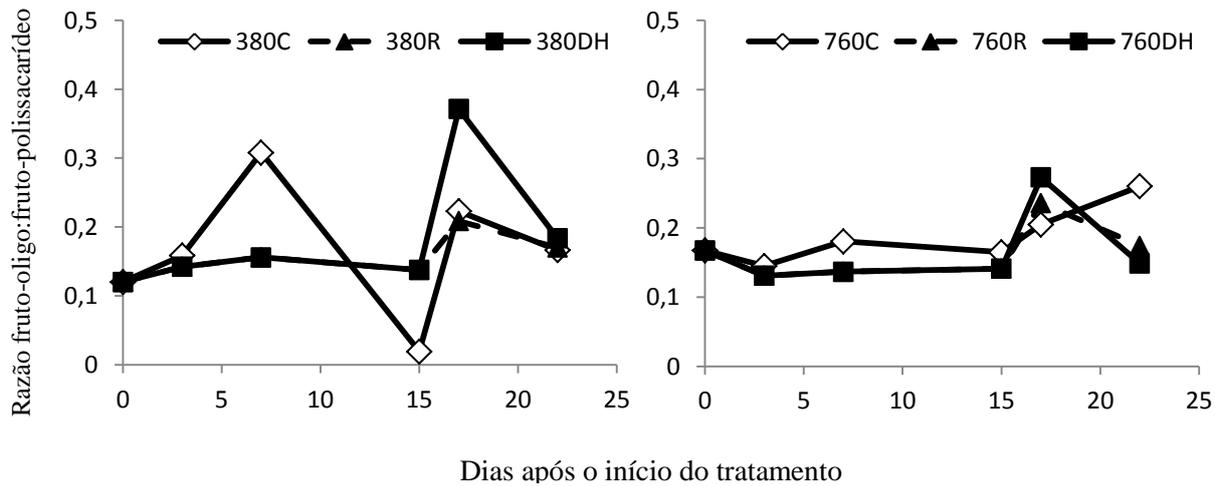


Figura 36 – Razão entre fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos extraídos de rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲) e mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂ no inverno. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

O conteúdo de açúcar redutor nos rizóforos das plantas sob suspensão de regas na primavera foi mais elevado do que nas plantas controle a partir do 3ª dia, nas duas concentrações de CO₂ (figura 37).

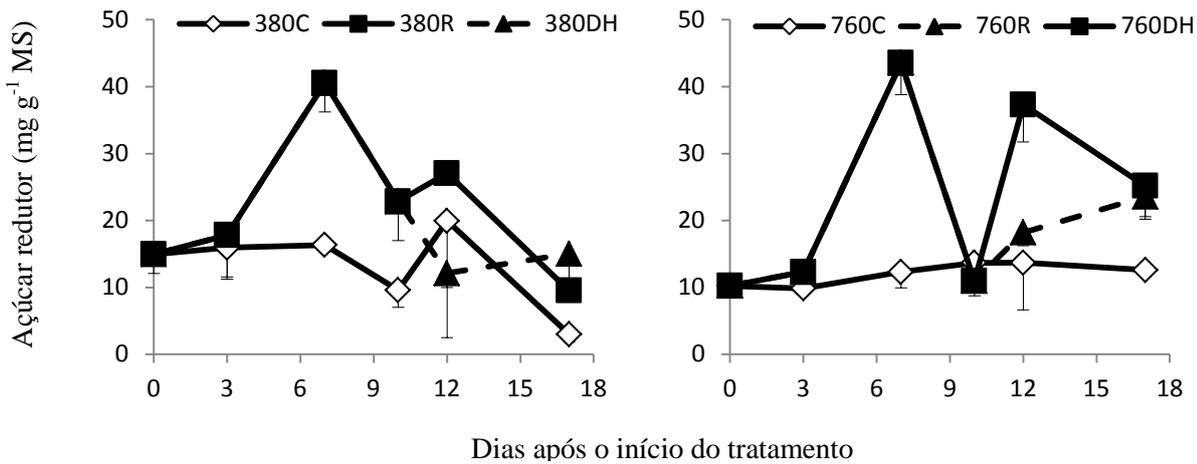


Figura 37 – Conteúdo de açúcar redutor em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲), mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂ na primavera. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

No inverno, o açúcar redutor aumentou a partir do 15º dia nas plantas sob suspensão de regas e 380 ppm, enquanto que sob 760 ppm, aumentos no conteúdo de açúcar redutor ocorreram aos 7 e 22 dias (figura 38).

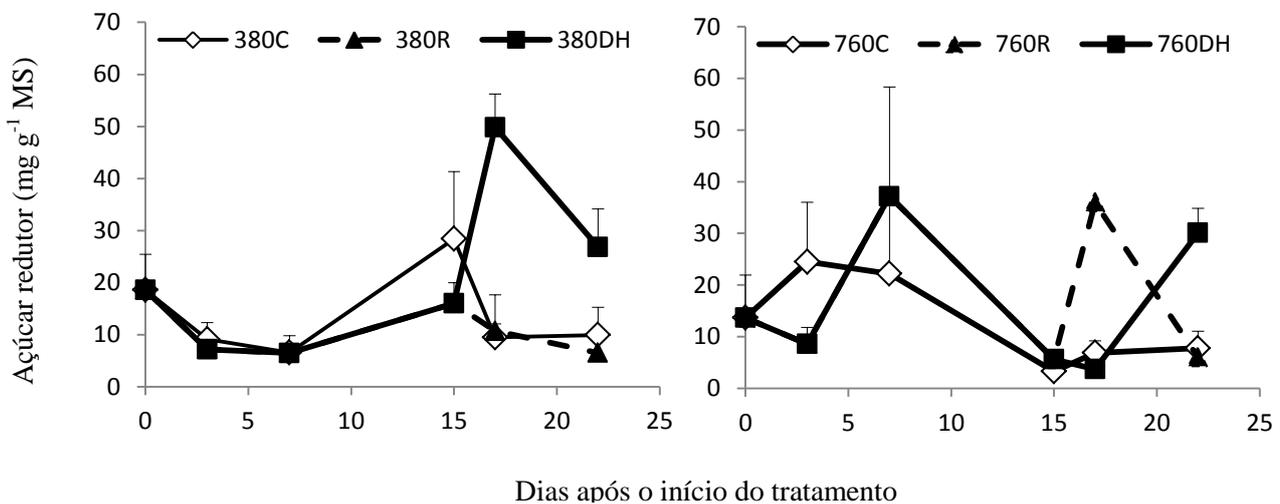


Figura 38 – Conteúdo de açúcar redutor rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária (◇), à suspensão de rega (■) e à re-irrigação (▲) e mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂ no inverno. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

4.3 Efeito conjunto de diferentes regimes de regas e da concentração elevada de CO₂ no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea*

Os diferentes regimes de restrição hídrica impostos às plantas foram suficientes para resultarem na diminuição da umidade do solo, de maneira mais acentuada nas plantas de 25% nas duas condições atmosféricas de CO₂ (Figura 39). Os menores teores de umidade foram verificados nos solos das plantas sob 50% e 25% e 760 ppm, logo a partir do 9º dia. Em geral, após a re-irrigação, ocorrida no 27º dia, os solos recuperaram o teor de umidade a valores próximos do controle.

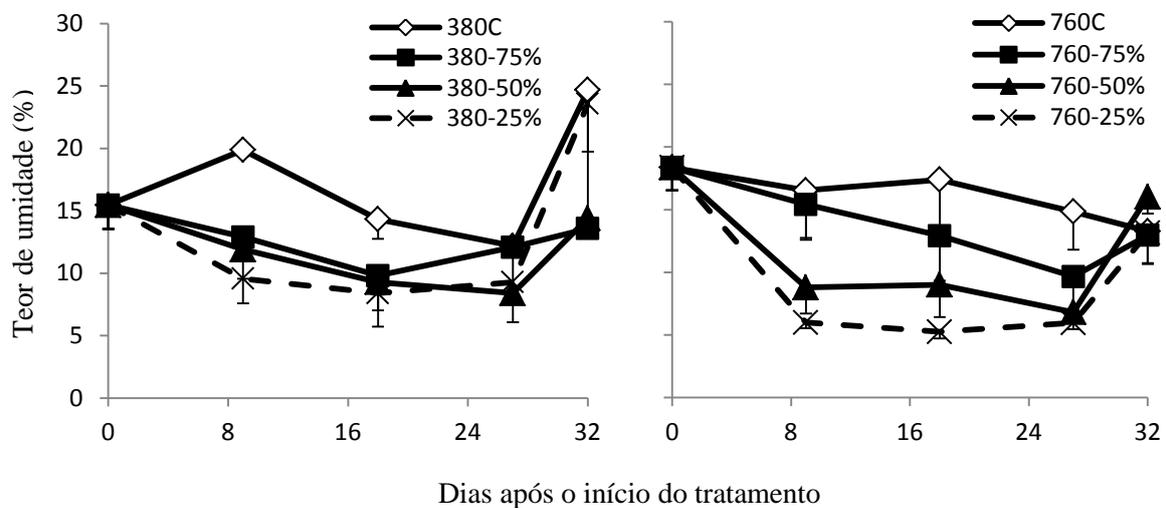


Figura 39 – Teor de umidade (%) do solo dos vasos de *Vernonia herbacea* submetidos a diferentes níveis de disponibilidade hídrica e mantidos em condições ambiente (~380ppm) e elevada (~760ppm) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

Assim como observado com o teor de umidade do solo, os diferentes regimes de restrição hídrica foram suficientes para causar uma diminuição gradual do potencial hídrico das folhas mantidas tanto nos 380 ppm (figura 40A) quanto nos 760 ppm de CO₂ (figura 40B), a partir do 9º dia e de maneira mais acentuada nas plantas sob 25%, em ambas as concentrações de CO₂. Após 18 dias sob 25%, as plantas mantidas nas duas concentrações de CO₂ apresentaram senescência da parte aérea, não sendo mais possível mensurar o potencial hídrico após essa coleta. Quanto ao potencial hídrico dos rizóforos, a restrição hídrica foi suficiente para resultar em variações desses valores tanto nas plantas sob 380 ppm (figura 40C) quanto naquelas sob 760 ppm (figura 40D), embora tenha ocorrido uma diminuição de

forma acentuada nas plantas 25% sob 380 ppm cujo valor obtido, aos 27 dias foi de aproximadamente -2,1 MPa.

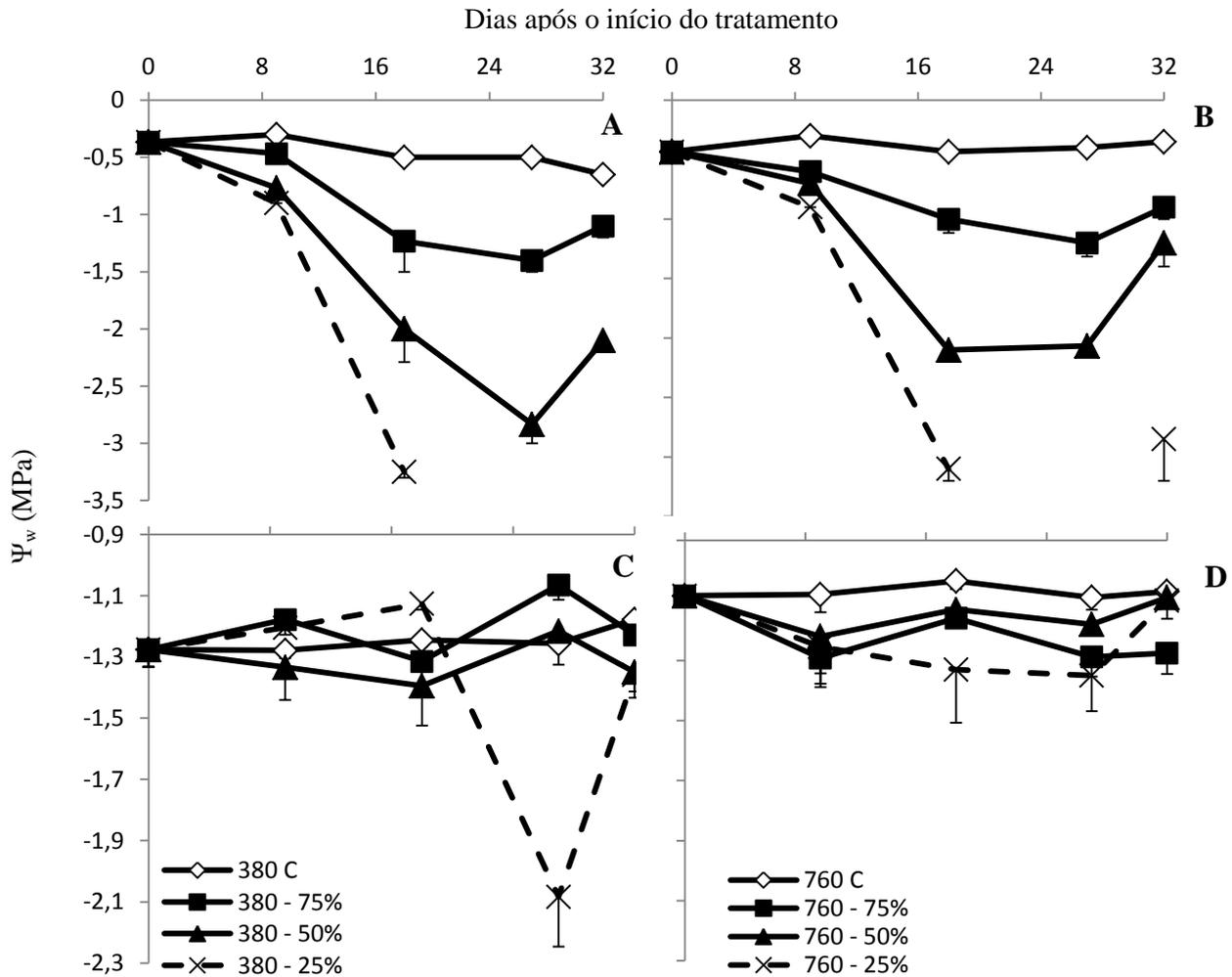


Figura 40 – Potencial hídrico das folhas (A-B) e dos rizóforos (C-D) de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes níveis de disponibilidade hídrica e mantidas em condições ambiente (~380 ppm A-C) e elevada (~760 ppm B-D) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

A re-irrigação possibilitou a recuperação parcial, no final do período experimental, do Ψ_{wpa} . Nos rizóforos, a recuperação do Ψ_{wsolo} ocorreu nas plantas 25% em ambas as concentrações de CO₂.

A assimilação fotossintética nas plantas sob 380 ppm de CO₂ foi em média 50% inferior naquelas sob restrição hídrica do que nas plantas controle (figura 41A). A transpiração e a condutância estomática, por sua vez, foram maiores nas plantas sob 75% e 50% do que nas plantas controle, mesmo após a re-irrigação (figuras 41B, C). Nesses três

parâmetros, as plantas sob 25% apresentaram valores inferiores às demais. A EUA foi mais elevada nas plantas controle, exceto aos 9 dias, quando as plantas sob 25% apresentaram valores superiores, seguido de queda até o final do experimento (Figura 41D). Após a re-irrigação, as plantas sob restrição hídrica apresentaram aumento em todos os parâmetros, exceto as plantas sob 25%, que apresentaram discreto aumento apenas na assimilação fotossintética e na EUA.

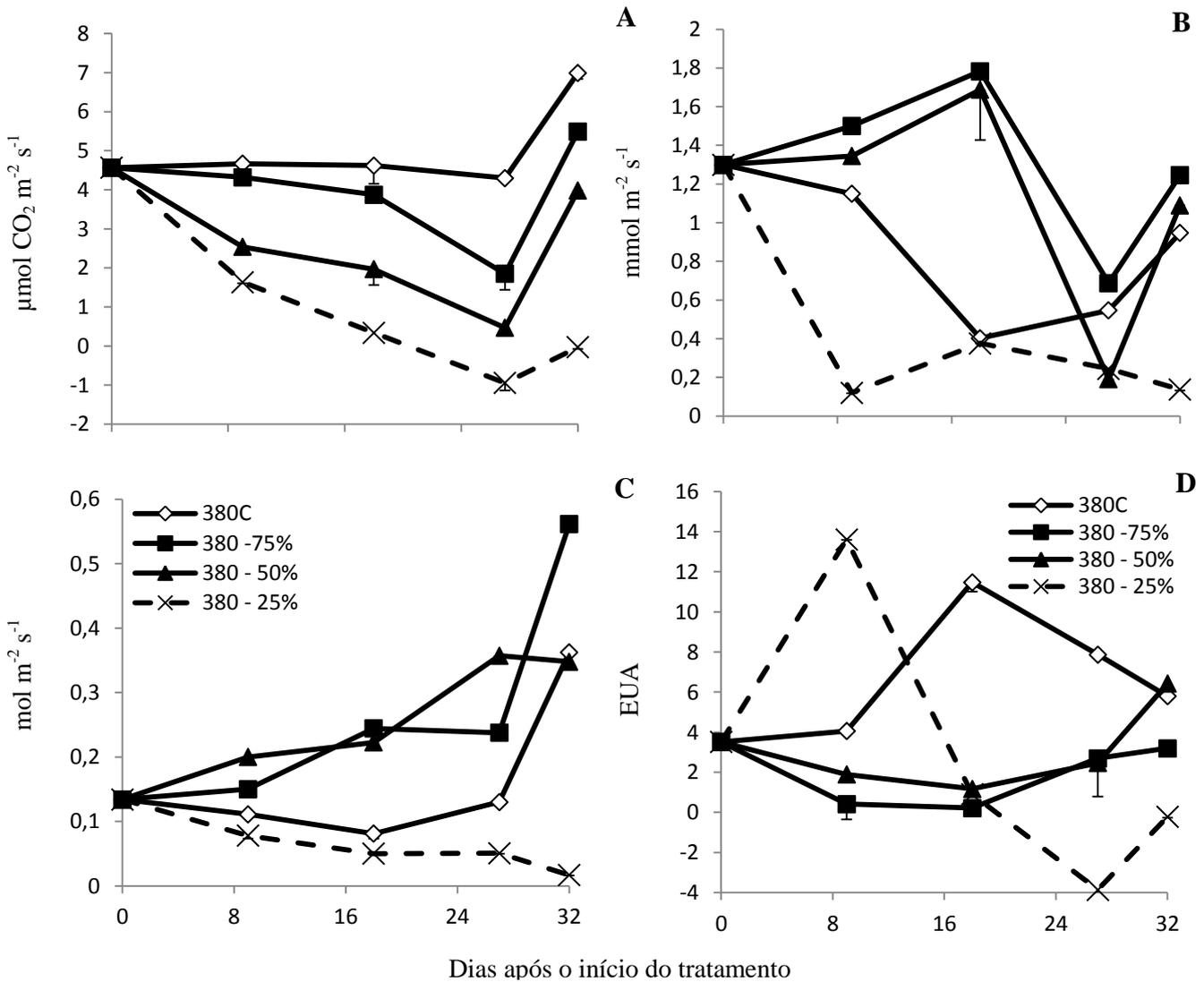


Figura 41 – Assimilação fotossintética (A), transpiração (B), condutância estomática (C) e eficiência do uso da água instantânea (D) a $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de folhas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes níveis de disponibilidade hídrica e mantidas em condições ambiente ($\sim 380 \text{ ppm}$) de CO_2 . As barras indicam o erro padrão da média ($n=3$).

De maneira semelhante ao observado nas plantas mantidas sob 380 ppm, plantas sob 760 ppm de CO₂ e restrição hídrica também apresentaram diminuição de cerca de 50% da assimilação fotossintética a partir do 9º dia, com as plantas sob 25% apresentando os valores mais baixos (figura 42A). A transpiração e a condutância estomática, por sua vez, foram maiores nas plantas sob 75% e 50% do que nas plantas controle (figuras 42B, C), principalmente a transpiração, aos 9 dias. Plantas sob 760 ppm e restrição hídrica apresentaram valores inferiores da EUA quando comparadas às plantas controle, exceto no 18º dia, quando as plantas sob 50% e 25% apresentaram aumento da EUA (Figura 42D).

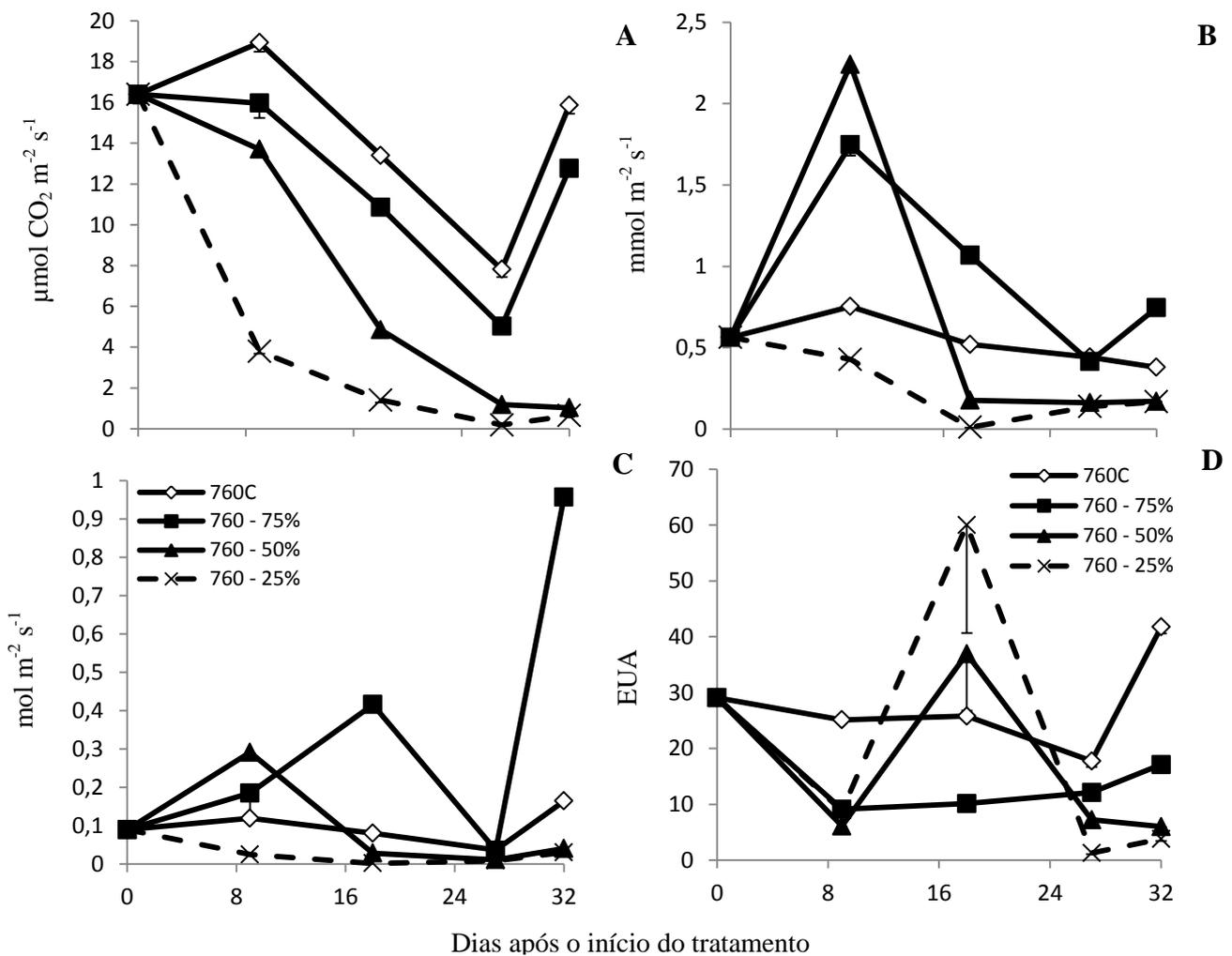


Figura 42 – Assimilação fotossintética (A), transpiração (B), condutância estomática (C) e eficiência do uso da água instantânea (D) a 450 µmol m⁻²s⁻¹ de folhas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes níveis de disponibilidade hídrica e mantidas em condições elevadas (~760 ppm) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

A biomassa seca e o teor de umidade da parte aérea em ambas as concentrações de CO₂ estão apresentados na figura 5. A restrição hídrica aplicada foi suficiente para promover mudanças na biomassa, quando comparadas às plantas controle em ambas as condições atmosféricas. Após a re-irrigação foi observado aumento de biomassa em todas as condições hídricas. Sob 760 ppm, aumentos na biomassa foram observados nos 3 tratamentos de restrição hídrica aos 9 dias de tratamento (figura 43B), seguidos de queda até o 27º dia. As plantas controle, por sua vez, apresentaram aumento de biomassa seca sob essa condição atmosférica durante o período experimental.

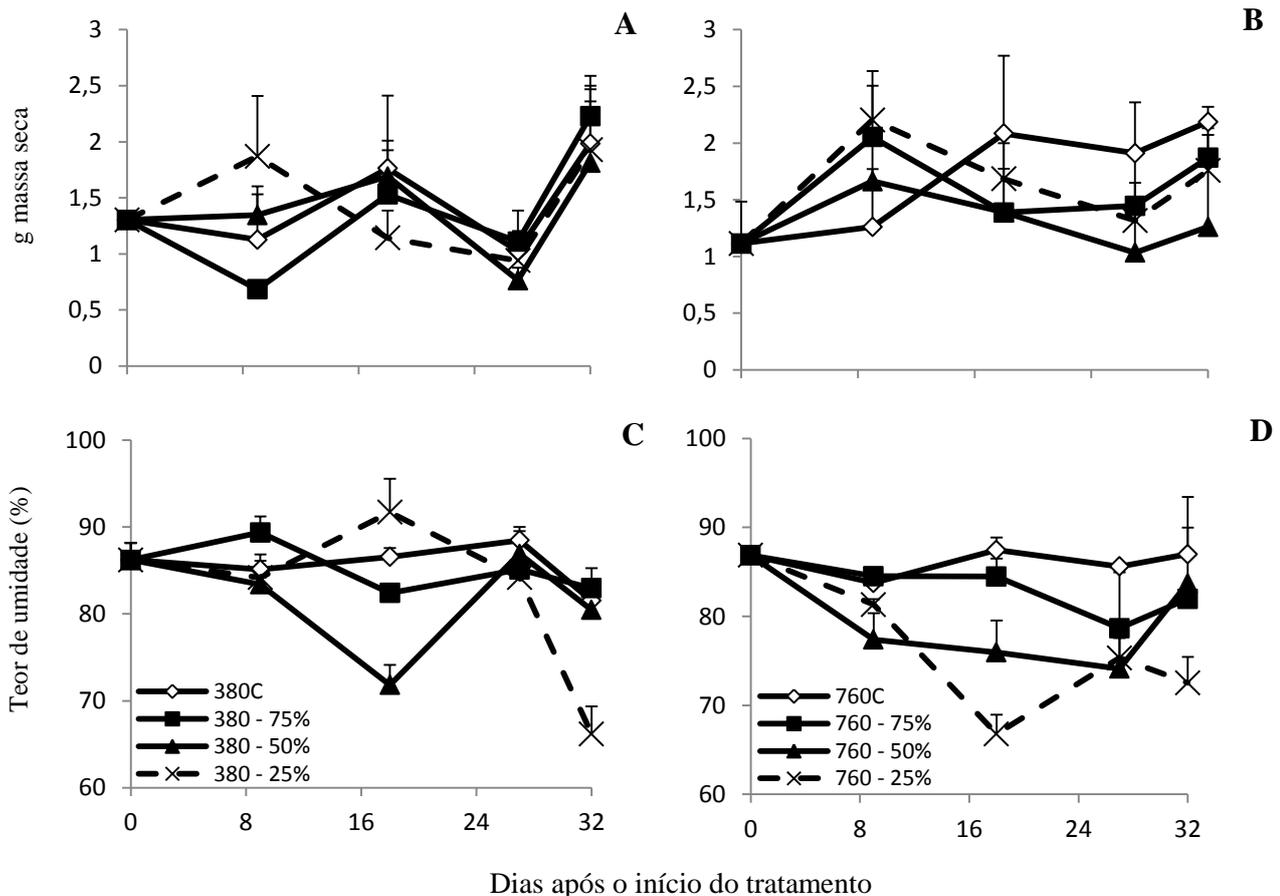


Figura 43 – Biomassa seca (A - B) e teor de umidade (%) (C - D) da parte aérea de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes níveis de disponibilidade hídrica e mantidas em condições ambientes (~380 ppm) e elevadas (~760 ppm) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

A re-irrigação promoveu um discreto aumento de biomassa nas plantas que estavam sujeitas à restrição hídrica. Mesmo sob restrição hídrica, não houve grandes variações no teor de umidade da parte aérea nas plantas sob os diferentes tratamentos, exceto nas plantas 25% sob 380 ppm, aos 32 dias.

Na figura 44 estão apresentados a biomassa seca e o teor de umidade dos rizóforos de plantas *V. herbacea* submetidas à restrição hídrica sob 380 e 760 ppm de CO₂. Nas duas condições atmosféricas de CO₂, foram observadas alterações na biomassa ao longo do período experimental (figura 44A, B). Entretanto, sob 760 ppm em todas as plantas essas alterações ocorreram acima dos valores obtidos no início do experimento.

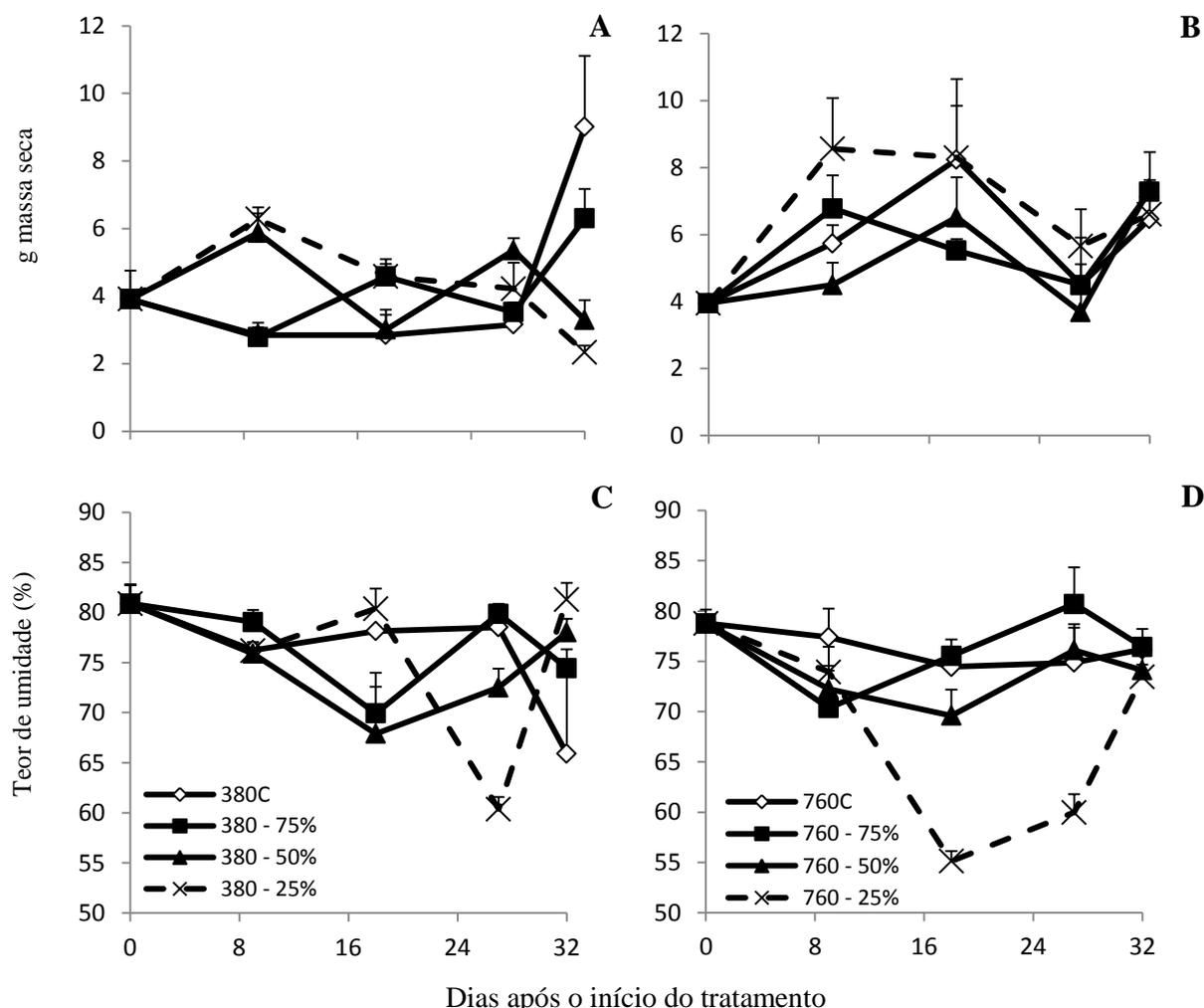


Figura 44 – Biomassa seca (A - B) e teor de umidade (%) (C - D) dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes níveis de disponibilidade hídrica e mantidas em condições ambientes (~380 ppm) e elevadas (~760 ppm) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

A restrição hídrica promoveu alterações no teor de umidade dos rizóforos nas duas concentrações de CO₂ (figura 44C, D) de forma mais acentuada nas plantas 25%. Após a irrigação foi verificada a recuperação do teor de umidade das plantas sob restrição hídrica, em ambas as [CO₂] a valores próximos ou mais elevados que as plantas controle.

Com relação às enzimas do metabolismo de frutanos, verifica-se que a restrição hídrica ocasionou, em geral, diminuição da atividade da SST, nas duas condições

atmosféricas de CO₂ até os 27 dias (figuras 45A, B), exceto nas plantas 75% sob 760 ppm que apresentaram aumento desta atividade aos 9 dias semelhantemente ao controle.

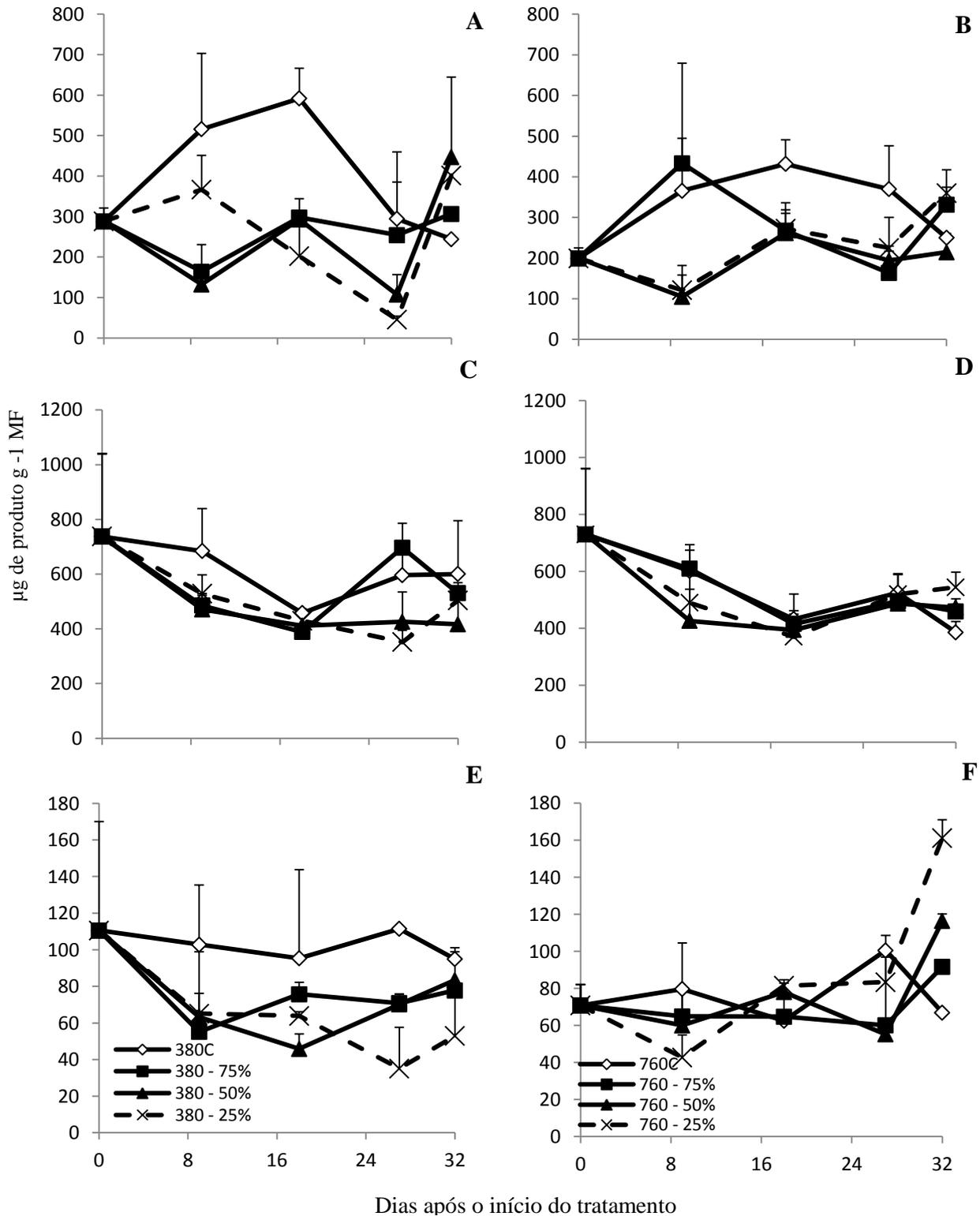


Figura 45 – Atividade da SST (A - B), FFT (C - D) e FEH (E - F) em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes níveis de disponibilidade hídrica e mantidas em condições ambiente (~380 ppm – A, C, E) e elevada (~760 ppm – B, D, F) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

A re-irrigação possibilitou a recuperação da atividade da SST tanto nas plantas sob 380 ppm quanto sob 760 ppm, chegando a ultrapassar a atividade detectada nas plantas controle aos 32 dias.

A restrição hídrica também resultou na diminuição da atividade da FFT nas plantas sob 380 ppm, aos 9 dias (figura 45C). Nas plantas sob 760 ppm, por sua vez, as alterações foram verificadas no início do experimento, com diminuição da atividade nas plantas sob 50% e 25%, aos 9 dias (figura 45D). Entretanto, nas plantas sob alto CO₂ não foram verificadas diferenças entre as atividades de FFT, em todos regimes hídricos, aos 18 e 27 dias. A re-irrigação, aos 27 dias, promoveu aumento da atividade de FFT nas plantas 25% sob 380 ppm de CO₂.

Sob 380 ppm de CO₂, a atividade da FEH diminuiu nas plantas sob restrição hídrica em relação às plantas controle, as quais não apresentaram variações na atividade ao longo do período experimental (Figura 45E). Dentre as plantas sob restrição, aquelas sob 25% foram as que apresentaram atividades inferiores entre os 18 e 27 dias. Sob 760 ppm, a restrição hídrica ocasionou uma discreta diminuição na atividade da FEH aos 9 dias nas plantas 25% (figura 45F), comparada à atividade observada nas plantas controle. A partir desse ponto, a atividade da hidrolase aumentou discretamente nessas plantas até o 27º dia. A re-irrigação causou aumento na atividade da FEH mais acentuada quanto maior a restrição hídrica. Sob 380 ppm, apenas as plantas 25% apresentaram um discreto aumento da atividade da FEH.

Em geral, verificou-se uma tendência à diminuição do conteúdo de fruto-polissacarídeos até o 27º dia (figura 46A, B). O conteúdo de fruto-oligossacarídeos não apresentou alterações ao longo do período experimental, exceto o aumento verificado aos 9 dias nas plantas 50% sob 380 ppm. Em geral, as variações nos conteúdos de fruto-poli e fruto-oligossacarídeos foram pequenas ao longo do período experimental, destacando-se os valores encontrados nas plantas 25% aos 27 dias.

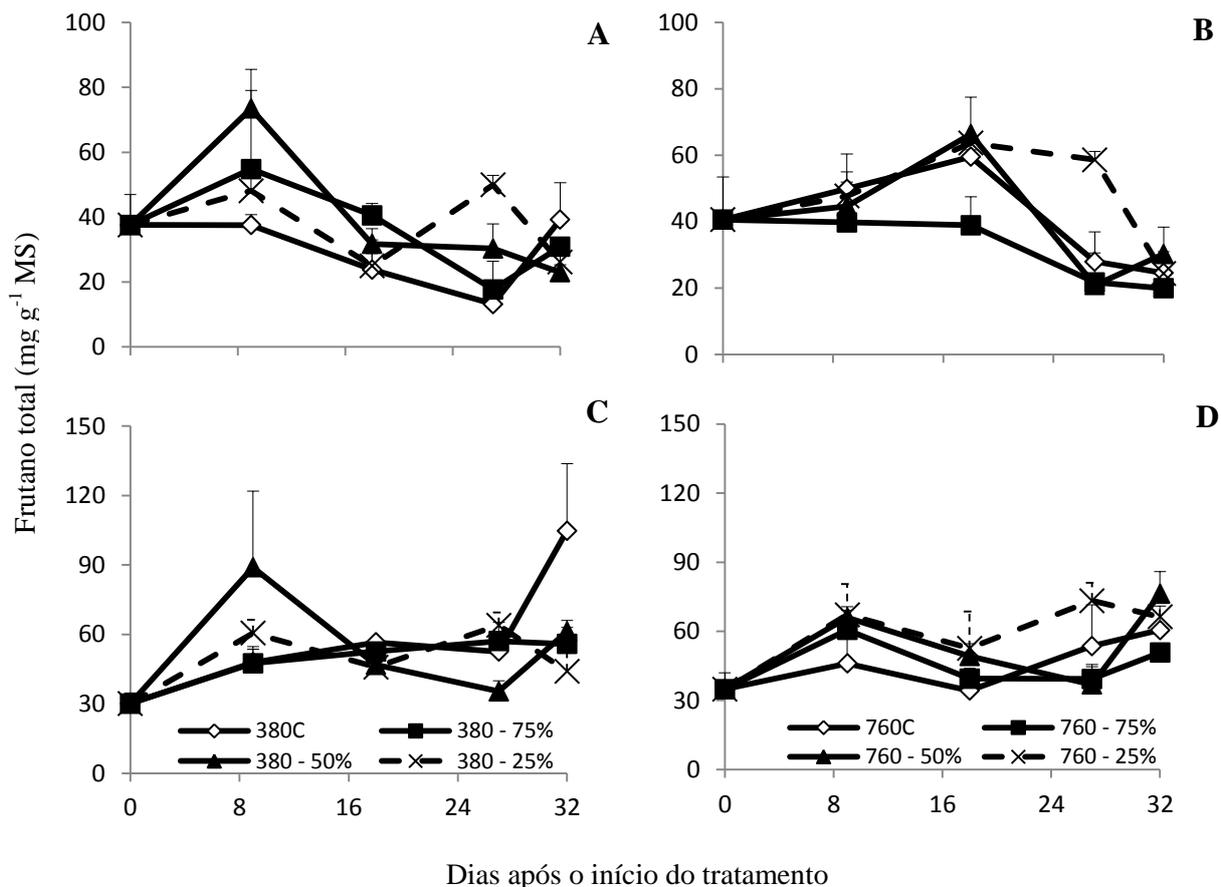


Figura 46 – Fruto-polissacarídeos (A - B) e fruto-oligossacarídeos (C - D) em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes níveis de disponibilidade hídrica e mantidas em condições ambiente (~380 ppm – A, C) e elevada (~760 ppm – B, D) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

As diferentes condições hídricas não foram suficientes para promover alterações na razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeos nas duas concentrações de CO₂, exceto pelo aumento de cerca de três vezes, aos 27 dias, nas plantas controle e 75% sob 380 ppm (figura 47).

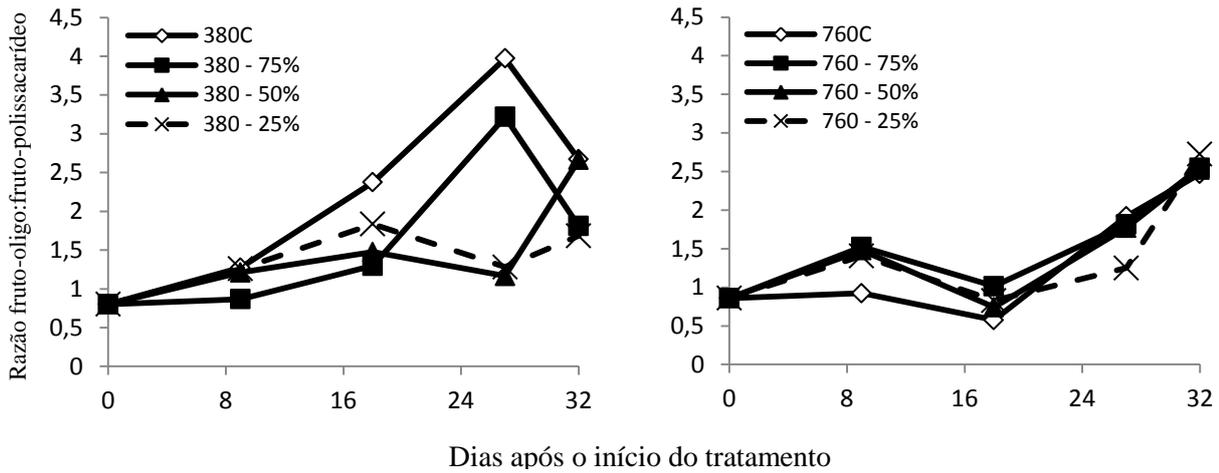


Figura 47 – Razão entre fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos em rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes níveis de disponibilidade hídrica e mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

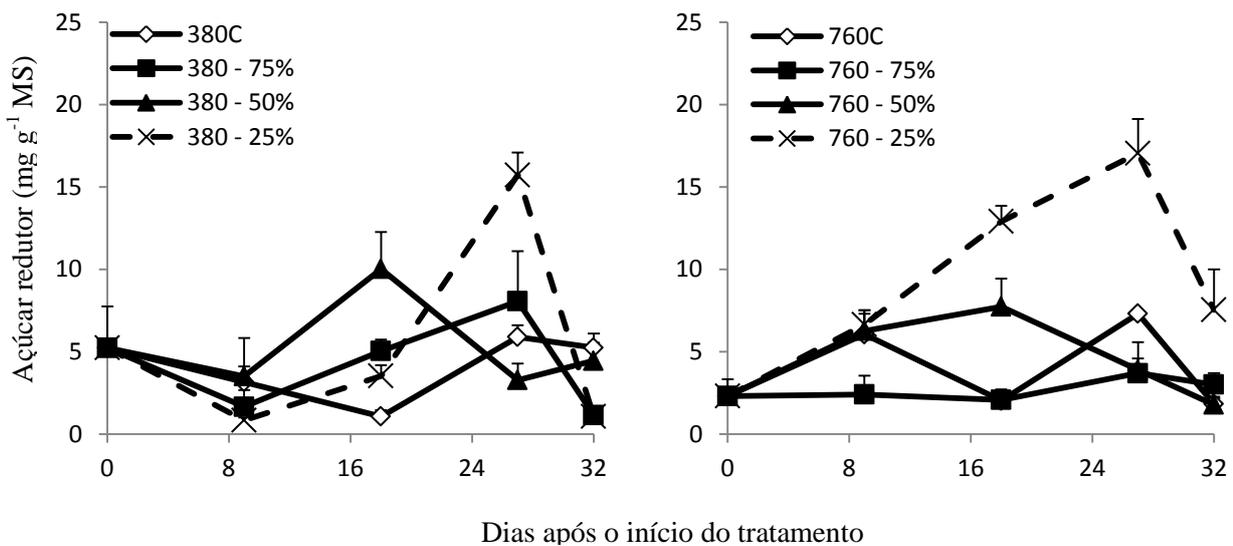


Figura 48 – Conteúdo de açúcar redutor rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à diferentes níveis de disponibilidade hídrica e mantidas em condições ambiente (~380 ppm) e elevada (~760 ppm) de CO₂. As barras indicam o erro padrão da média (n=3).

O conteúdo de açúcar redutor aumentou nas plantas sob 380 ppm e restrição hídrica a partir do 9º dia, especialmente nas plantas 75% e 25%, até o 27º dia, com valores maiores do que os verificados nas plantas controle (figura 48). Sob alto CO₂ houve um aumento acentuado nas plantas 25% até o 27º dia. Em ambas as condições atmosféricas de CO₂, a re-irrigação promoveu uma diminuição do conteúdo de açúcar redutor em todas as condições de restrição hídrica.

5. Discussão

5.1 Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração elevada de CO₂ no metabolismo de frutanos em *Viguiera discolor*

De modo geral, o déficit hídrico imposto às plantas neste trabalho foi suficiente para gerar alterações no conteúdo e na energia livre da água no solo e nas plantas, que por sua vez afetaram os processos fisiológicos e bioquímicos como a fotossíntese e o metabolismo de frutanos de *Viguiera discolor*.

Como postulado por Samarakoon & Gifford (1995), o conteúdo de água no solo pode aumentar, diminuir ou não ser afetado, dependendo do fechamento estomático, em resposta ao alto CO₂. Em *V. discolor* observou-se que plantas sob suspensão de regas mantiveram as taxas de transpiração e condutância estomática mais elevadas sob alto CO₂ e que estes parâmetros estão significativamente correlacionados com a diminuição do $\Psi_{\text{w solo}}$ ($r=0,80$; $p=0,05$ e $r=0,90$; $p=0,01$, respectivamente), que decresceu rapidamente ao longo do período experimental.

Embora tenha havido uma diminuição mais acentuada do potencial e do teor de água do solo sob alto CO₂ e suspensão de regas, as plantas apresentaram, de maneira geral, o status hídrico semelhante às plantas mantidas sob 380ppm e déficit hídrico. Segundo Spollen & Nelson (1994), os carboidratos mais eficientes na diminuição do potencial osmótico são as hexoses e a sacarose. Como os frutanos podem ser rapidamente mobilizados a frutose e sacarose, estes compostos podem atuar na manutenção do status hídrico de plantas mantidas sob deficiência hídrica e, portanto, na sua tolerância à seca.

Pilon-Smits *et al.* (1995), introduzindo um gene para a síntese de frutanos em plantas de tabaco, não produtora desses carboidratos de reserva, obtiveram plantas resistentes ao estresse hídrico. Resultados semelhantes foram obtidos com beterrabas transgênicas (Pilon-Smits *et al.* 1999). Plantas de trigo (Virgona & Barlow 1991, Wardlaw & Willenbrink 2000, Yang *et al.* 2004), de chicória (Van den Ende *et al.* 1998) e gramíneas do gênero *Festuca* (Spollen & Nelson 1994, Clark *et al.* 2004) submetidas ao déficit hídrico apresentaram aumento no conteúdo de açúcares de baixo peso molecular, principalmente a frutose.

Segundo Valluru & Van den Ende (2008), o acúmulo de frutanos de baixo grau de polimerização em condições de estresse ocorre tanto pela atividade de síntese destes compostos quanto pela degradação parcial das moléculas de maior peso molecular acumuladas anteriormente.

Os resultados obtidos neste trabalho com *V. discolor* sugerem que para manterem o status hídrico, nas duas concentrações de CO₂, estratégias distintas parecem ter sido utilizadas

para retenção de água nos tecidos sob suspensão de regas, especialmente nas raízes tuberosas, órgãos responsáveis pelo acúmulo de carboidratos nestas plantas.

Nas plantas sob 380 ppm e suspensão de regas foi observado um aumento da atividade da FEH, enzima responsável pela despolimerização da cadeia de frutanos, liberando, sacarose e frutose (Edelman & Jefford, 1964), ao longo do período experimental.

O aumento da FEH verificado em plantas submetidas ao déficit hídrico sugere que nesta condição esta enzima também desempenha uma função de sobrevivência para a planta sob condições de seca, conforme foi sugerido por De Roover *et al.* (1999) para chicória e por Garcia *et al.* (2011) para *V. herbacea*, bem como, por Asega & Carvalho (2004) para plantas de *V. herbacea* submetidas à desfolhação, quando a FEH é ativada por um aumento de demanda de energia.

Também foi verificado aumento da atividade da FFT, enzima responsável pelo padrão de distribuição do comprimento das cadeias de inulina (Hellwege *et al.* 1998), acompanhando a diminuição do Ψ_{wsub} ($r=-0,93$; $p=0,005$), nos primeiros 11 dias de experimentos. Nas plantas de *V. discolor*, a FFT é sugerida como uma enzima multifuncional, que poderia também catalisar a hidrólise de frutanos juntamente com a FEH em situações desfavoráveis à planta (Degasperi *et al.* 2003).

O aumento das atividades de FFT e FEH em plantas sob suspensão de regas e 380 ppm favorece o aumento de compostos osmoticamente ativos. De fato, observou-se aumento de frutanos de baixo peso molecular, os oligossacarídeos, e de açúcares redutores nestes tecidos, permitindo a manutenção do teor de água, como mencionado anteriormente.

Nas plantas sob 760 ppm e suspensão de regas não foram observadas diferenças quantitativas entre as frações fruto-oligo e fruto-polissacarídeos, embora a atividade da enzima FEH tenha sido mais elevada nas plantas sob essas condições em todo o experimento. Rigui *et al.* (dados não publicados) verificaram aumento no conteúdo de fruto-oligossacarídeos em plantas de *V. discolor* mantidas sob elevada concentração de CO₂. Esse carbono em excesso pode ter sido rapidamente metabolizado em sacarose, utilizada na manutenção do potencial osmótico, uma vez que essas plantas ainda mantinham taxas elevadas de transpiração, quando comparadas às plantas sob 380 ppm.

De modo geral, os resultados obtidos demonstram ao longo do *continuum* solo-planta uma relação de dependência entre os parâmetros avaliados e a disponibilidade hídrica (tabela 1 – anexos). De fato, uma série de correlações significativas foram observadas entre o Ψ_{wsolo} , U_{solo} , Ψ_{wpa} e Ψ_{wsub} e os parâmetros fisiológicos e bioquímicos, tanto na condição ambiental normal ($\Psi_{wsolo} \times U_{Pa} = 0,977$; $p=0,0007$, $\Psi_{wsolo} \times FEH = -0,85$; $p=0,03$, $\Psi_{wsolo} \times A = 0,96$; $p=0,002$), quanto sob alto CO₂ ($\Psi_{wsolo} \times U_{pa} = 0,96$; $p=0,001$, $\Psi_{wsolo} \times A = 0,97$; $p=0,0009$).

Os maiores coeficientes, bem como o maior número de coeficientes significativos, foram encontrados para as respostas de plantas sob suspensão de regas nas duas condições de CO₂, evidenciando a influência da disponibilidade hídrica nas respostas fisiológicas e bioquímicas dessas plantas.

A re-irrigação, ocorrida no 11º dia, gerou respostas rápidas nos parâmetros fisiológicos e alterações no metabolismo de frutanos, nas duas concentrações de CO₂ estudadas. De fato, assim como ocorrido nas plantas sob suspensão de regas, também foram observadas correlações entre os parâmetros avaliados e o Ψ_{wsolo} , U_{solo} , Ψ_{wpa} e Ψ_{wsub} , tanto na condição ambiental normal ($\Psi_{\text{wsolo}} \times g_s = 0,88$; $p=0,01$, $\Psi_{\text{wsolo}} \times \text{FFT} = -0,87$; $p=0,02$, $\Psi_{\text{wsolo}} \times A = 0,88$; $p = 0,02$), quanto no elevado CO₂ ($U_{\text{solo}} \times T = 0,89$; $p=0,04$, $\Psi_{\text{wpa}} \times A = 0,76$; $p=0,24$, $\Psi_{\text{wsolo}} \times \text{FFT} = 0,84$; $p=0,03$), sendo que algumas correlações significativas existentes em plantas sob suspensão de regas deixaram de existir com a re-irrigação, como por exemplo $\Psi_{\text{wsolo}} \times A = 0,62$; $r=0,18$.

5.2 Efeito conjunto da suspensão de regas e da concentração atmosférica elevada de CO₂ no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* – estudo comparativo em duas estações: primavera e inverno

Da mesma forma que observado no estudo com *V. discolor*, a suspensão de regas foi suficiente para gerar alterações no conteúdo e na energia livre da água do solo e nas plantas, que por sua vez afetaram os processos fisiológicos e bioquímicos como a fotossíntese e o metabolismo de frutanos de plantas de *Vernonia herbacea*, de forma diferente entre as duas estações analisadas, primavera e inverno.

O conteúdo de água do solo é diretamente relacionado com o fechamento estomático, conforme demonstrado por Samarakoon & Gifford (1995). Nos vasos de *V. herbacea*, a concentração elevada de CO₂ amenizou ou atrasou a perda de água do solo durante a suspensão de regas, que ocorreu de maneira mais rápida nos vasos mantidos sob 380 ppm de CO₂ no experimento realizado no inverno, possivelmente devido à maior demanda atmosférica por água ($U_{\text{solo}} \times g_s = 0,93$; $p=0,005$), visto ser este o período de maior restrição de água. Embora no experimento realizado na primavera não foram obtidos dados de trocas gasosas, Oliveira *et al.* (2010) observaram que plantas de *V. herbacea* mantidas em alto CO₂ apresentaram diminuição da condutância estomática, resultado semelhante ao obtido nas plantas de inverno no presente trabalho, sugerindo ser essa uma resposta comum da espécie mantida sob esta condição atmosférica.

A manutenção do teor de umidade do solo também é resultado da menor taxa de transpiração verificada em plantas de *V. herbacea* sob alto CO₂ e déficit hídrico, como já

observado em outras espécies como soja (Rogers *et al.* 1994), milho (Samarakoon & Gifford 1995), arroz (Vu *et al.* 1998) e batata (Robredo *et al.* 2007). Essa manutenção da água no solo por um tempo mais longo, associada à maior disponibilidade de substrato para a fotossíntese, contribuiu para a manutenção das taxas fotossintéticas semelhantes às das plantas controle.

Por sua vez, a taxa de transpiração mais elevada nas plantas sob 380 ppm, tanto as irrigadas diariamente quanto às sob déficit hídrico, resultou em geral na rápida diminuição do conteúdo de água do solo e, conseqüentemente, na diminuição do teor de umidade da planta, tanto no experimento da primavera (Usolo x Upa = 0,67; p=0,13, Usolo x Urz = 0,68; p=0,13), quanto no de inverno (Usolo x Upa = 0,61; p=0,19, Usolo x Urz = 0,68; p=0,13). Essa diminuição no teor de umidade da planta já havia sido observada em estudo realizado com plantas de *V. herbacea* submetidas à suspensão de regas (Garcia *et al.* 2011).

Nos dois períodos estudados, tanto as plantas mantidas sob alto CO₂ quanto aquelas sob condições ambientais naturais de CO₂, foram capazes de manter, mesmo sob déficit hídrico, um alto teor de umidade dos rizóforos, onde ocorre o acúmulo de carboidratos. Trabalhos anteriores realizados com *V. herbacea* já haviam demonstrado a alta capacidade destas plantas de reter água nos rizóforos por longos períodos sob baixos conteúdos de água no solo (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2011), característica esta possivelmente associada à capacidade de osmorregulação dos frutanos, uma vez que os processos de retenção de água foram acompanhados de alterações no metabolismo destes carboidratos.

Nas plantas de *V. herbacea* sob 760 ppm, o teor de umidade dos rizóforos correlacionou-se significativamente com a umidade do solo, principalmente quando consideramos o experimento realizado no final da primavera (r=0,88; p=0,03). A manutenção do alto conteúdo de água, associado à diminuição Ψ_{folha} , indica mudanças na energia livre da água, apontando a ocorrência de ajustamento osmótico nesses tecidos, como sugerido por Garcia *et al.* (2011).

Em relação às alterações no metabolismo de frutanos, nos dois períodos analisados, frente à suspensão de regas foram verificadas algumas particularidades. No experimento realizado no final da primavera, as plantas mantidas sob 380 ppm apresentaram, em geral, maiores atividades de FEH durante o período experimental, com conseqüente aumento da razão fruto-oligo:fruto-polissacarídeo.

Em plantas sob déficit hídrico, a FEH desempenha uma função de sobrevivência, conforme sugerido por De Roover *et al.* (1999) para chicória e por Garcia *et al.* (2011) para *V. herbacea*, despolimerizando a reserva de frutanos e resultando num “pool” de cadeias menores e açúcares redutores, permitindo a diminuição do potencial osmótico e manutenção do metabolismo da planta.

Sob 760 ppm foi observada atividade mais elevada da enzima SST nas plantas sob suspensão de regas em relação ao controle, principalmente no início do experimento, possivelmente quando a assimilação fotossintética ainda ocorria (dados não mostrados). Interessante também notar que o aumento da atividade dessa enzima correlacionou-se negativamente, de forma significativa, com a diminuição do Ψ_{wsub} ($r=-0,86$; $p=0,02$). Embora a SST seja a enzima que dá início à síntese de frutanos (Van den Ende & Van Laere 1996), não foi observado aumento do conteúdo de oligossacarídeos nestas plantas.

Assim como ocorreu com plantas de *V. discolor*, o carbono excedente nas plantas sob suspensão de regas e 760 ppm na primavera pode ter sido utilizado na manutenção do potencial osmótico, no metabolismo da planta e no crescimento, não sendo necessária a mobilização das reservas como ocorreu nas plantas mantidas sob 380 ppm. Outro dado que suporta essa hipótese é o elevado conteúdo de açúcar redutor nos rizóforos nas plantas sob elevado CO₂ e suspensão de regas, mesmo sob baixa atividade de FEH e FFT, ao contrário do observado nas plantas sob 380 ppm.

Além disso, a atividade da FEH é inibida em altas concentrações de sacarose (De Roover *et al.* 2000, Asega *et al.* 2011), o que poderia também explicar a baixa atividade dessa enzima verificada nas plantas sob 760 ppm. Embora a concentração desse dissacarídeo não tenha sido determinada nesses tecidos, Oliveira *et al.* (2010) também verificaram atividades reduzidas de FEH em plantas sob alto CO₂, quando comparadas às plantas controle.

No experimento realizado no inverno, sob 380 ppm, as atividades de SST, FFT e FEH foram maiores nas plantas sob suspensão de regas do que nas plantas controle, especialmente no início do experimento. O aumento da atividade dessas enzimas observado nas plantas tratadas sugere sua atuação na manutenção de frutanos de baixo peso molecular que, por sua vez, atuam na diminuição do potencial hídrico e na manutenção do teor de umidade dos tecidos dos rizóforos.

Além da sua atuação no ajuste osmótico, estudos recentes demonstraram que os frutanos atuam na estabilização de membranas em condições de estresse por frio ou seca (Vereyken *et al.* 2001, Hinchá *et al.* 2002). As membranas são as primeiras estruturas afetadas pelo congelamento e dessecação, causando injúrias às células. As proteínas citosólicas e as organelas apresentam diminuição da atividade ou desnaturação completa quando desidratadas. Vereyken *et al.* (2001) revelaram que tanto o levano quanto a inulina interagem com as camadas fosfolipídicas das membranas, protegendo-as de danos que possam ocorrer durante a transição dos lipídeos do estado líquido-cristalino para gel. Foi demonstrado ainda que a bicamada lipídica torna-se menos permeável durante o tratamento de congelamento e desidratação quando os frutanos estão presentes (Hinchá *et al.* 2000). Dessa forma, a célula

não perde sua integridade devido ao aumento da permeabilidade e à perda da seletividade da membrana ocorridos durante o frio e a seca (Demel *et al.* 1999, Hinch *et al.* 2006).

Embora Asega & Carvalho (2004) tenham verificado que a FEH e a SST apresentam controle temporal por estarem no mesmo compartimento celular, há relatos na literatura da participação da FEH durante o processo de biossíntese de frutanos. Em trigo (Van de Ende *et al.* 2003), a FEH atua na diminuição do comprimento das ramificações das moléculas de frutanos durante a sua biossíntese (“triming process”). Em *Lolium temulentum* L. (Cairns *et al.* 1997) e *Smallanthus sonchifolius* (Poep.) H. Rob. (Itaya *et al.* 2002) também foram encontradas atividades concomitantes de FEH e SST durante o seu cultivo. Desse modo, podemos sugerir que nas plantas sob 380 ppm e suspensão de regas no inverno, a ação da FEH junto com as frutossiltransferases, tenha favorecido a redistribuição das moléculas de frutanos, conforme pode ser constatado pelo aumento de fruto-oligo e fruto-polissacarídeos em relação ao controle e aumento da razão entre essas frações ao final do período experimental.

Assim como verificado no experimento com *V. discolor*, nas plantas sob 760 ppm e suspensão de regas não foram observadas diferenças quantitativas no conteúdo dos fruto-oligo e fruto-polissacarídeos, embora a atividade de FEH tenha sido elevada nestas plantas entre o 7º e o 15º dias e a atividade de FFT e o conteúdo de açúcar redutor também tenham aumentado nesse período. Concomitantemente a este aumento, foi observada uma diminuição abrupta da fotossíntese, ocasionando a redução do carbono utilizado para o ajuste osmótico nos rizóforos.

O aspecto hídrico parece ser preponderante nas respostas das plantas mesmo sob condições de alta concentração de CO₂. A exemplo do observado no estudo com *V. discolor*, os maiores coeficientes de correlação, bem como o maior número de coeficientes significativos, foram observados nas condições de suspensão de regas e re-irrigação, tanto em elevada concentração de CO₂ ($\Psi_{wsolo} \times U_{pa} = 0,82$; $p=0,04$, $\Psi_{wsub} \times FEH = 0,86$; $p = 0,02$, $\Psi_{wsub} \times Urz = 0,95$; $p=0,003$, $A \times U_{pa} = 0,80$; $p=0,13$), como em condições naturais ambientais ($\Psi_{wsub} \times U_{pa} = 0,92$; $p = 0,0007$, $\Psi_{wsolo} \times FEH = 0,75$; $p=0,08$, $U_{solo} \times gs = 0,91$; $p=0,01$).

Em adição, também observamos que essa constatação estatística é mais evidente no estudo realizado no inverno (tabela 2 – anexo) comparado ao da primavera (tabela 3 – anexo). No experimento de primavera, foram encontradas 38 correlações em nível de 5% de probabilidade entre os Ψ_{wsolo} , U_{solo} , Ψ_{wpa} e Ψ_{wsub} e os parâmetros fisiológicos e bioquímicos, nas plantas sob suspensão de regas, ao passo que nas plantas após a re-irrigação foram encontradas 36 correlações e no controle 23.

Já no experimento de inverno, nas plantas sob suspensão de regas foram encontradas 75 correlações em nível de 5% de probabilidade entre a U_{solo} , Ψ_{wpa} e Ψ_{wsub} e os parâmetros fisiológicos e bioquímicos, enquanto que após a re-irrigação, o número de correlações diminuiu para 55 e no controle 42.

Essa dependência das respostas frente à disponibilidade hídrica parece estar relacionada à própria sazonalidade climática e de disponibilidade hídrica do cerrado, bioma de ocorrência de *V. herbácea*, que inclui verão úmido e inverno seco (Eiten 1972, Coutinho 2002).

5.3 Efeito conjunto de diferentes regimes de regas e da concentração elevada de CO₂ no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea*

Pequenas alterações no conteúdo e no estado termodinâmico da água no solo e nas plantas, provocadas pelos diferentes níveis de reposição hídrica, afetaram os processos fisiológicos e bioquímicos como a fotossíntese e o metabolismo de frutanos de *Vernonia herbacea* sob 380 e 760 ppm de CO₂.

Dentre as primeiras mudanças que ocorrem em plantas expostas a condições de seca está a redução de água durante a transpiração, através da regulação da abertura de estômatos, sendo este um dos principais efeitos indiretos na redução das taxas fotossintéticas, limitando significativamente a assimilação de carbono para a fotossíntese e o crescimento (Burgess 2006). De fato, os decréscimos mais acentuados na condutância estomática foram observados nas plantas 25%, que são aquelas que receberam reposição de 25% da água evapotranspirada, sob 380 ppm e 760 ppm e correlacionaram-se significativamente com a diminuição da umidade do solo ($U_{solo} \times g_s = 0,96$; $p=0,001$ e $r=0,98$; $p=0,0006$, respectivamente). A diminuição da umidade do solo, portanto, foi o principal fator limitante da fotossíntese nas plantas sob estas condições, independente da concentração de CO₂.

Estudos sugerem que plantas sob alto CO₂ perdem água mais lentamente sob déficit hídrico quando comparadas às plantas controle, devido à menor condutância estomática e taxa de transpiração em plantas sob essas condições (Robredo *et al.* 2007 e referências ali contidas). De fato, em plantas sob alto CO₂, neste estudo com *V. herbacea*, o Ψ_{wsub} das plantas 25% foi próximo ao verificado nos demais regimes hídricos ao longo de todo o período estudado ($\Psi_{wsub} \times g_s = 0,98$; $p=0,0001$, $\Psi_{wsub} \times T = 0,88$; $p=0,04$), enquanto nas plantas sob 380 ppm e 25%, o Ψ_{wsub} começou a diminuir após o 18º dia, não correlacionando-se com as trocas gasosas.

Nos diferentes níveis de restrição hídrica, tanto as plantas mantidas sob alto CO₂ ($U_{solo} \times Urz = 0,81$; $p=0,04$) quanto aquelas sob condições ambientais naturais de CO₂

(Usolo x Urz = 0,89; p=0,01), foram capazes de manter um alto teor de umidade dos rizóforos. Estudos anteriores mostraram que em longos períodos sob baixos conteúdos de água no solo, os rizóforos apresentaram alta capacidade de retenção de água, possivelmente associada à capacidade de osmorregulação dos frutanos, uma vez que os processos de retenção de água foram acompanhados de alterações no metabolismo destes carboidratos (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2011).

Com relação às frutossiltransferases, observou-se apenas uma diminuição da atividade da SST, enzima responsável pela síntese de frutanos, nas plantas sob restrição hídrica nas duas concentrações de CO₂. Portes & Carvalho (2006) verificaram diminuição da atividade de SST em plantas de *V. herbacea* em fase de rebrota, dormência e rebrota induzida, estágios nos quais o aparato fotossintético seria ausente ou insuficiente para prover fotoassimilados para a síntese de frutanos. De fato, no presente estudo verificou-se uma correlação positiva significativa entre a diminuição da fotossíntese e a diminuição da atividade da SST (tabela 3 – anexo) nos diferentes níveis de reposição de água das duas concentrações de CO₂, corroborando a hipótese de que a diminuição de substrato causou a diminuição da ação desta enzima.

Nas plantas sob 760 ppm, a atividade da FEH aumentou de maneira inversamente proporcional ao tratamento de restrição hídrica imposta após a re-irrigação, enquanto nas plantas sob 380 ppm não foi observado. Esta enzima, responsável pela despolimerização das cadeias de frutanos, parece ter atuado na produção de cadeias menores de frutanos, especialmente nas plantas 25%, que apresentaram diminuição no conteúdo de frutopolissacarídeos concomitantemente ao aumento desta a partir do 27º dia.

Nas plantas 25%, em ambas as concentrações de CO₂, o açúcar redutor presente em altas concentrações, principalmente aos 27 dias, foi rapidamente utilizado como fonte de energia pelas plantas durante a recuperação de sua parte aérea, conforme proposto por Mohammadkhani & Heidari (2008), para milho e também verificado em plantas de *V. herbacea* sob suspensão de regas, por Garcia *et al.* (2011).

Em geral, as maiores alterações nos parâmetros analisados foram verificadas nas plantas mantidas no nível mais baixo de reposição de água (25%), em ambas as condições atmosféricas de CO₂. De fato, foi neste nível de reposição hídrica que foram observadas as correlações mais significativas entre a Usolo, Ψ_{wpa} e Ψ_{wsub} e os parâmetros fisiológicos e bioquímicos, tanto nas plantas em condições ambientais naturais (Ψ_{wpa} x A = 0,84; p=0,03, Ψ_{wsub} x açúcar redutor = -0,91; p=0,01, Ψ_{wpa} x FFT = 0,85; p=0,03, por exemplo) como em condições de alto CO₂ (Usolo x FFT = 0,89; p=0,01, Ψ_{wpa} x gs = 0,74, p=0,08, Ψ_{wpa} x T = 0,97, p=0,0006, por exemplo), sendo as respostas semelhantes àquelas observadas nos estudos

em que a suspensão total de regas foi imposta, evidenciando assim a importância da água nas respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas.

Por outro lado, os tratamentos intermediários (75% e 50%) de reposição hídrica permitiram a diminuição gradual de disponibilidade hídrica nas plantas e a manutenção do conteúdo de água nos rizóforos, dos níveis de atividade das enzimas do metabolismo de frutanos e do conteúdo desses carboidratos nesses órgãos a valores próximos às plantas controle, sugerindo assim um processo de aclimação das plantas a essas duas condições hídricas, independente da concentração de CO₂. Segundo Larcher (2006), se a intensidade de um estressor não se altera, a restituição na forma de processos de reparo, como a síntese de substâncias de proteção, será rapidamente iniciada. Essa situação leva a uma fase de resistência, na qual, sob estresse contínuo, a resistência aumenta. Devido à melhora na estabilidade, a normalização acontece mesmo sob estresse contínuo, ou seja, a planta se adapta a essas novas condições, o que parece ter ocorrido naquelas plantas sob os tratamentos intermediários de reposição hídrica.

6. Considerações finais

Ainda há muito a ser conhecido sobre os efeitos que o aumento do CO₂ atmosférico pode ter no crescimento e na fisiologia das plantas, ainda mais se considerarmos que este aumento não constitui um evento isolado, mas vem acompanhado de aumentos da temperatura média e alterações no padrão global de distribuição de chuva, podendo intensificar os fatores abióticos estressantes, tal como a seca. Assim, as respostas de plantas aos aumentos na concentração atmosférica de CO₂ devem considerar uma análise integrada ao longo do tempo, com outros fatores abióticos, como radiação, temperatura e déficit hídrico causado pela seca no solo.

Nesse trabalho foram realizados três estudos nos quais foi possível verificar os efeitos da elevada concentração de CO₂ e do déficit hídrico nas trocas gasosas, no status hídrico, no crescimento e no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* e *Viguiera discolor*, duas asteráceas do cerrado.

Embora a diminuição da transpiração e da condutância estomática sejam efeitos comuns em plantas sob alto CO₂ e, embora este efeito tenha sido observado no estudo com *Vernonia herbacea*, em plantas de *Viguiera discolor* isso não foi verificado, o que ocasionou a rápida diminuição do conteúdo de água nos vasos neste estudo em plantas submetidas à suspensão de regas.

Pesquisas recentes têm demonstrado que as alterações no metabolismo de frutanos estão envolvidas não só no ajuste osmótico das células, mas também na manutenção da integridade das membrana e na sinalização para ocorrência de outras respostas fisiológicas. Entretanto, análises do efeito dos frutanos na membrana plasmática ou de outras organelas celulares ainda não foram realizadas com *V. herbacea* e *V. discolor*, o que torna apenas especulativa esta função nas espécies estudadas.

De modo geral, os resultados obtidos nos três estudos demonstram, ao longo do *continnum* solo-planta, uma relação de dependência entre os parâmetros avaliados e a disponibilidade hídrica, independente da concentração de CO₂. No estudo comparativo entre as duas estações do ano, fica clara a diferença nas respostas hídricas entre o inverno e a primavera, embora isso não tenha sido verificado em plantas sob alto CO₂. Esse resultado parece estar relacionado com a própria sazonalidade climática característica do cerrado, bioma de ocorrência de *V. herbacea*.

No experimento em que foram aplicados diferentes níveis de disponibilidade hídrica, as maiores alterações foram verificadas nas plantas sob 25% em ambas as

concentrações de CO₂, que apresentaram respostas fisiológicas e bioquímicas próximas às obtidas com plantas controle e semelhantes às verificadas no estudo sob suspensão de regas. Nos demais níveis de reposição de água, em ambas as concentrações de CO₂, verificou-se que as plantas aclimataram-se às novas condições por manterem valores de atividade das enzimas do metabolismo de frutanos e do conteúdo desses carboidratos próximos aos das plantas controle.

Em condições ambientais naturais, estudos sugerem que plantas de *V. herbacea* sob déficit hídrico mobilizam suas reservas de frutanos como forma de proteção à seca. As respostas obtidas nos estudos com *V. herbacea* e *V. discolor* demonstram que a concentração elevada de CO₂ causa um atraso na mobilização de frutanos em plantas sob déficit hídrico para manutenção de seu metabolismo, fazendo uso primeiramente do carbono em excesso, proveniente da fotossíntese.

Sendo assim, considerando as previsões para esse século de aumento do CO₂ atmosférico e mudanças no regime de chuvas, a interação entre esses dois fatores tem um efeito positivo para o metabolismo de frutanos, pois o elevado CO₂ atenua os efeitos deletérios do déficit hídrico nas plantas.

7. Referências Bibliográficas

- Aidar, M.P.M., Martinez, C.A., Costa, A.C., Costa, P.M.F., Dietrich, S.M.C., Buckeridge, M.S.** 2002. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Biota Neotropica* 2, BN01602012002. Available at <http://www.biotaneotropica.org.br/v2n1/pt/abstract?article+BN01602012002>
- Albretch, G., Kammerer, S., Praznik, W. & Wiedenroth, E.M.** 1993. Fructan content of wheat seedlings (*Triticum aestivum*) under hypoxia and following re-aeration. *New Phytologist* 123: 471-476.
- Améziane, R., Deleens, E., Noctor, G., Morot-Gaudry, J. & Limani, M.** 1997. Stage of development is an important determinant in the effect of nitrate on photoassimilate (¹³C) partitioning in chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of Experimental Botany* 48: 25-33.
- Asega, A.F.** 2007. Mobilização de frutanos durante a brotação em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby: purificação e expressão gênica de frutano-exohidrolases. Tese de doutorado. Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Asega, A.F. & Carvalho, M.A.M.** 2004. Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 313-319.
- Asega, A.F., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Carvalho, M.A.M.** 2004. Is fructan hydrolysis in *Vernonia herbacea* orchestrated by an FEH complex? Fifth International Fructan Symposium, Abstracts p. 88. Havana, Cuba.
- Asega, A. F., Nascimento, J.R.O. & Carvalho, M.A.M.** 2011. Increased expression of fructan 1-exohydrolase in rhizophores of *Vernonia herbacea* during sprouting and exposure to low temperature. *Journal of Plant Physiology* 168: 558-565.
- Baker, J.T., Allen, L.H., Boote, K.L. & Pickering, N.B.** 1997. Rice responses to drought under carbon dioxide enrichment. 1. Growth and yield. *Global Change Biology* 3: 119-128.
- Blake, G.R.** 1965. Bulk density. In: C.A. Black, D.D. Evans, J.L. White, L.E. Ensminger & F.E. Clark (eds.). *Methods of soil analysis* American Society of Agronomy, Madison, pp. 374-390.
- Bonnett, G.D. & Simpson, R.J.** 1993. Fructan-hydrolyzing activities from *Lolium rigidum* Gaudin. *New Phytologist* 123: 443-451.
- Burgess, S.S.O.** 2006. Facing the challenge of seasonally dry environments. *Physiologia Plantarum* 127: 339-342.
- Cairns, A.J., Bonnett, G.D., Gallagher, J.A., Simpson, R.J., Pollock, C.J.** 1997. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum*. VII. Sucrose and fructan hydrolysis by a fructan polymerizing enzyme preparation. *New Phytologist* 136: 61-72.
- Cairns, A.J., Pollock, C.J., Gallagher, J.A. & Harrison, J.** 2000. Fructans: Synthesis and Regulation. In R.C. Leegood, T.D. Sharkey, and S. von Caemmerer (eds.). *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Carvalho, M.A.M, Asega, F.A. & Figueiredo-Ribeira, R.C.L.** 2007. Fructans in Asteraceae from Brazilian cerrado. In *Recent advances in fructooligosaccharides research* (S. Norio, B. Noureddine & O. Shuichi, eds.). Research Signpost, Kerala.

- Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.** 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2001. Frutanos: ocorrência, estrutura e utilização, com ênfase em plantas do cerrado brasileiro. *In* Fibra dietética em iberoamérica: tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos (F.M. Lajolo, F. Saura-Calixto, E.W. Penna & E.W. Menezes, eds.). Varela: São Paulo.
- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C.** 1997. Growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. *New Phytologist* 136: 153-161.
- Chaves, M. M. & Pereira, J. S.** 1992. Water Stress, CO₂ and Climate Change. *Journal of Experimental Botany* 43: 1131-1139.
- Claessens, G., Van Laere, A. & De Proft, M.** 1990. Purification and properties of an inulase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology* 136: 35-39.
- Clark, G.T., Zuther, E., Outred, H.A., McManus, M.T. & Heyer, A.G.** 2004. Tissue-specific changes in remobilization of fructan in the xerophytic tussock species *Festuca novae-zelandiae* in response to a water deficit. *Functional Plant Biology* 31: 377-389.
- Coutinho, L.M.** 2002. Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois. A. L Klein (Org), Unesp/Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, 77.
- Cummings, J.H., Macfarlane, G.T. & Englyst, H.N.** 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 415-420.
- Cuzzuol, G.R.F., Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Furlani, P.R.** 2005. Soluções nutritivas para o cultivo e a produção em plantas de *Vernonia herbacea*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 911-917.
- Degasperi, M. I., Itaya, N.M., Buckeridge, M.S., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2003. Fructan degradation and hydrolytic activity in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae), a herbaceous species from the cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 11-21.
- Demel, R.A., Dorrepaal, E., Ebskamp, M.J.M., Smeekens, J.C.M. & de Kruijff, B.** 1998. Fructans interact strongly with model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1375: 36-42.
- De Roover, J.D., Van den Branden, K., Van Laere, A., Van den Ende, W.** 2000. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 210: 808-814.
- De Roover, J.D., Van Laere, A & Van den Ende, W.** 1999. Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum* 106: 158 – 163.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.C.** 1999. Fructan variation in the rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, as influenced by temperature. *Revista Brasileira de Botânica* 22: 267-273.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Itaya, N.M., Carvalho, M.A.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Dietrich, S.M.C.** 2004. Fructans and water suppression on intact and fragmented

- rhizophores of *Vernonia herbacea*. Brazilian Archives of Biology and Technology 47: 363-373.
- Edelman, J. & Jefford, T. G.** 1964. The mechanism of fructose polymers in plants. 4. β -fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. Biochemical Journal 93: 148-161.
- Edelman, J. & Jefford, T.G.** 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. New Phytologist 67: 159-166.
- Eiten, G.** 1972. The cerrado vegetation of Brazil. Botanical Review 38: 201-341.
- ESRL - Earth System Research Laboratory.** 2011. Disponível em <<http://www.esrl.noaa.gov/>>. Acesso em dezembro de 2011.
- Farrar, J.F.** 1996. Sinks – integral parts of a whole plant. Journal of Experimental Botany 47: 1273-1279.
- Frehner, M., Keller, F. & Wienken, A.** 1984. Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). Journal of Plant Physiology 116: 197-208.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Dietrich, S.M.C., Chu, E.P., Carvalho, M.A.M., Vieira, C.C.J., & Graziano, T.T.** 1986. Reserve carbohydrate in underground organs of native Brazilian plants. Revista Brasileira de Botânica 9: 159-166.
- Garcia, P.M.A.** 2009. Variações no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) em resposta ao déficit hídrico e sua relação com a tolerância à seca. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Garcia, P.M.A., Asega, A. F., Silva, E.A., Carvalho, M.A.M.** 2011. Effect of drought and re-watering on fructan metabolism in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. Plant Physiology and Biochemistry 49: 664-670.
- Hartemink, R., Van Laere, K.M.J. & Rombouts, F.M.** 1997. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. Journal of Applied Microbiology 383: 367-374.
- Hayashi, A.H. & Appezzato-Da-Gloria B.** 2005. The origin and anatomy of rhizophores in *Vernonia herbacea* and *V. platensis* (Asteraceae) from the Brazilian Cerrado. Australian Journal of Botany 53: 273-279.
- Hendry, G.A.F.** 1993. Evolutionary origins and natural fractions of fructans: a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. New Phytologist 123: 3-14.
- Hendry, G.A.F. & Wallace, R.K.** 1993. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In Science and Technology of Fructans (M. Suzuki & J.N. Chatterton, eds). CRC Press, Boca Raton.
- Henson, C.A. & Livingston, D.P.** 1998. Characterization of a fructan exohydrolase purified from barley stems that hydrolyzes multiple fructofuranosidic linkages. Plant Physiology and Biochemistry 36: 715-720.
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T. & Tokunaga, Y.** 1986. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. Bifidobacteria Microflora 5: 37-50.
- Hincha, D.K., Hellwege, E.M., Heyer, A.G. & Crowe, J.H.** 2000. Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. European Journal of Biochemistry 267: 535-540.

- Hincha, D.K., Popova, A.V. & Cacela, C.** 2006. Effects of sugars on the stability of lipid membranes during drying. *In: Liu A. Leitmannova (ed.). Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, vol. 3, Elsevier, Amsterdam, pp. 189-217.
- Hincha, D.K., Zuther, E., Hellwege, E.M. & Heyer, A.G.** 2002. Specific effects of fructo- and glucooligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. *Glycobiology* 12: 103-110.
- Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguer, M. van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K. & Johnson, C.A.** 2001. IPCC 2001: climate change 2001: the scientific basis. Cambridge University Press, New York.
- Houghton, J.T., Mieira Filho, L.G., Callander, B.A., Harris, N., Kattenberg, A. & Maskell, K.** 1996. Climate Change 1995 – The science of climate change. Cambridge University Press, Cambridge.
- Housley, T.L. & Pollock, C.J.** 1993. The metabolism of fructan in higher plants. *In Science and Technology of fructans* (M. Suzuki & J.N. Chatterton, eds). CRC Press, Boca Raton.
- Isejima, E.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.** 1993. Fructan variations in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae): the influence of phenology. *Plant and Cell Physiology* 34: 723-727.
- Isejima, E.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1991. Partição da matéria seca durante o desenvolvimento de *Viguiera discolor*. *Revista Brasileira de Botânica* 14: 107-114.
- IPCC - Intergovernmental Panel Climate Change.** 2007. Summary for policymakers. Disponível em <<http://www.ipcc.ch>>. Acesso em abril de 2007.
- Itaya, N.M., Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Fructosyl transferase and hydrolase activities in rhizophores and tuberous roots upon growth of *Polymnia sonchifolia* (Asteraceae). *Physiol. Plantarum* 116: 451-459.
- Itaya, N.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Buckeridge, M.S.** 1997. Biosynthesis in vitro of high molecular mass fructan by cell-free extracts from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). *New Phytologist* 136: 53-60.
- Itaya, N.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Buckeridge, M.S.** 1999. Synthesis of fructans by fructosyltransferases from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 435-442.
- Jeong, B. & Housley, T.L.** 1990. Fructan metabolism in wheat in alternating warm and cold temperatures. *Plant Physiology* 93: 902 – 906.
- Jermym, M.A.** 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature* 177: 38-39.
- Koops, A.J. & Jonker, H.H.** 1996. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II. Purification of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and fructan: fructan 1-fructosyltransferase. *Plant Physiology* 110: 1167-1175.
- Körner, C.** 2006. Plant CO₂ responses: an issue of definition, time and resource supply. *New Phytologist* 172: 393-411.
- Larcher, W.** 2006. *Ecofisiologia vegetal*. Rima, São Carlos.
- Lee, H. S. J. & Jarvis, P.G.** 1995. Trees Differ from Crops and from Each Other in Their Responses to Increases in CO₂ Concentration. *Journal of Biogeography* 22: 323-330

- Mantovani, W. & Martins, F. R.**, 1988, Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji Guaçu, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira Botânica* 11: 101-112.
- Meier, H. & Reid, J.S.G.** 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. *In* Encyclopedia of Plant Physiology - Plant Carbohydrates I (F.A. Loewus, W. Tanner, eds). Springer-Verlag, Heidelberg, v. 13A, p. 417-418.
- Menezes, N.L., Muller, C. & Sajo, M.G.** 1979. Um novo e peculiar tipo de sistema subterrâneo em espécies de *Vernonia* da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil). *Boletim de Botânica, Universidade de São Paulo* 7: 33-38.
- Mousseau, M. & Saugier, B.** 1992. The direct effect of increased CO₂ on gas exchange and growth of forest tree species. *Journal of Experimental Botany* 43: 1121-1130.
- Naumburg, E., Loik, M.E. & Smith, S.D.** 2004. Photosynthetic responses of *Larrea tridentata* to seasonal temperature extremes under elevated CO₂. *New Phytologist* 162: 323-330.
- Oliveira, V.F., Zaidan, L.B.P., Braga, M.R., Aidar, M.P.M., Carvalho, M.A.M.** 2010. Elevated CO₂ atmosphere promotes plant growth and inulin production in the cerrado species. *Functional Plant Biology* 37: 223 – 231.
- Penson, S.P. & Cairns, A.J.** 1994. Fructan biosynthesis in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.): a comparison of the novo synthesis *in vivo* and *in vitro*. *New Phytologist* 128: 395-402.
- Petit, J.R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N.I., Barnola, J.M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davisk, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V. M., Legrand, M., Lipenkov, V.Y., Lorius, C., Pe' pin, L., Ritz, C., Saltzman, E. & Stievenard, M.** 1999. Climate and atmospheric history of the past 420.000 years from the Vostok ice core in Antarctica. *Nature* 399:429-436.
- Pilon-Smits, E.A.H., Ebskamp, M.J.M., Paul, M.J., Jeuken, M.J.W., Weisbeek, P.J. & Smeekens, S.C.M.** 1995. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* 107: 125-130.
- Pilon-Smits, E.A.H., Terry, N., Sears, T. & Van Dun, K.** 1999. Enhanced drought resistance in fructan producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 313-317.
- Pollock, C.J.** 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist* 104: 1-24.
- Pollock, C.J. & Cairns, A.J.** 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 77:101.
- Pollock, C. J., Cairns, A.J., Sims, I.M. & Housley, T.L.** 1996. Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. *In* E. Zamski and A.A. Shaffer (eds). Photoassimilate Distribution in Plants and Crops : Source - Sink Relationships, A.A. Marcel Dekker Inc, New York.
- Pontis, H.G.** 1989. Fructans and cold stress. *Journal of Plant Physiology* 134: 148-150.
- Pontis, H.G. & Del Campillo, E.** 1985. Fructans. *In* P.M. Dey & R.A. Dixon (eds). Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants, Academic Press, New York.
- Portes, M.T.** 2005. Biossíntese e degradação de frutanos em diferentes regiões do rizóforo de *Vernonia herbacea* (Vell). Rusby (Asteraceae). Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Portes, M & Carvalho, M.A.M.** 2006. Spatial distribution of fructans and fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) in different developmental phases. *Plant Science* 170: 624-633
- Prud'homme, M.P., Gastal F., Belanger, G. & Boucaud J.** 1993 Temperature effects on partitioning of ¹⁴C assimilates in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *New Phytology* 123: 255-261
- Ritsema, T. & Smeekens, S.C.M.** 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 223-230.
- Roberfroid, M.B.** 2002. Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition* 87: S139–S143.
- Roberfroid, M.B.** 2005. Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition* 93: 13-25.
- Robredo, A., Pérez-López, U., Maza, H. S., González-Moro, B., Lacuesta, M., Mena-Petite A., Muñoz-Rueda, A.** 2007. Elevated CO₂ alleviates the impact of drought on barley improving water status by lowering stomatal conductance and delaying its effects on photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany* 59: 252-263.
- Rogers, H.H. Sionit, N., Cure, J.D., Smith, H.M., Binham, G.E.** 1994. Influence of elevated CO₂ on water relations of soybeans. *Plant Physiology* 74: 233 – 238.
- Samarakoon, A.B. & Gifford, R.M.** 1995. Soil water content under plants at high CO₂ concentration and interactions with the direct CO₂ effects: a species comparison. *Journal of Biogeography* 22: 193-202.
- Samarakoon, A.B. & Gifford, R.M.** 1996a. Elevated CO₂ Effects on Water Use and Growth of Maize in Wet and Drying Soil. *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 53 – 62.
- Samarakoon, A.B. & Gifford, R.M.** 1996b. Water Use and Growth of Cotton in Response to Elevated CO₂ in Wet and Drying Soil. *Australian Journal of Plant Physiology* 23: 63 - 74
- Simmen, U., Obenland, D., Boller, T. & Wiemken, A.** 1993. Fructan synthesis in excised barley leaves. *Plant Physiology* 101: 459-468.
- Sgherri, C.L.M., Quartacci M.F., Menconi M., Raschi A. & Navari-Izzo F.** 1998. Interactions between drought and elevated CO₂ on alfalfa plants. *Journal of Plant Physiology* 152: 118-124.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-63.
- Spollen, W.G. & Nelson, C.J.** 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* 106: 329-336.
- Tertuliano, M.F. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1993. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. *New Phytologist* 123: 741-749.
- Valluru, R. & Van den Ende, W.** 2008. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany* 59: 2905-2916.
- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Van Riet, L., Van Laere, A., Yoshida, M. & Kawakami, A.** 2003. Fructan 1-exohydrolases. β -(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiology* 131: 621-631.
- Van den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J. & Van Laere, A.** 2002. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases.

- Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal* 2: 1273-1287
- Van den Ende, W.; Moors, S.; Van Hoenacker, G. & Van Laere A.** 1998. Effect of osmolytes on the fructan pattern in feeder roots produced during forcing of chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology* 153: 290-298.
- Van den Ende, W. & Van Laere, A.** 1996. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. *Journal of Plant Physiology* 149: 43-50.
- Van den Ende, W., Yoshida, M., Clerens, S., Vergauwen, R. & Kawakami, A.** 2005. Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum* L.). *New Phytologist* 166: 917-932.
- Van Riet, L., Nagaraj, V., Van den Ende, W., Clerens, S., Wiemken, A. & Van Laere, A.** 2006. Purification, cloning and functional characterization of an fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 57: 213-223.
- Vereyken, I.J., Chupin, V., Demel, R.A., Smeekens, S.C.M., & De Kruijff, B.** 2001, Fructans insert between the headgroups of phospholipids *Biochimistry Biophysic Acta Biomembranes*, 1510, 307-320.
- Virgona, J.M. & Barlow, E.W.R.** 1991. Drought stress induces changes in the non-structural carbohydrate composition of wheat stems. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 239-247.
- Vu, J.V.C, Baker, J.T., Pennanen, A.H., Allen Jr., L.H., Bowes, G., Boote, K.J.** 1998. Elevated CO₂ and water deficit effects on photosynthesis, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, and carbohydrate metabolism in rice. *Physiologia Plantarum* 103: 327-339.
- Wall, G.W., Brooks, T.J., Adam, N.R., Cousins, A.B, Kimball, B.A., Pinter, P.J., LaMorte, R.L., Triggs, J., Ottman, M.L., Leavitt, S.W., Matthias,, A.D., Williams, D.G. & Weber, A.N.** 2001. Elevated atmospheric CO₂ improved sorghum plant water by ameliorating the adverse effects of drought. *New Phytologist* 152: 231 – 248.
- Wang, C., Van den Ende, W. & Tillberg, J.E.** 2000. Fructan accumulation induced by nitrogen deficiency in barley leaves correlates with the level of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase mRNA. *Planta* 211: 701-707.
- Wardlaw, I.F., Willenbrink, J.** 2000. Mobilization of fructan reserves and changes in enzyme activities in wheat stems correlate with water stress during kernl filling. *New Phytologist* 148: 413-422.
- Xiao, C.-W., Sun, O.J., Zhou, G.-S., Zhao, J.-Z. & Wu, G.** 2005. Interactive effects of elevated CO₂ and drought stress on leaf water potential and growth in *Caragana intermedia*. *Trees* 19: 711-720.
- Yang, J., Zhang, J, Wang, Z., Zhu, Q. & Liu, L.** 2004. Activities of fructan and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* 220: 331-343.

Anexos

Tabela 1 - Coeficiente de correlação entre Ψ_{wsolo} , U_{solo} , Ψ_{wpa} , Ψ_{wsub} , A e EUA e os parâmetros fisiológicos e bioquímicos de plantas de *Viguiera discolor* submetidas à rega diária, suspensão de regas e re-irrigação no inverno.

	Ψ_{solo}		U_{solo}		Ψ_{wpa}		Ψ_{wsub}		A		EUA		
	360	720	360	720	360	720	360	720	360	720	360	720	
Controle	A			-0,64									
	T			-0,70				-0,78				-0,81*	
	gs												
	EUA							0,88**	0,98***				
	BiomassaPA									-0,50		-0,57	
	Upa		-0,94**										
	BiomassaRT	0,61	0,62			-0,54				0,59		-0,84*	
	Urt								-0,86*				
	SST								-0,51	0,93**	-0,83*		0,96**
	FFT						0,69		-0,64		-0,78		-0,71
	FEH	-0,63							-0,50				
	Poli		0,68										
	Oligo					0,57			0,56				
	Razão		-0,78	0,56		0,57			0,74				0,68
	Aç Redutor		-0,77			0,54							

Continuação – tabela 1

	Ψ_{solo}		Ψ_{usolo}		Ψ_{wpa}		Ψ_{sub}		\mathbf{A}		\mathbf{EUA}		
	360	720	360	720	360	720	360	720	360	720	360	720	
Suspensão de Regas	A	0,96**	0,97***	0,83*	0,92**		0,92**	0,76	0,65				
	T		0,80*		0,88**	-0,80*	0,95**						
	gs	0,95**	0,91**	0,89**	0,95**		0,99***	0,77		0,98***			
	EUA	0,89**		0,59				0,79		0,94**			
	BiomassaPA			-0,62									-0,66
	Upa	0,98***	0,96**	0,87	0,94**				0,76	0,92**	0,94**	0,81*	
	BiomassaRT		-0,75		-0,69								
	Urt	0,83*	0,90**	0,63	0,94**	-0,63	0,70		0,84*	0,71	0,79	0,76	
	SST	0,91**				-0,55				0,86*	0,56	0,85*	
	FFT					-0,72		-0,94		-0,55	0,66	-0,57	
	FEH	-0,85*		-0,76		0,53				-0,79		-0,70	
	Poli	-0,55								-0,50			
	Oligo						0,68				0,71		
	Razão	0,49	0,83*		0,72		0,91**	0,66		0,58	0,85*	0,81*	
	Aç Redutor										0,73	0,84*	0,64

Continuação – Tabela 1

	Ψsolo		Usolo		Ψwpa		Ψsub		A		EUA	
	360	720	360	720	360	720	360	720	360	720	360	720
Re-irrigadas	A	0,88**		0,78	0,89**	0,82*	0,76	0,93**	0,56			
	T				0,82*		0,70				0,76	
	gs	0,89**			0,90**		0,75	0,77		0,62	0,88**	
	EUA	0,59						0,83*	0,52	0,76		
	BiomassaPA		-0,54	-0,67		-0,59	-0,56					
	Upa			0,70	0,86*	0,66	0,57		0,67	0,63	0,93**	0,55
	BiomassaRT		-0,71		-0,64						-0,87*	-0,51
	Urt	0,72	0,76		0,88**		0,74	0,74	0,87*	0,53	0,74	0,51
	SST				0,63				0,67	0,50	0,52	0,84*
	FFT	-0,88**		-0,69	0,59	-0,81*		-0,96**	0,85*	-0,98***	0,64	-0,84*
	FEH	-0,75		-0,77		-0,77					-0,82*	
	Poli											
	Oligo		0,57									
	Razão		0,62		0,95**		0,74	0,55	0,58		0,85*	0,85*
	Aç Redutor				0,66		0,59		0,61		0,55	0,57

A: assimilação; T: transpiração; gs: condutância estomática, EUA: eficiência do uso da água; BiomassaPA: biomassa da parte aérea; Upa: teor umidade da parte aérea, BiomassaRT: biomassa das raízes tuberosas; Urt: umidade das raízes tuberosas; SST: sacarose: sacarose frutossiltransferase; FFT: frutose: frutose frutossiltransferase; FEH: frutano exohidrolase; poli: fruto-polissacarídeos; oligo: fruto-oligossacarídeos; razão: fruto-oligo:fruto-polissacarídeos; aç redutor: açúcar redutor. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Tabela 2 – Coeficiente de correlação entre Usolo, Ψ_{wpa} , Ψ_{wsub} , A e EUA e os parâmetros fisiológicos e bioquímicos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária, suspensão de regas e re-irrigação no inverno.

	Usolo		Ψ_{wpa}		Ψ_{wsub}		A		EUA		
	360	720	360	720	360	720	360	720	360	720	
Controle	A										
	T		0,77								
	gs	0,64						0,95**	0,83*		
	EUA			0,80*							
	BiomassaPA	-0,62								-0,50	-0,87*
	Upa		0,64				-0,58				
	BiomassaRZ		-0,86*	-0,56					-0,81*	-0,63	
	Urz	-0,68			0,53	0,78	-0,50			-0,50	
	SST	-0,62				0,68		-0,63	-0,52		
	FFT		0,84*		-0,74			0,86*			
	FEH	-0,83*				0,93**					0,90*
	Poli		-0,69					-0,80	-0,52		0,65
	Oligo		-0,72					-0,67	-0,70		
	Razão										-0,64
	Aç Redutor							0,58	-0,63		

Continuação tabela 2

	Usolo		Ψ_{wpa}		Ψ_{wsub}		A		EUA	
	360	720	360	720	360	720	360	720	360	720
A	0,78		0,75	0,52	0,62	0,54				
T							0,82*	0,93**		
gs	0,93**		0,63	0,67	0,50	0,50	0,93**	0,80*		
EUA	0,49	0,69	0,76	0,89**	0,83*	0,86*				
BiomassaPA	-0,58		-0,96***		-0,57	-0,57	-0,58	-0,67	-0,90**	-0,66
Upa	0,61		0,96***	0,80*	0,93**	0,92**	0,57	0,80*	0,81*	0,84*
BiomassaRZ	-0,61				-0,76				-0,52	
Urz	0,68		0,95**	0,58	0,90**	0,95**	0,55	0,61	0,92**	0,78
SST		-0,51		-0,85*		-0,64		-0,85*		-0,73
FFT		-0,87*	-0,76	-0,93			-0,99			-0,71
FEH			-0,97***			0,71	-0,66	0,96**	-0,71	
Poli		0,74	0,67	0,97***	0,68				0,84*	0,89*
Oligo			0,54			0,58			0,74	0,58
Razão							-0,60			
Aç Redutor										

Continuação – tabela 2

Re-Irrigada	A	0,78		0,66	-0,72	0,64	-0,69											
	T				-0,87*			0,82*	0,88**									
	gs	0,91**		0,54			-0,61	0,84*	0,68									
	EUA			0,61		0,67												
	BiomassaPA			-0,88*		-0,62												-0,86*
	Upa			0,95**		0,69	-0,60		0,80*	0,67								
	BiomassaRZ																	-0,54
	Urz	0,51		0,88*		0,94**		0,57		0,78								
	SST	-0,61	0,69					-0,70	-0,52									
	FFT	-0,64	-0,73	-0,68	-0,86*	-0,77	-0,70	-0,92**	0,84*									
	FEH		-0,62	-0,93**		-0,91**		-0,64										-0,66
	Poli			0,59			-0,59											0,88*
	Oligo			0,54		0,52				0,53	0,57							
	Razão					0,64	0,86*											
	Aç Redutor																	

A: assimilação; T: transpiração; gs: condutância estomática; EUA: eficiência do uso da água; BiomassaPA: biomassa da parte aérea; Upa: teor umidade da parte aérea; BiomassaRZ: biomassa dos rizóforos; Urz: umidade dos rizóforos; SST: sacarose: sacarose frutossiltransferase; FFT: frutose: frutose frutossiltransferase; FEH: frutano exohidrolase; poli: fruto-polissacarídeos; oligo: fruto-oligossacarídeos; razão: fruto-oligo:fruto-polissacarídeos; aç redutor: açúcar redutor. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Tabela 3 – Coeficiente de correlação entre Ψ_{wsolo} , Ψ_{usolo} , Ψ_{wpa} , Ψ_{wsub} e os parâmetros fisiológicos e bioquímicos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas à rega diária, suspensão de regas e re-irrigação na primavera.

	Ψ_{solo}		Ψ_{usolo}		Ψ_{wpa}		Ψ_{sub}	
	360	720	360	720	360	720	360	720
Controle	BiomassaPA		-0,70		-0,55			
	Upa	0,51	-0,75		0,54			0,89**
	BiomassaRZ		-0,85*					
	Urz	-0,51*	0,88*	0,72				-0,80*
	SST				0,68		0,73	
	FFT		-0,75				-0,59	0,63
	FEH	-0,57	-0,68					
	Poli							
	Oligo		0,51					-0,63
	Razão							
	Aç Redutor		0,52		-0,60			-0,88**
	Suspensão de Regas	BiomassaPA		0,98***		0,86*		0,64
Upa			0,82*	0,67	0,85*		0,74	0,92**
BiomassaRZ					0,76		0,64	-0,63
Urz			0,86*	0,68	0,83*		0,84*	0,94**
SST		-0,77		-0,60		-0,58	-0,94**	-0,86**
FFT				-0,55		-0,76	0,72	-0,71
FEH							0,87*	0,86*
Poli		-0,53			0,52		0,67	
Oligo							0,79	-0,67
Razão					-0,51			-0,85*
Aç Redutor		-0,65	-0,57		-0,56	-0,54		

Continuação – tabela 3

	Ψ_{solo}		Ψ_{solo}		Ψ_{folhas}		Ψ_{sub}		
	360	720	360	720	360	720	360	720	
Re-Irrigadas	BiomassaPA			-0,55		0,58		-0,52	
	Upa		0,83*	0,61	0,66		0,74	0,78	
	BiomassaRZ				0,77				
	Urz		0,87*	0,65		0,54	0,86*	0,75	
	SST	-0,87*	-0,50				-0,93**	-0,84*	-0,96**
	FFT	-0,89	0,71				0,78		
	FEH	0,75		-0,57	0,62	-0,65			0,57
	Poli					-0,55			
	Oligo	-0,78	0,55						
	Razão	-0,75	0,51	0,56		0,51			
	Aç Redutor			-0,58		-0,67			

BiomassaPA: biomassa da parte área; Upa: teor umidade da parte aérea, BiomassaRZ: biomassa dos rizóforos; Urz: umidade dos rizóforos; SST: sacarose: sacarose frutossiltransferase; FFT: frutose: frutose frutossiltransferase; FEH: frutano exohidrolase; poli: fruto-polissacarídeos; oligo: fruto-oligossacarídeos; razão: fruto-oligo:fruto-polissacarídeos; aç redutor: açúcar redutor. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Tabela 4 – Coeficiente de correlação entre Usolo, Ψ_{wpa} , Ψ_{wsub} , A e EUA e os parâmetros fisiológicos e bioquímicos de plantas de *Vernonia herbacea* submetidas a diferentes níveis (Controle, 75%, 50% e 25%) de disponibilidade hídrica.

	Usolo		Ψ_{wpa}		Ψ_{wsub}		A		EUA		
	360	720	360	720	360	720	360	720	360	720	
Controle	A	0,79	0,66	0,60							
	T	0,66		0,91**	0,81	-0,97***			0,90**	-0,96**	
	gs		0,58		0,55	-0,59		-0,53	0,99***		
	EUA	-0,58	0,98***	-0,87*		0,98***			0,80*		
	BiomassaPA					0,57	0,58	0,51	-0,74	0,64	
	Upa	-0,93**	-0,64	-0,82*		0,60		-0,95**	-0,41		
	BiomassaRZ						0,95**				
	Urz	-0,52	0,57				-0,52		0,72		
	SST		-0,52				0,58	0,69		0,49	-0,50
	FFT			0,79		-0,95**	-0,68		0,50	-0,99***	
	FEH		-0,88**				-0,73	-0,66	-0,59	-0,60	-0,87**
	Poli	0,83*	0,56	0,89**		-0,79	0,84*	0,80*	0,57	-0,71	0,60
	Oligo		-0,94**	-0,57		0,74	-0,63		-0,48	0,80*	-0,88**
	Razão	-0,74	-0,85*	-0,81*		0,70	-0,67	-0,82*	-0,74	0,63	-0,88**
	Aç Redutor		-0,91**		0,62		-0,64	-0,71		-0,55	-0,82*

Continuação – tabela 4

		Usolo		Ψ_{wpa}		Ψ_{wsub}		A		EUA	
		360	720	360	720	360	720	360	720	360	720
Plantas 75 %	A		0,95**	0,82*	0,96**	-0,78					
	T					-0,86*		0,78	0,53	-0,69	-0,54
	gs	-0,86*		-0,98***				-0,71			
	EUA	0,73	0,68				0,77				
	BiomassaPA					-0,59	-0,79				-0,72
	Upa			0,87*		-0,59	-0,88**	0,96**			-0,82*
	BiomassaRZ					-0,64	-0,56				-0,75
	Urz	0,85*				0,57			-0,59	0,71	
	SST								0,57		
	FFT		0,82*		0,87*				0,71	0,98***	0,77
	FEH	0,59	0,96**		0,89**		0,82*		0,85*	0,73	0,79
	Poli		0,84*	0,68	0,79	-0,51	0,56	0,85*	0,91**	-0,61	
	Oligo	-0,83*		-0,84*		0,51	-0,67	-0,73		-0,51	-0,58
	Razão		-0,72	-0,81*	-0,56	0,78	-0,95	-1,00***	-0,61		-0,61
	Aç Redutor		-0,71	-0,69	-0,62		-0,60	-0,78	-0,78	0,60	

Continuação – tabela 4

		Usolo		Ψ_{wpa}		Ψ_{wsub}		A		EUA	
		360	720	360	720	360	720	360	720	360	720
Plantas 50%	A	0,97***	0,76	0,93**	0,97***						
	T				0,63	-0,90**	-0,63	0,60	0,59		-0,53
	gs	-0,87*		-0,93**	0,68		-0,56	-0,95**	0,65		
	EUA	0,70				0,71	0,83*	0,55			
	BiomassaPA					-0,95**	-0,56				
	Upa		-0,71			0,89**	-0,78			0,81*	
	BiomassaRZ					0,51					0,67
	Urz	0,89**	0,62	0,76				0,74		0,88**	
	SST				-0,60	-0,53	0,69	0,64			0,81*
	FFT	0,94**	0,90**	0,75	0,62		0,70	0,89**	0,58	0,86*	
	FEH	0,82*		0,57		0,56	0,71	0,70		0,98***	0,97***
	Poli			0,56							0,73
	Oligo						-0,71				
	Razão	-0,80*	-0,60	-0,57		-0,62	-0,77	-0,65		-0,99***	-0,96**
	Aç Redutor		-0,62			-0,77				-0,54	

	Usolo		Ψ_{wpa}		Ψ_{wsub}		A		EUA	
	360	720	360	720	360	720	360	720	360	720
	A	0,90**	0,98***	0,84*	0,74	0,56	0,99***			
T	0,94**	0,76		1,00***		0,89**	0,84*	0,82*		
gs	0,97***	0,98***	0,86*	0,81*		0,98***	0,97***	0,99***		
EUA			0,52	-0,84*	0,64					
BiomassaPA		-0,64	0,53		0,59				1,00***	
Upa	0,70		1,00***	0,66			0,53			-0,86*
BiomassaRZ		-0,82*		-0,60		-0,61		-0,69	0,85*	
Urz		0,81*		0,98***	0,96**	0,89**	0,70	0,84*		
SST			0,78	-0,76	0,83*		0,70		0,92**	0,65
FFT	0,91**	0,92**	0,85*	0,85*	0,53	0,87*	1,00***	0,88**		
FEH	0,87		0,66	-0,59	0,63		0,98***			
Poli		-0,80	0,80	-0,99***	-0,63	-0,91**		-0,86*		
Oligo	-0,78	-0,84			-0,54	-0,81	-0,81	-0,86*		-0,59
Razão	-0,86*		-0,96**				-0,70			-0,84
Aç Redutor		-0,76		-0,97***	-0,97***	-0,93**	-0,52	-0,87*		

A: assimilação; T: transpiração; gs: condutância estomática, EUA: eficiência do uso da água; BiomassaPA: biomassa da parte aérea; Upa: teor umidade da parte aérea, BiomassaRZ: biomassa dos rizóforos; Urz: umidade dos rizóforos; SST: sacarose: sacarose frutossiltransferase; FFT: frutose: frutose frutossiltransferase; FEH: frutano exohidrolase; poli: fruto-polissacarídeos; oligo: fruto-oligossacarídeos; razão: fruto-oligo:fruto-polissacarídeos; aç redutor: açúcar redutor. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.