

VANESSA FÁTIMA DE OLIVEIRA

Efeito da atmosfera enriquecida em CO₂ no
crescimento, na alocação de biomassa e no
metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea*
(Vell.) Rusby

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

SÃO PAULO

2007

VANESSA FÁTIMA DE OLIVEIRA

Efeito da atmosfera enriquecida em CO₂ no
crescimento, na alocação de biomassa e no
metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea*
(Vell.) Rusby

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
MESTRE 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 pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Oliveira, Vanessa Fátima de
O48e Efeito da atmosfera enriquecida em CO₂ no crescimento, na alocação de
biomassa e no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby /
Vanessa Fátima de Oliveira -- São Paulo, 2007.
79 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do
Meio Ambiente, 2007
Bibliografia.

1. Cerrado. 2. Inulina. 3. Carboidratos. I. Título

CDU : 581.526.51

Tempo para tudo

“Tudo neste mundo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo propósito debaixo do céu:
há tempo de nascer e tempo de morrer;
tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou;
tempo de matar e tempo de curar;
tempo de derribar e tempo de edificar;
tempo de chorar e tempo de rir;
tempo de prantear e tempo de saltar de alegria;
tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar pedras;
tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar;
tempo de buscar e tempo de perder;
tempo de guardar e tempo de deitar fora;
tempo de rasgar e tempo de coser;
tempo de estar calado e tempo de falar;
tempo de amar e tempo de aborrecer;
tempo de guerra e tempo de paz.”

(Eclesiastes 3: 1-8)

Aos meus pais, Celso e Lúcia, pelo apoio e compreensão ao longo de todos esses anos e por acreditar no meu sonho. Não há nada no mundo que possa pagar o apoio de vocês.

Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Angela Machado de Carvalho pela orientação, confiança, paciência, amizade e principalmente por me incentivar a buscar o conhecimento diariamente.

À Dra. Lillian B.P. Zaidan pela colaboração nas análises de crescimento e sugestões recebidas.

À Dra. Márcia R. Braga pela colaboração nas análises de parede celular e da água de lavagem dos rizóforos e pela leitura crítica desse trabalho.

Ao Dr. Marcos P.M. Aidar pelo uso das câmaras de topo aberto instaladas na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica.

À Msc Amanda Pereira de Souza pela ajuda no uso do aparelho IRGA LICOR 6400 para as medidas de fotossíntese.

À Pós-Graduação do Instituto de Botânica, em especial às coordenadoras Dra. Sonia M.C. Dietrich e Dra. Solange C. Mazzoni-Viveiro, pelas facilidades oferecidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (474674/2004-5).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (05/52290-6) e apoio financeiro aos projetos temáticos (98/05124-8 e 05/04139-7).

Às amigas Aline, Amanda Asega, Amanda Top, Claudinha, Fernanda K., Fernanda M., Kelly e Patrícia Pinho pela amizade e descontração que não se restringiu às paredes do laboratório. São amigas como vocês que levarei para o resto de minha vida. Muito obrigada!

Aos funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica, Ana Alice, Aparecida, Helena e Mary.

Aos companheiros da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica, Amanda de Souza, Cíntia, Cris, Emerson, Fabiano, Fábio, Juliana, Ludmila, Marco Tiné, Mauro Maraba, Marcelino, Marília, Marina, Michelle, Moacir, Paola, Roberta, Rodrigo,

Rodrigo D., Simone, Tatiana, Vanessa Costa e Vanessa Rebouças pelos momentos de alegria e agradável convivência no laboratório.

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

Aos meus amigos que me deram suporte espiritual durante todo o trabalho.

À Deus, pelo suporte nos momentos de fraqueza.

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

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	19
Material Vegetal	19
Análise de Crescimento	21
Trocas gasosas	22
Conteúdo de clorofila	23
Extração enzimática e determinação da atividade enzimática	23
Extração de carboidratos solúveis	25
Análise quantitativa dos carboidratos solúveis	26
Análise qualitativa dos carboidratos solúveis	26
Extração de parede celular	27
Análise de monossacarídeos neutros por HPAEC/PAD	27
Análise da água de lavagem dos rizóforos (Exsudação)	28
Análise dos dados	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
Crescimento e alocação de biomassa	30
Fotossíntese	37
Conteúdo de clorofila	40
Conteúdo de parede celular e celulose	41
Atividades das enzimas SST, FFT, FEH e invertase	45
Conteúdo e produção de frutanos	48
Exsudação de frutanos	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

RESUMO

O seqüestro de carbono, pela fotossíntese, e sua alocação em biomassa são considerados ferramentas para minimizar os efeitos do aumento da concentração de CO₂ atmosférico previstos para este século. Poucos trabalhos relatam o efeito da alta concentração de CO₂ atmosférico em plantas acumuladoras de frutanos, principalmente em órgãos subterrâneos. *Vernonia herbacea*, Asteraceae nativa do cerrado, possui órgãos subterrâneos de reserva (rizóforos) que armazenam frutanos do tipo inulina. Frutanos são polímeros de frutose originados da sacarose, sintetizados por duas enzimas: sacarose: sacarose frutossiltransferase (SST), que catalisa a formação da 1-cestose, e frutano: frutano frutossiltransferase (FFT), responsável pelo alongamento da molécula, e despolimerizados pela frutano-exohidrolase (FEH). O objetivo do presente trabalho foi analisar o efeito da atmosfera enriquecida em CO₂ no crescimento, alocação de biomassa e metabolismo de frutanos em *V. herbacea*. Dois lotes de plantas foram mantidos em câmaras de topo aberto sob ~380 ppm (controle) e ~720 ppm (tratado) de CO₂. Medidas de crescimento, biomassa, fotossíntese, conteúdo e produtividade de frutanos, atividade de SST, FFT, FEH e invertase e análise da água de lavagem dos rizóforos foram realizadas no momento da transferência para as câmaras (T0) e aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias após o início do tratamento. As plantas responderam positivamente à elevada concentração de CO₂, apresentando maior crescimento (40%), maior taxa fotossintética (63%), incremento de biomassa aérea (32%) e, ao final do período de exposição, incremento de biomassa subterrânea (47%). Plantas sob 720 ppm de CO₂ também apresentaram maior atividade de SST (150%), FFT (34%) e invertase (54%) e menor atividade de FEH (-37%) do que plantas controle. As plantas tratadas também apresentaram maior produtividade de frutanos, principalmente de fruto-polissacarídeos (39%). A elevada concentração de CO₂ também promoveu maior exsudação de açúcares pelos rizóforos, sendo detectada pela primeira vez para esta espécie a exsudação de inulina. Considerando as previsões de aumento

do CO₂ atmosférico, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que *V. herbacea* apresenta estratégias para responder favoravelmente a essa alteração ambiental, alocando parte do carbono assimilado para produção de compostos de reserva.

Palavras-chave: inulina, alto [CO₂]_{atm}, vegetação do cerrado

ABSTRACT

Carbon sequestration through photosynthesis and its allocation in biomass are considered tools to minimize the effects of increasing atmospheric CO₂ concentration forecasted for this century. Studies describing the effects of high CO₂ concentrations in plants with fructan metabolism are scarce, especially in plants accumulating fructans in the underground reserve organs. *Vernonia herbacea* (Asteraceae), native of the cerrado vegetation, accumulates inulin-type fructans in the underground reserve organs, the rhizophores. Fructans are fructose-based oligo and polysaccharides synthesized from sucrose by the action of two fructosyltransferases: sucrose:sucrose fructosyltransferase (SST), that catalyses the formation of the trisaccharide 1-kestose and fructan:fructan fructosyltransferase (FFT) that catalyses the reversible transfer of fructosyl units between fructan chains. Fructan depolymerization occurs by action of a fructan exohydrolase (FEH). The aim of the present work was to study the effects of increased CO₂ concentration on growth, biomass allocation and fructan metabolism in *Vernonia herbacea*. The plants were maintained in Open-Top-Chambers (OTCs) for 120 days under ambient (~380 ppm) (Control) and enriched (~720 ppm) (Treated) CO₂ concentrations. Growth, photosynthesis, fructan contents and fructan metabolizing enzyme activities and rhizophore washings were analyzed at the time of transference to OTC (Time 0) and after 15, 30, 60, 90 and 120 days of cultivation. Plants grown under elevated CO₂ presented increases in height (40%), photosynthesis (63%), biomass of aerial (32%) and underground (47%) organs and increased carbohydrate in rhizophore washings. Under elevated CO₂ plants also presented increased SST (150%), FFT (34%) and invertase (54%) activities and lower FEH activity (-37%). Although fructan concentration remained unchanged, fructan productivity was higher in treated plants, due to increased rhizophore biomass. Results indicate that plants of *V. herbacea* can benefit from elevated CO₂

concentrations by increasing growth and allocating part of the fixed carbon for the production of reserve carbohydrates.

Key words: inulin, elevated $[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$, cerrado vegetation

INTRODUÇÃO

Alterações na composição química da atmosfera vêm sendo intensificadas desde o final do século XVIII, devido, principalmente, à queima de combustíveis fósseis, utilizados como fonte de energia, e a mudanças no uso do solo. Amostras de ar fóssil aprisionadas em testemunhas de gelo antártico, mostraram aumento de aproximadamente 25% nos níveis atmosféricos de dióxido de carbono (CO_2), além do aumento nos níveis de metano (CH_3) 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 CO_2 atmosférico realizadas em Mauna Loa, Havaí (EUA), mostraram que entre 1959 e 2002 houve um aumento de 55 ppm (partes por milhão) de CO_2 (Keeling & Whorf 2002 *apud* Körner 2006) (figura 1). Previsões estimam que, em 2075, os níveis atmosféricos de CO_2 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 CO_2 aumentou no período de 1995 a 2005, em média, 1,9 ppm por ano. Em fevereiro de 2007, segundo dados do Laboratório de Pesquisa do Sistema Terra (ESRL 2007), órgão do governo dos Estados Unidos, a concentração de CO_2 atmosférico atingiu o valor de 384 ppm.

Com o intuito de estabelecer as primeiras medidas de controle das emissões de gases causadores do efeito estufa (GEE), 155 países participantes da Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento, realizada no Rio de Janeiro em 1992, assinaram o primeiro acordo internacional (“United Nations Framework Convention on Climate Change” – UNFCCC). Em 1997 foi elaborado o primeiro tratado internacional para a redução dos GEE, o chamado Protocolo de Kyoto, no qual as nações industrializadas comprometiam-se a reduzir, no período de 2008 a 2012, as emissões de GEE em 5%, em relação aos níveis registrados em 1990.

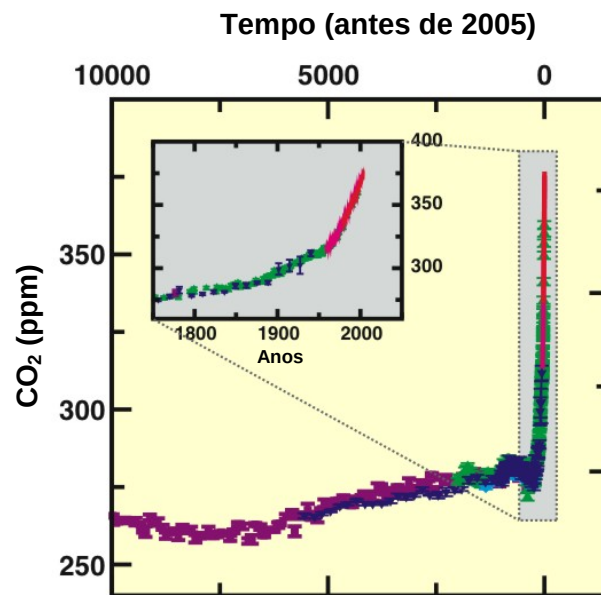


Figura 1. Concentração atmosférica de dióxido de carbono (CO₂) durante os últimos 10.000 anos. No detalhe dados obtidos a partir de 1750. Símbolos de diferentes cores referem-se a dados obtidos de diferentes testemunhas de gelo e a linha rosa refere-se a amostras de ar atmosférico (IPCC 2007, modificado).

Para o cumprimento das metas de corte em emissões de GEE pelos países signatários, faz-se necessária uma mudança significativa em suas matrizes energéticas, substituindo fontes fósseis por renováveis. Por ser uma mudança dispendiosa e de longo prazo, o Protocolo de Kyoto também estabeleceu que as quantidades de gases causadores do efeito estufa re-fixados pelos ecossistemas poderão ser abatidas dos compromissos assumidos pelos países signatários.

Nesse contexto, a busca de alternativas de manejo associadas à manutenção dos ecossistemas e ao sequestro de carbono em ambientes florestais tem sido o objeto de várias pesquisas em ciências ambientais. O sequestro de carbono e sua alocação em biomassa de plantas têm sido considerados ferramentas promissoras para a minimização dos problemas causados pelo efeito estufa (Ceulemans *et al.* 1999, Scarascia-Mugnozza *et al.* 2001, Buckeridge & Aidar 2002, Grace *et al.* 2006).

O sequestro de carbono pelas florestas pode ser quantificado com base na produtividade líquida do ecossistema, ou seja, o quanto de carbono foi fixado em biomassa

vegetal e/ou no solo menos o carbono perdido através da respiração, dano por insetos, fogo e desmatamento (Jarvis 1989, Malhi *et al.* 1999, Stellen *et al.* 1998). Segundo cálculo de Taylor & Lloyd (1992), aplicado em locais livres de distúrbios por fogo e/ou por mudanças no uso do solo, a produtividade primária líquida aumenta com a fertilização com CO₂ e nitrogênio. Esse aumento ocorre porque a respiração heterotrófica é retardada devido ao atraso na decomposição da matéria orgânica, especialmente em ecossistemas que apresentam estoques significativos de carbono.

Grace *et al.* (2006) verificaram que as mudanças ambientais causadas pelo aumento de CO₂ atmosférico causam um aumento na força de dreno proporcional ao tempo de permanência do carbono armazenado na planta e no solo. A partir de dados obtidos na literatura, os autores sugerem que os biomas mais importantes como drenos de carbono são predominantemente florestas e savanas. Os autores, usando o método de Taylor & Lloyd (1992), verificaram que os ecossistemas terrestres são drenos de 2,55 Gt C ano⁻¹, dos quais 0,39 Gt C são atribuídos às savanas tropicais.

As savanas são o maior componente da vegetação mundial, cobrindo um sexto da superfície da Terra, e são responsáveis por 30% da produção primária de toda vegetação terrestre (Grace *et al.* 2006). Cerca de 50% do território africano é coberto por savanas (Menaut 1983, Campbell 1996). Na América do Sul, as savanas, compreendendo o cerrado e os “lhanos”, cobrem cerca de 45% de seu território, estendidas pelo Brasil, Colômbia, Venezuela e Bolívia (Cochrane *et al.* 1985).

A vasta cobertura vegetal das savanas pode contribuir significativamente para o orçamento global de carbono (Hall *et al.* 1995) e ainda, segundo Scurlock & Hall (1998), em termos globais, as savanas podem aumentar o dreno de carbono em cerca de 0,5 Gt C, em resposta ao aumento do CO₂.

Muitas das informações sobre o efeito do aumento do CO₂ atmosférico nas plantas são fornecidas através de estudos realizados com cultivares (Allen 1990). Esse fato é

compreensível considerando o impacto potencial do aumento de CO₂ na produção e qualidade dos alimentos. Entretanto, a partir do final do século passado, inúmeros trabalhos foram publicados sobre o efeito do aumento da concentração de CO₂ atmosférico em diferentes espécies vegetais, em especial arbóreas, mantidas sob diferentes condições de crescimento (Körner & Bazzaz 1996, Pritchard *et al.* 1999, Centritto *et al.* 1999, Poorter & Navas 2003, Körner 2006). Processos importantes vêm sendo estudados em plantas mantidas sob atmosfera enriquecida em CO₂, incluindo a assimilação de carbono, partição, alocação e produção de biomassa, atividade estomática e transpiração.

Segundo Hunt *et al.* (1991), plantas expostas à concentração elevada de CO₂ são, em geral, maiores do que as plantas crescidas em concentração ambiente; a magnitude do estímulo de crescimento é dependente de vários fatores, dentre eles o tipo de mecanismo fotossintético da planta, força do dreno, plasticidade fenológica, estratégia de sobrevivência e adaptação estrutural da planta ao ambiente (Díaz 1995). Poorter & Navas (2003), revisando a literatura sobre o efeito da concentração elevada de CO₂ no crescimento de diversas espécies, verificaram que plantas herbáceas e lenhosas com mecanismo fotossintético do tipo C₃, apresentaram um acréscimo de 45% e 48%, respectivamente, no ganho de biomassa. Estes valores foram superiores aos encontrados em plantas C₄ (12%) e naquelas que apresentam o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) (23%), e demonstram que, em resposta à exposição a níveis elevados de CO₂, o ganho de biomassa é mais fortemente evidenciado em plantas C₃ do que em plantas CAM ou C₄. Demonstram também que as plantas herbáceas e arbóreas não apresentam diferenças significativas quanto ao ganho de biomassa em resposta aos níveis elevados de CO₂.

Estudos sobre alterações nos carboidratos estruturais de plantas submetidas à elevada concentração de CO₂ também são importantes, pois a celulose, um dos principais componentes da parede celular, é considerada um dos compostos de carbono mais abundantes na natureza e seu acúmulo tem sido considerado uma das principais formas de seqüestro de

carbono pelas plantas (Buckeridge & Aidar 2002). Estudando árvores de carvalho, Aranda *et al.* (2006) encontraram diferenças significativas no conteúdo de celulose em folhas, mas não observaram mudanças nos teores de lignina e hemiceluloses. Em folhas de *Arabidopsis* o aumento deste composto em plantas mantidas sob elevado CO₂ foi de 22% (Teng *et al.* 2006).

Uma das possíveis conseqüências do crescimento estimulado pela atmosfera enriquecida de CO₂ é o aumento da necessidade de recursos disponíveis no solo, como água e nutrientes. Se o aumento de CO₂ não for acompanhado por uma maior disponibilidade ou eficiência no uso desses recursos (Hilbert *et al.* 1991, Luo *et al.* 1994), ou ainda, se o crescimento é limitado por outros fatores externos, como baixa irradiância e diferenças na temperatura (Field *et al.* 1992), pode ocorrer uma perda maior do carbono assimilado através da respiração e da exsudação pelo sistema subterrâneo. Hungate *et al.* (1997) verificaram um aumento de 56% na respiração e na exsudação de compostos das raízes de uma espécie de gramínea da Califórnia (EUA) submetida à elevada concentração de CO₂. Em condições normais, em geral, 5 a 21% de todo o carbono fixado pela fotossíntese é exsudado pelas raízes na forma de aminoácidos e carboidratos (Marschener 1995).

Vegetais superiores empregam diferentes estratégias para explorar ambientes específicos e, dentre estas, apresentam variações nas formas do carbono fixado. A vegetação herbácea do cerrado, por exemplo, caracteriza-se pela presença de numerosas espécies portadoras de órgãos subterrâneos espessados que acumulam carboidratos utilizados como substâncias de reserva pelas plantas (Dietrich & Figueiredo-Ribeiro 1985, Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1986). Os frutanos, carboidratos de reserva amplamente distribuídos entre as Asteraceae, são acumulados em 60% das espécies dessa família ocorrentes em uma área de cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu, São Paulo (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro 1993).

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 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 cadeiras 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*).

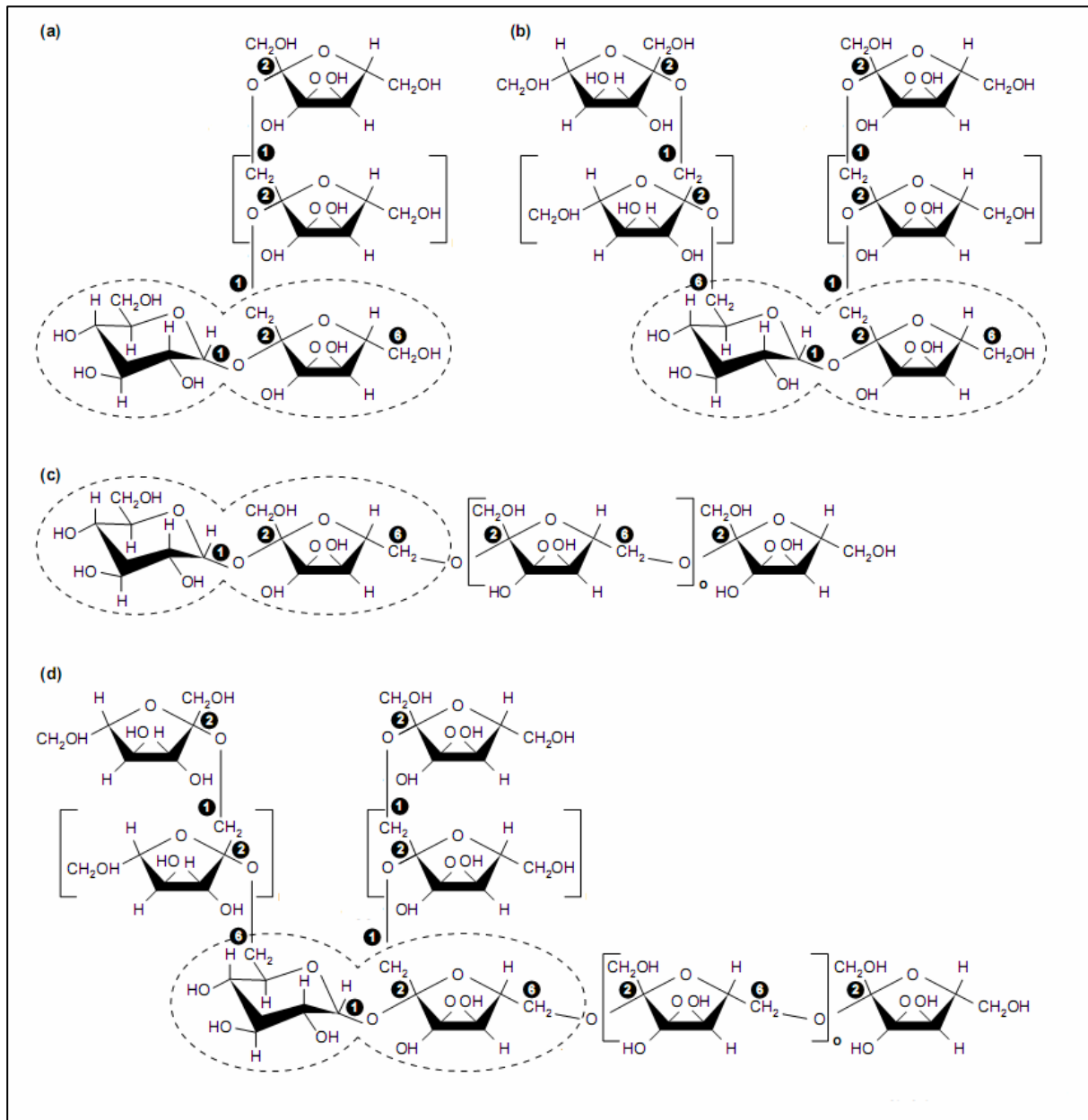
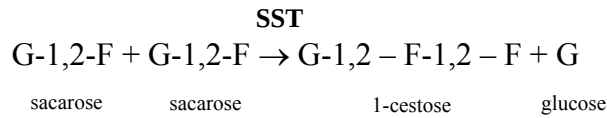
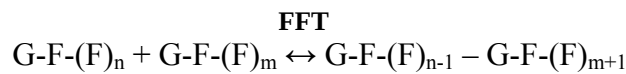


Figura 2. Exemplos de diferentes tipos de frutanos. (a) inulina, (b) neoserie de inulina, (c) levano e (d) levano misto. A molécula de sacarose está circulada (Ritsema & Smeekens 2003, modificado).

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.

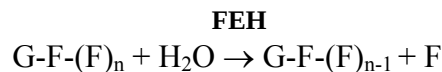


A outra frutossiltransferase envolvida na síntese de frutanos é a 1-FFT (frutano:frutano 1-frutossiltransferase, EC 2.4.1.100), responsável pelo alongamento da cadeia de frutanos, catalisando a transferência reversível de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora. Nesta 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 sequencial 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).

Uma vez que a sacarose é o dissacarídeo que dá origem aos frutanos, no estudo do metabolismo destes carboidratos deve-se considerar a ação da enzima invertase (E.C. 3.2.1.26), que hidrolisa a sacarose e libera glucose e frutose.

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 fluido 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 & Dietrich 1993, 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, Person & 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 2007) 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, portanto, 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, prevenindo a 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 da 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 2006).

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 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 triglicerídeo 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 nativa do 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 (Hayashi & Appezatto-da-Glória 2005), e também atuam como órgãos de reserva da planta (Carvalho & Dietrich 1993).

O gênero *Vernonia* compreende 5% das espécies da família Asteraceae em área restrita do cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, SP, Brasil. Nessa região, Asteraceae é a família mais representativa em gêneros e espécies, constituindo aproximadamente 17% da flora de angiospermas. A presença de espécies do gênero *Vernonia* também já foi relatada na Reserva Estadual Pé-do-Gigante, em Santa Rita do Passa Quatro, SP, Brasil (Batalha & Mantovani 2000). Das espécies de *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).

Além da sua ocorrência em plantas do cerrado, o metabolismo de frutanos também está presente em fungos do solo. Cordeiro Neto *et al.* (1997), analisando a microbiota da rizosfera de plantas de *V. herbacea* coletada na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, verificaram que 82% dos fungos isolados são capazes de hidrolisar inulina. Dentre eles, *Penicillium janczewskii*, um fungo filamentosos, apresentou elevada atividade de inulinase extracelular quando crescido em meio de cultura contendo inulina como fonte de carbono (Pessoni *et al.* 1999). Os autores sugeriram que os órgãos subterrâneos desta espécie podem exsudar inulina e exercer assim influência sobre a microbiota associada à rizosfera. Entretanto, a ocorrência da atividade inulinásica observada *in vitro* não foi investigada na própria rizosfera, e pouco se sabe sobre a exsudação de frutanos por órgãos subterrâneos de reserva.

Embora ainda não seja cultivada com fins comerciais, *V. herbacea* apresenta potencial para a produção de inulina. Neste sentido, aspectos do crescimento da planta e da alocação de

biomassa, associados à nutrição mineral nestas plantas, têm sido investigados com o objetivo de aumentar a biomassa de rizóforos e, conseqüentemente, a produção de inulina.

A produção de inulina por plantas de *V. herbacea* cultivadas em uma área do cerrado atingiu 0,522 t ha⁻¹ após dois anos de cultivo (Carvalho et al 1998). Por outro lado, o tratamento com nitrogênio promoveu um aumento de 70% na produção de inulina em relação ao controle, e abreviou o tempo de colheita para um ano, tendo sido estimada uma produção de 0,5 t ha⁻¹ (Cuzzuol et al 2003).



Figura 3. Aspecto geral de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby.

Estudos sobre o efeito do CO₂ no acúmulo de frutanos são escassos na literatura, e a maioria destes foi realizada com gramíneas de regiões temperadas. Dentre estes, Isopp *et al.* (2000) verificaram que plantas de *Lolium perenne* crescidas sob concentrações elevadas de CO₂ apresentaram aumento no conteúdo de carboidratos não-estruturais nas folhas, em especial de frutanos. Resultado semelhante havia sido observado em trigo e *Poa alpina* L. (Smart *et al.* 1994, Baxter *et al.* 1997, Sild *et al.* 1999). Em batata, Miglietta *et al.* (1998) demonstraram que o aumento da concentração de CO₂ promoveu aumento da biomassa subterrânea, devido especialmente ao crescimento de novos tubérculos.

Um experimento preliminar com plantas de *V. herbacea* demonstrou que, após 30 dias de exposição à atmosfera enriquecida em CO₂, houve uma tendência de maior alocação de biomassa nos órgãos subterrâneos, bem como de aumento na concentração de frutanos, principalmente de fruto-polissacarídeos, tanto nos rizóforos iniciais (fragmentos de rizóforos para obtenção das plantas) como nos rizóforos novos. Esses resultados sugeriram que nas plantas crescidas sob alto CO₂, ocorreu maior disponibilização de carbono para a biossíntese de frutanos.

Considerando a representatividade das espécies de asteráceas acumuladoras de frutanos na flora herbácea nativa do cerrado, o estudo sobre o efeito da atmosfera enriquecida de CO₂ em plantas de *V. herbacea* poderá contribuir para a compreensão dos impactos do aumento da concentração de CO₂, previsto para esse século, nesse tipo de vegetação.

OBJETIVO

Tendo em vista os elevados teores de frutanos em rizóforos de *V. herbacea* e sua possível aplicação na indústria, a ampla ocorrência de espécies acumuladoras desses polímeros no cerrado, a previsão de aumento da concentração de CO₂ atmosférico, conforme estudos recentes, e a escassez de estudos sobre o efeito do CO₂ no acúmulo de carboidratos em órgãos subterrâneos de reserva, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da atmosfera enriquecida em CO₂ no crescimento, na alocação de biomassa e no metabolismo de frutanos nessas plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (SP 169567) foram obtidas por propagação vegetativa a partir de fragmentos de rizóforos de plantas adultas, coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji Guaçu, São Paulo (22°35'S e 47°44'W), em setembro de 2005. Os fragmentos de rizóforos, medindo aproximadamente 3 cm de comprimento, foram plantados em bandejas plásticas contendo terra de canteiro. Após 60 dias, as plantas obtidas foram transferidas para vasos de 3 L de capacidade contendo terra de canteiro, em número de três por vaso.

Após o plantio, os vasos foram separados em dois lotes e distribuídos 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 4) e instaladas na Casa de Vegetação da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica. Um dos lotes de plantas (controle) foi mantido sob uma atmosfera aproximada de 380 ppm de CO₂, enquanto o outro lote (tratado) foi submetido à atmosfera de aproximadamente de 720 ppm de CO₂, através de injeção deste gás a partir de um cilindro acoplado ao sistema. As concentrações do gás no interior das câmaras foram monitoradas a cada três dias com um medidor de CO₂ modelo Testo 535.

Semanalmente, cada vaso recebia 100 mL de solução nutritiva *Vernonia*, conforme Cuzzuol *et al* (2005). Nesta ocasião, era realizada a redistribuição dos vasos dentro das câmaras, de forma a ser evitada a aclimatação das plantas ao microambiente. Quando necessário, as plantas eram regadas com água destilada para evitar o dessecamento.

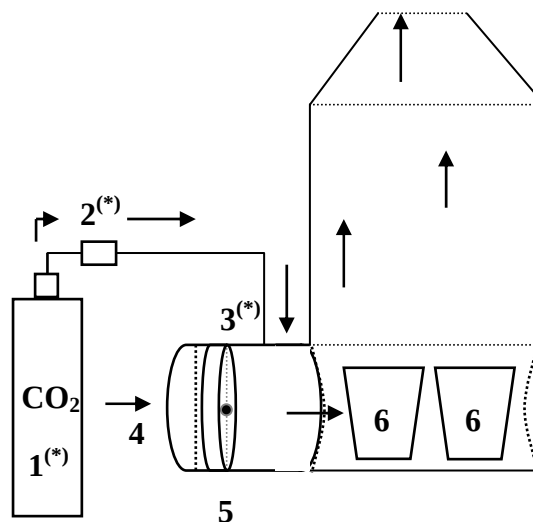
A**B**

Figura 4. **(A)** Esquema da câmara de topo aberto: 1 - Cilindro de gás de CO₂, 2- Válvula de regulação, 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)** Em primeiro plano, câmara contendo plantas de *V. herbacea* mantidas em elevada concentração atmosférica de CO₂; ao fundo, o lote de plantas em atmosfera ambiente.

As medidas de crescimento, de fotossíntese e as coletas de material para extração de carboidratos, enzimas e clorofila foram realizadas no momento da transferência para as câmaras (tempo 0) e aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias após o início do tratamento. Os rizóforos das plantas coletadas foram lavados, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até a realização das análises bioquímicas. Em cada ponto de amostragem foram coletadas 15 plantas do grupo controle e 15 do tratado. As extrações de carboidratos e enzimas foram realizadas em triplicatas, e cada amostra composta aleatoriamente por 5 plantas.

Análise de Crescimento

Em cada ponto de amostragem foram determinados comprimento do ramo, número de folhas, área foliar, massa de matéria fresca e seca dos órgãos aéreos (caule e folhas, separadamente) e dos órgãos subterrâneos (rizóforos e raízes, separadamente). A massa seca dos órgãos aéreos e das raízes foi determinada após secagem do material em estufa a 60°C até massa constante, enquanto a dos rizóforos foi determinada após liofilização do material. A área foliar foi estimada pela equação $y = 0,2737x + 0,7158$, onde x equivale ao produto das medidas de comprimento e largura das folhas, e a variável independente é o retângulo circunscrito à folha com o coeficiente de correlação de 0,9658, previamente determinado para a espécie estudada (Carvalho *et al.* 1997). A partir desses dados, utilizando o programa desenvolvido por Hunt *et al.* (2002), foram calculadas as taxas de crescimento relativo (TCR) e a razão de área foliar (RAF), utilizando as seguintes equações:

$$TCR = (LnM_2 - LnM_1) / (t_1 - t_2),$$

onde

Ln é o logaritmo natural, M_2 é a massa seca atual, M_1 é a massa seca da medida anterior e $t_2 - t_1$ é o intervalo de tempo entre as duas medidas e

$$RAF = (A_f \times M_{\text{planta}}),$$

onde

A_f corresponde à área foliar total e M_{planta} à massa seca total da planta.

A razão do peso da folha (RPF) foi calculada segundo Hunt (1982), utilizando a seguinte equação

$$RPF = M_{\text{folha}} / M_{\text{planta}},$$

onde

M_{folha} corresponde à massa seca foliar total e M_{planta} à massa seca total da planta. A taxa de assimilação líquida (TAL) foi calculada pela equação descrita por Williams (1946):

$$TAL = [(LnA_2 - LnA_1) / (A_2 - A_1)] \cdot [(M_2 - M_1) / (t_2 - t_1)],$$

onde

Ln é o logaritmo natural, A_2 é a área foliar atual, A_1 é a área foliar da medida anterior, M_2 é a massa seca atual, M_1 é a massa seca da medida anterior e $t_2 - t_1$ é o intervalo de tempo entre as duas medidas.

As razões rizóforo:parte aérea (R:PA) e parte subterrânea:parte aérea (PS:PA) foram calculadas como a massa seca do rizóforo, ou a massa seca da parte subterrânea (rizóforo e raiz), dividida pela massa seca da parte aérea de cada planta.

Trocas gasosas

As taxas de assimilação líquida de CO_2 e de transpiração e a condutância estomática foram medidas na primeira folha totalmente expandida de cada planta, a partir do ápice, utilizando-se um aparelho analisador de gás no infravermelho (IRGA; Li-Cor 6400), acoplado a uma câmara que permite o controle de luz, temperatura e concentração de CO_2 . A avaliação foi feita a partir de medidas pontuais sob intensidade luminosa de $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, entre 9 e 12 horas (Cuzzuol 2003). A concentração de CO_2 dentro da câmara foi de 360 ppm ou de 720 ppm, de acordo com o tratamento da planta em análise.

As equações para calcular a taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), a taxa de transpiração (T) e a condutância estomática seguem Caemmerer & Farquhar (1981). A eficiência do uso da água (EUA) foi calculada como a relação entre a taxa de assimilação líquida dividida pela taxa de transpiração ($EUA = A / T$).

Conteúdo de clorofila

Dois discos foliares de 1,4 cm de diâmetro cada foram retirados da região central da primeira folha apical completamente expandida. Um disco foi macerado em solução acetônica a 80% e o outro utilizado para a determinação da massa de matéria seca após secagem em estufa a 60°C até massa constante. A extração dos pigmentos de clorofila foi realizada sob baixa temperatura e luminosidade para impedir sua degradação pela luz ou por ação enzimática. O extrato foi centrifugado a 600 g por 5 min e as leituras de densidade óptica foram realizadas, sob penumbra, em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645 nm (clorofila *b*) e 663 nm (clorofila *a*). O conteúdo de clorofila foi calculado pela equação apresentada por Lichtenthaler & Wellburn (1983):

$$\text{Clorofila } a = (12,25.A_{663} - 2,79A_{645}) \cdot (V/(1000.M))$$

$$\text{Clorofila } b = (21,50.A_{645} - 2,79A_{663}) \cdot (V/(1000.M))$$

$$\text{Clorofila } a+b = (7,14.A_{663} - 18,71A_{645}) \cdot (V/(1000.M)),$$

onde

A é a absorbância, **V** é o volume da amostra (mL) e **M** é a massa seca do disco foliar (em g).

Extração enzimática e determinação da atividade enzimática

As extrações e a determinação das atividades enzimáticas foram realizadas com base na metodologia descrita por Asega & Carvalho (2004). Amostras de rizóforos previamente congeladas foram pulverizadas em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo, e

homogeneizadas em tampão citrato-fosfato (Mc Ilvaine) 50 mM, pH 5,5, contendo 2 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 5 mM de ácido ascórbico, 2 mM de β -mercaptoetanol e 10% de polivinil polipirrolidona (PVPP), na proporção de 1:3 (p/v). O homogeneizado foi mantido em repouso por uma hora e, em seguida, filtrado em tecido de náilon duplo. O filtrado foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 20% de saturação e mantido em repouso por uma noite. Em seguida foi centrifugado por 20 min a 12.000 *g* e o sobrenadante foi submetido à precipitação com sulfato de amônio a 80% de saturação e mantido em repouso por uma hora. Após centrifugação por 20 min a 17.000 *g*, o precipitado, constituído principalmente de proteínas, foi ressuspendido em tampão de extração na proporção de 10 g de massa fresca inicial por mL e submetido à dessalinização em colunas de Bio Gel P-6 DG, equilibradas com o mesmo tampão. Toda a manipulação do material durante a extração enzimática foi realizada a 5°C.

O conteúdo de proteína dos extratos enzimáticos dessalinizados foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

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 4,5. Os extratos foram incubados a 30°C utilizando-se substratos nas concentrações finais de 200 mM de sacarose (Sigma®) para a atividade de SST, 50 mM de sacarose (Sigma®) para a atividade de invertase, 200 mM de 1-cestose para a atividade de FFT e 5% de inulina de *Helianthus tuberosus* (Sigma®) para a atividade de FEH. O tempo de incubação foi de 1 h para as atividades da SST e da FFT, 4 h para a atividade da invertase e de 30 min para a atividade da FEH.

Para a determinação das atividades da SST e da FFT, amostras das misturas de incubação foram diluídas 200X em água deionizada e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução e detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex modelo DX-300, usando coluna CarboPac PA-1 (4 X 250 mm). A eluição dos

carboidratos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio) na seguinte programação: 0 – 2 min, 25 mM; 2,1 – 8 min, 50 mM; 8,1 – 10 min, 350 mM; 10,1 – 12 min, 500 mM; 12,1 – 17 min, 25 mM. Os potenciais aplicados para E1 (480 ms), E2 (180 ms) e E3 (360 ms) foram 0,05, 0,75 e -0,20, respectivamente, e o fluxo aplicado foi de 1 mL min⁻¹. As atividades da SST e da FFT foram determinadas pelas áreas dos picos da 1-cestose e da nistose, respectivamente, utilizando-se padrões externos. A atividade de FEH foi determinada pela quantidade de frutose liberada na mistura de incubação, por quantificação do açúcar redutor (Somogyi 1945), utilizando frutose (Sigma®) como padrão.

Para a determinação da atividade da invertase, as misturas de incubação foram diluídas 100X em água deionizada e analisadas por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo DX-300, utilizando-se coluna CarboPac PA-1 (4 X 250 mm) e programa isocrático de 100 mM de hidróxido de sódio. Os potenciais aplicados para E1 (480 ms), E2 (180 ms) e E3 (360 ms) foram 0,05, 0,75 e -0,20, respectivamente, e o fluxo aplicado foi de 1 mL min⁻¹. A atividade de invertase foi determinada pela área do pico da frutose, utilizando-se padrão externo.

Extração de carboidratos solúveis

Amostras de rizóforos previamente congeladas em nitrogênio líquido foram liofilizadas até a secura, pulverizadas em almofariz e submetidas à fervura por 5 min em etanol 80% para inativação das enzimas. Em seguida, os homogeneizados foram mantidos em banho-maria a 80°C por 15 min e centrifugados por 15 min a 1000 g, em temperatura ambiente. Os precipitados foram re-extraídos mais duas vezes em etanol 80%, a 80°C. Os resíduos finais foram submetidos duas vezes à extração em água por 30 min a 60°C e filtrados a vácuo em tecido de algodão. Os sobrenadantes da extração etanólica e os filtrados foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório a 40°C. O extrato final de frutanos totais foi submetido à precipitação a frio com três volumes de etanol comercial, para separação das

frações de fruto -oligo e -polissacarídeos. A seguir, foram centrifugados a 700 g por 20 min a 5°C. Os precipitados foram ressuspensos em água e constituíram as frações de fruto-polissacarídeos, e os sobrenadantes foram concentrados em evaporador rotatório a 40°C até eliminação do etanol e constituíram as frações de fruto-oligossacarídeos (Carvalho *et al.* 1998).

Análise quantitativa dos carboidratos solúveis

O conteúdo de frutanos foi estimado pelo teor de frutose total nas frações de fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos separadamente, pelo método de antrona modificado, específico para cetoses (Jermyn 1956), utilizando-se frutose (200 µg mL⁻¹) como padrão.

Análise qualitativa dos carboidratos solúveis

A análise qualitativa foi realizada nos extratos de frutanos totais e nas frações de fruto-oligossacarídeos. Amostras constituídas de alíquotas equivalentes de cada uma das três replicatas foram submetidas à deionização em colunas de troca iônica (10 X 1) contendo resinas nas formas catiônicas (Dowex 50 X 40 X 200) e aniônica (Dowex 1 X 8 – 200) (Carvalho & Dietrich 1993). Em seguida foram filtradas em membranas de 0,45 µm e analisadas por cromatografia de troca aniônica de alta resolução com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex modelo ICS 3000 utilizando coluna CarboPac PA1 (2 X 250 mm). Os fruto-oligossacarídeos foram analisados na concentração de 400 µg mL⁻¹ e os frutanos totais, na concentração de 4 mg mL⁻¹, em equivalentes de frutose. O gradiente para separação dos componentes da série homóloga da inulina foi estabelecido misturando-se o eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio) na seguinte programação: 0 – 2 min, 25 mM; 2,1 – 8 min, 50 mM; 8,1 – 28 min, 350 mM; 28,1 – 30 min, 500 mM; 30,1 – 35 min, 25 mM. Os

potenciais aplicados ao PAD para 0 - 0,2 s, 0,41 - 0,6 s, 0,61 - 1 s foram de 0,05, 0,75 e -0,15, respectivamente. O fluxo aplicado foi de 0,250 mL min⁻¹.

Extração de parede celular

A extração da parede celular foi realizada com base na metodologia descrita por Braga *et al.* (1998). Os resíduos obtidos após a extração aquosa de carboidratos dos rizóforos foram pesados e homogeneizados em tampão fosfato de potássio 500 mM, pH 7,0 a 5°C. Após centrifugação a 1000 g, por 5 min, o resíduo foi recolhido e sequencialmente lavado duas vezes com água destilada gelada, duas vezes com clorofórmio:metanol (1:1 v/v), três vezes com acetona e três vezes com éter etílico. Após as lavagens, o resíduo do material foi levado à estufa por 24 h, a 50°C, para secagem. Esse material foi considerado como paredes celulares brutas, sendo seu rendimento estimado por gravimetria, em relação à massa inicial de rizóforos.

Análise de monossacarídeos neutros por HPAEC/PAD

Cinco miligramas da parede celular bruta foram incubados com 50 µL de ácido sulfúrico 72%, por 30 min a 30°C. O ácido foi diluído a 4% com água destilada e autoclavado por 1 h a 121°C. Após neutralização com hidróxido de sódio o material foi centrifugado a 1000 g, por 5 min e o sobrenadante foi liofilizado e solubilizado em água destilada. Os monossacarídeos neutros obtidos após a hidrólise foram analisados por HPAEC/PAD em sistema Dionex modelo ICS 3000, utilizando coluna CarboPac PA-1 e programa isocrático de 9 mM de hidróxido de sódio. Os potenciais aplicados ao PAD para 0 - 0,2 s, 0,41 - 0,6 s, 0,61 - 1 s foram de 0,05, 0,75 e -0,15, respectivamente. O fluxo aplicado foi de 0,25 mL min⁻¹. Os perfis foram identificados através da comparação com os tempos de retenção de padrões de monossacarídeos comerciais.

Análise da água de lavagem dos rizóforos (Exsudação)

Após a retirada das plantas dos vasos, os rizóforos e a terra aderida a eles foram lavados com água destilada com o auxílio de uma piseta. A água de lavagem foi filtrada em papel de filtro para a remoção da terra, liofilizada, e o material obtido foi solubilizado em 2 mL de água deionizada. O conteúdo de frutanos foi estimado pelo teor de frutose total pelo método de antrona modificado, específico para cetoses (Jermyn 1956), utilizando-se frutose ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) como padrão. As análises foram feitas em triplicata e cada amostra representou a água de lavagem de 3 plantas retiradas do mesmo vaso.

Amostras na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, em equivalentes de frutose, foram analisadas em HPAEC/PAD, sistema Dionex modelo ICS 3000 O gradiente foi estabelecido misturando-se o 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, 25 mM; 2,1 – 8 min, 50 mM; 8,1 – 28 min, 350 mM; 28,1 – 30 min, 500 mM; 30,1 – 35 min, 25 mM. Os potenciais aplicados ao PAD para 0 - 0,2 s, 0,41 – 0,6 s, 0,61 – 1 s foram 0,05, 0,75 e - 0,15, respectivamente. O fluxo aplicado foi de $0,25 \text{ mL min}^{-1}$.

Análise dos dados

Para a análise dos dados foi utilizada a estatística descritiva, calculando-se o erro padrão entre as médias obtidas. Os dados de crescimento, biomassa, fotossíntese e produção de frutanos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Todo e qualquer contraste entre as médias foram avaliados pelo teste t de Student em níveis de significância de 5, 1 ou 0,1% de probabilidade. Foi utilizado o pacote estatístico *WinSTAT for Excel*, versão 2001.1, Robert Fish.

O efeito do tratamento em elevada concentração de CO_2 foi calculado em porcentagem, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Efeito CO}_2 (\%) = \frac{(\mu_{\text{elevado}} \times 100)}{\mu_{\text{ambiente}}} - 100,$$

onde

μ_{elevado} é o valor obtido nas plantas submetidas à atmosfera enriquecida e μ_{ambiente} é o valor obtido pelas plantas mantidas sob atmosfera ambiente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento e alocação de biomassa

As plantas submetidas à atmosfera enriquecida em CO₂ apresentaram, em geral, maiores comprimentos do ramo quando comparadas às plantas controle (figura 5). Os valores obtidos nas plantas tratadas já foram maiores desde o início do tratamento, cerca de 32% aos 15 dias, atingindo a diferença máxima de 40%, aos 90 dias de tratamento. Resultado semelhante foi observado por Poorter (1993) em um levantamento na literatura entre 156 espécies vegetais, no qual as espécies tratadas apresentaram alturas 37% maiores do que as plantas controle.

Nos primeiros 30 dias de tratamento, o número de folhas não foi diferente entre as plantas tratadas e controle (figura 5). Entretanto, aos 60 e 90 dias, as plantas tratadas apresentaram valores 22% maiores que os obtidos nas plantas mantidas em atmosfera ambiente. Aos 120 dias, as plantas controle apresentaram valores superiores aos das plantas tratadas. Esse resultado é consequência da perda de folhas das plantas submetidas à atmosfera enriquecida em CO₂, não observada nas plantas controle.

Com relação à área foliar, as folhas das plantas mantidas a 720 ppm de CO₂ apresentaram, em geral, valores mais elevados quando comparadas às plantas mantidas em atmosfera ambiente. Esse resultado refletiu, juntamente com os obtidos em números de folhas, em maior área foliar total das plantas tratadas, principalmente ao final do tratamento, quando esse valor foi 26% maior do que o encontrado nas plantas controle (figura 5). O aumento na área foliar em plantas submetidas a concentrações elevadas de CO₂ pode ser atribuído a mudanças nas características anatômicas foliares como maior quantidade de células (Taylor *et al.* 1994, Gardner *et al.* 1995), ao aumento de tamanho da célula (Ferris & Taylor 1994) ou à combinação de ambos (Ranasinghe & Taylor 1996).

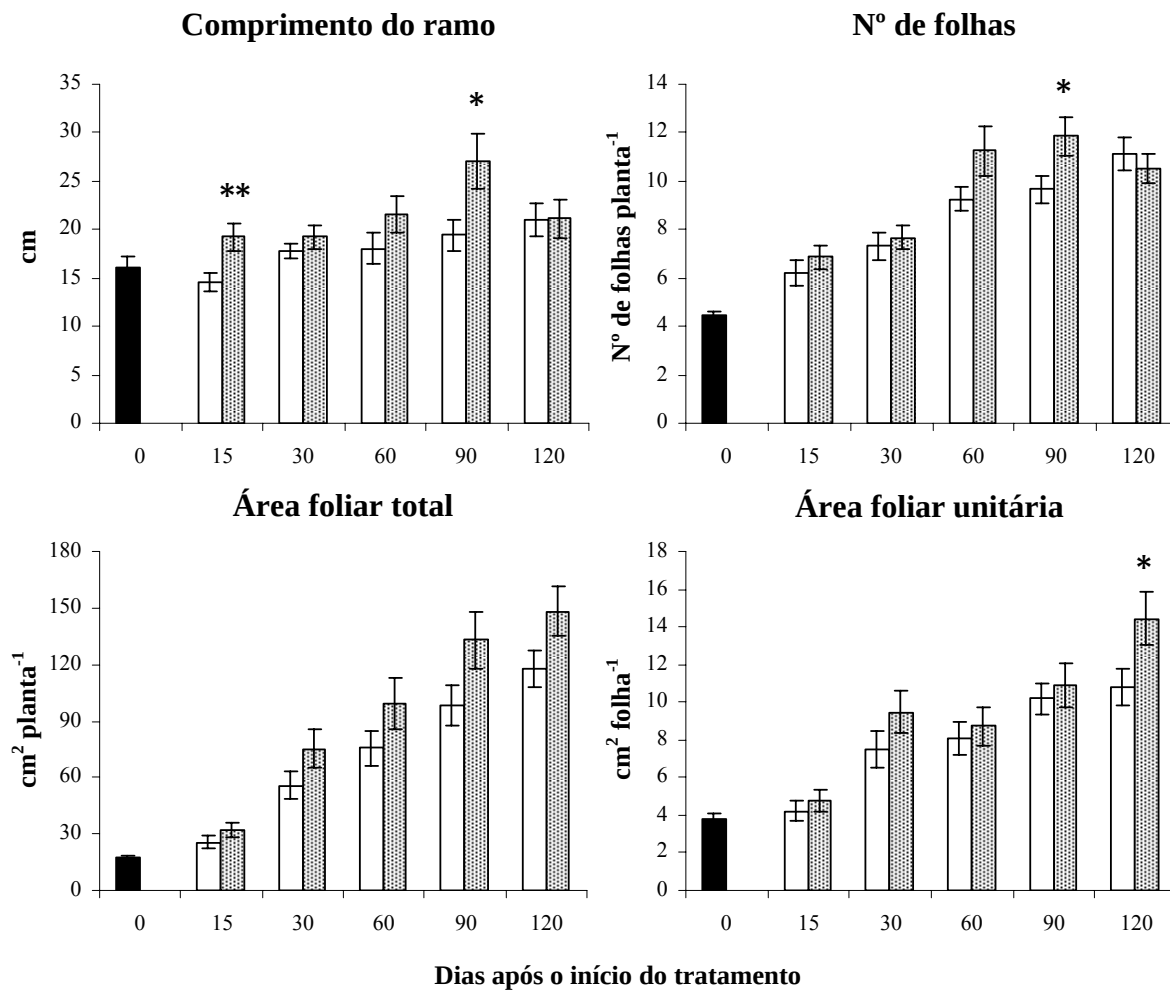


Figura 5. Comprimento do ramo, número de folhas, área foliar total e área foliar unitária de plantas mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm □) e elevada (~720 ppm ■) de CO₂ por 0 (■), 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Os valores representam a média de 15 plantas e as barras indicam ± o erro padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Alterações na altura, número de folhas, área foliar individual e área foliar total são comuns em estudos sobre o efeito do elevado CO₂ nas plantas. Pritchard *et al.* (1999), revisando a literatura sobre o efeito da concentração elevada de CO₂ atmosférico no crescimento vegetal, verificaram que 58% das espécies analisadas apresentaram aumento na área foliar individual e que dentre estas, as herbáceas selvagens, não cultivadas, exibiram um aumento de 15% na área foliar, inferior, portanto, ao verificado no presente estudo com plantas de *V. herbacea*.

Os valores de massa seca da parte aérea (caule e folhas) foram mais elevados durante todo o período de cultivo em plantas submetidas à atmosfera enriquecida de CO₂ (figura 6), e apresentou diferenças significativas entre o tratado e o controle aos 90 e 120 dias.

Observa-se que não houve diferença na massa seca dos rizóforos entre as plantas tratadas e controle até os 60 dias de experimento (figura 6). Entretanto, aos 90 e 120 dias, as plantas tratadas apresentaram um aumento na biomassa desse órgão que, aos 120 dias, foi 47% maior do que o encontrado nas plantas controle. O ganho de biomassa verificado em plantas de *V. herbacea* foi, portanto, maior que o encontrado para a biomassa dos órgãos subterrâneos de beterraba (26%) (Demmers-Derks *et al.* 1998) e cenoura (19%) (Wheeler *et al.* 1994) cultivadas sob alto CO₂.

A biomassa de raízes foi baixa até os 30 dias, aumentando em ambos os grupos de plantas a partir dos 60 dias, porém, mais acentuadamente nas plantas tratadas. Nestas, a biomassa de raízes foi significativamente mais elevada aos 120 dias.

Quando avaliados os valores de biomassa seca da planta inteira, observou-se claramente que ambos os lotes de plantas apresentaram um ganho de biomassa durante o período do experimento compatível com o crescimento das plantas. Até os 60 dias, não houve diferenças significativas entre a biomassa de plantas tratadas e controle. Entretanto, a partir dos 90 dias as plantas tratadas passaram a apresentar diferenças significativas de biomassa, atingindo, aos 120 dias, um valor 42% mais elevado do que o encontrado nas plantas controle.

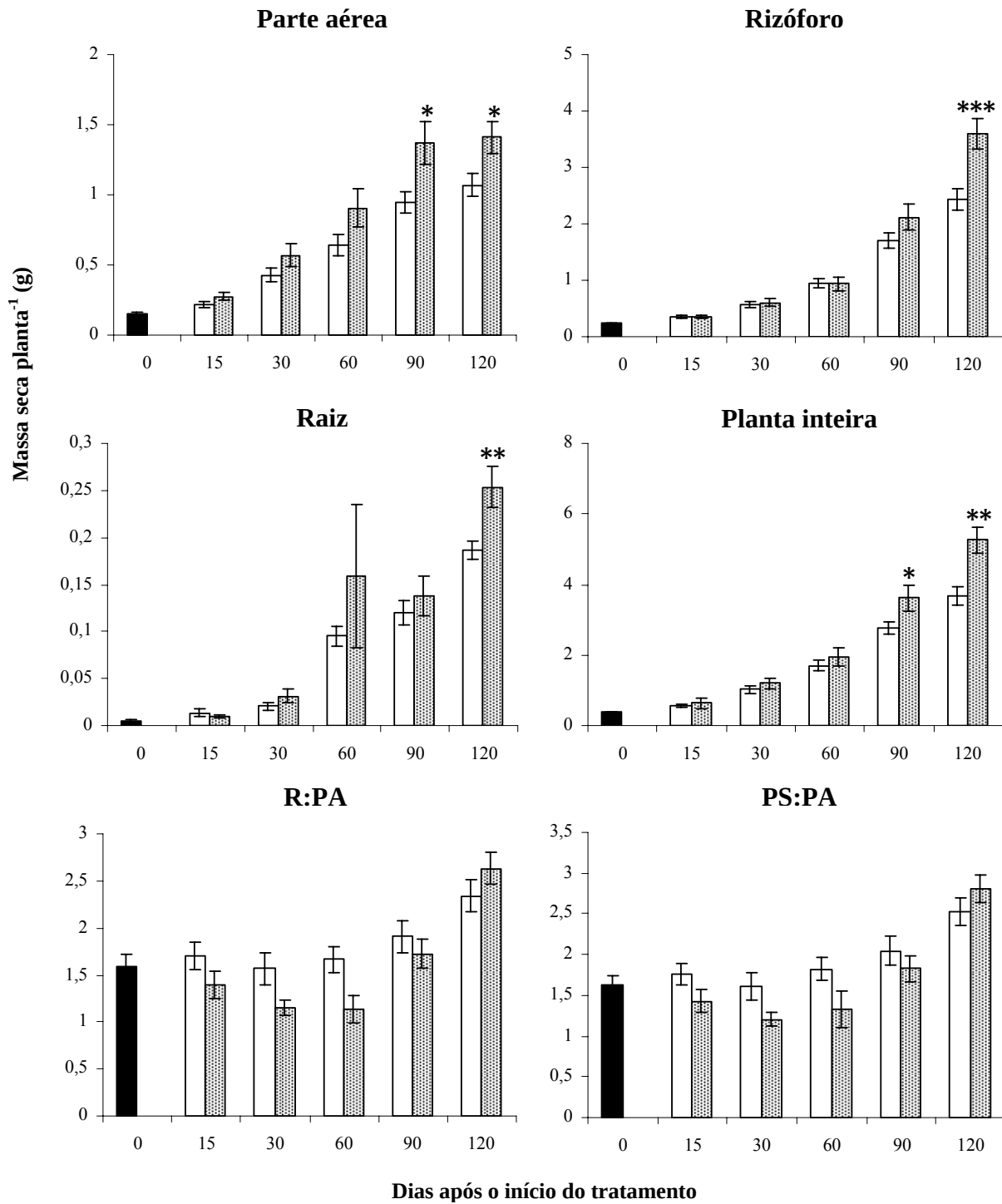


Figura 6. Variações na biomassa seca e nas razões rizóforo:parte aérea (R:PA) e parte subterrânea total:parte aérea (PS:PA) de plantas mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm □) e elevada (~720 ppm ■) de CO₂ por 0 (■), 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Os valores representam a média de 15 plantas e as barras indicam $\pm$ o erro padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

A razão rizóforo:parte aérea (R:PA), bem como a razão parte subterrânea total:parte aérea (PS:PA) foram superiores a 1,0 em todo o período experimental, refletindo valores de biomassa subterrânea mais elevados que os de órgãos aéreos. Observou-se também que essas razões foram maiores nas plantas controle do que nas plantas tratadas (figura 6). Entretanto, aos 120 dias, as duas razões foram maiores nas plantas tratadas do que nas plantas mantidas em atmosfera ambiente de CO₂, refletindo o maior ganho de biomassa subterrânea em relação à biomassa aérea. Relatos sobre alterações na PS:PA em plantas expostas à elevada concentração de CO₂ são freqüentemente encontrados na literatura e demonstram mudança na relação fonte - dreno entre esses órgãos sob essa condição ambiental (Pritchard *et al.* 1999).

Os resultados obtidos demonstraram claramente um maior acúmulo de biomassa nos órgãos subterrâneos de reserva em plantas submetidas à atmosfera enriquecida de CO₂ após 90 dias de tratamento. Resultado semelhante foi observado por Miglietta *et al.* (1998), que detectaram maior alocação de biomassa na parte subterrânea em plantas de *Solanum tuberosum* L. submetidas a altas concentrações de CO₂ devido, principalmente ao aumento do número de tubérculos. Segundo Jang & Sheen (1994), o aumento do suprimento de sacarose para a planta, observado sob elevado CO₂, favorece o aumento da capacidade de iniciação, crescimento e respiração de órgãos drenos, através do aumento da expressão de genes relacionados a esses processos. Em *V. herbacea* crescimento superior dos rizóforos de plantas tratadas é demonstrado exclusivamente pelo aumento de sua biomassa e volume, diferentemente da batata, que apresenta vários tubérculos em uma só planta e que, portanto, apresenta aumento de biomassa e número de tubérculos sob alto CO₂.

A taxa de crescimento relativo (TCR), que representa o incremento da massa de matéria seca em um dado período (figura 7), foi mais elevada nas plantas mantidas sob atmosfera enriquecida de CO₂, no início (0 - 15 dias) e nos dois últimos períodos de tratamento (60 - 90 e 90 - 120 dias).

A taxa de assimilação líquida (TAL), que expressa a eficiência fotossintética em termos de incremento de massa de matéria seca total produzida por área foliar e por unidade de tempo é apresentada na figura 7. Como a TCR, os valores de TAL apresentados pelas plantas tratadas também foram superiores nos primeiros 15 dias e, em seguida, a partir dos 60 dias de tratamento até o final do período experimental. Além disso, as plantas de ambos os lotes apresentaram uma diminuição marcante nos valores de TAL entre os 30 e 60 dias.

A razão de área foliar (RAF), que representa a área foliar utilizada para produzir uma unidade de massa de matéria seca total é apresentada na figura 7. Durante a maior parte do período experimental, as plantas mantidas a 720 ppm de CO₂ apresentaram valores mais elevados de RAF, quando comparadas às plantas mantidas em atmosfera ambiente. Em ambos os lotes de plantas, a RAF aumentou até os 30 dias, diminuindo em seguida até o final do período analisado. Os valores mais elevados de RAF apresentados pelas plantas tratadas foram obtidos até os 60 dias. Aos 120 dias, porém, a RAF das plantas tratadas foi inferior ao das plantas controle. Esses dados refletem as variações de biomassa subterrânea em relação à biomassa aérea (R:PA e PS:PA) que mostraram um maior ganho proporcional de massa subterrânea aos 120 dias de cultivo sob alto CO₂ (figura 6).

Um dos componentes que mais contribuiu para o perfil observado da RAF foi a razão de peso da folha (RPF). A RPF corresponde à razão entre o peso da matéria seca retida nas folhas e o peso de matéria seca acumulada na planta inteira. Ambos os lotes apresentaram perfis de variação de RPF semelhantes. Porém as plantas tratadas apresentaram RPF mais elevadas durante a maior parte do período experimental. Os valores de RPF aumentaram até os 30 dias, permaneceram estáveis até os 60 dias e diminuíram em seguida, até os 120 dias. Semelhantemente a RAF, o valor final da RPF em plantas tratadas foi inferior ao de plantas controle e, como a RAF, refletiu a maior alocação de biomassa nos órgãos subterrâneos ao final do período de exposição ao alto CO₂.

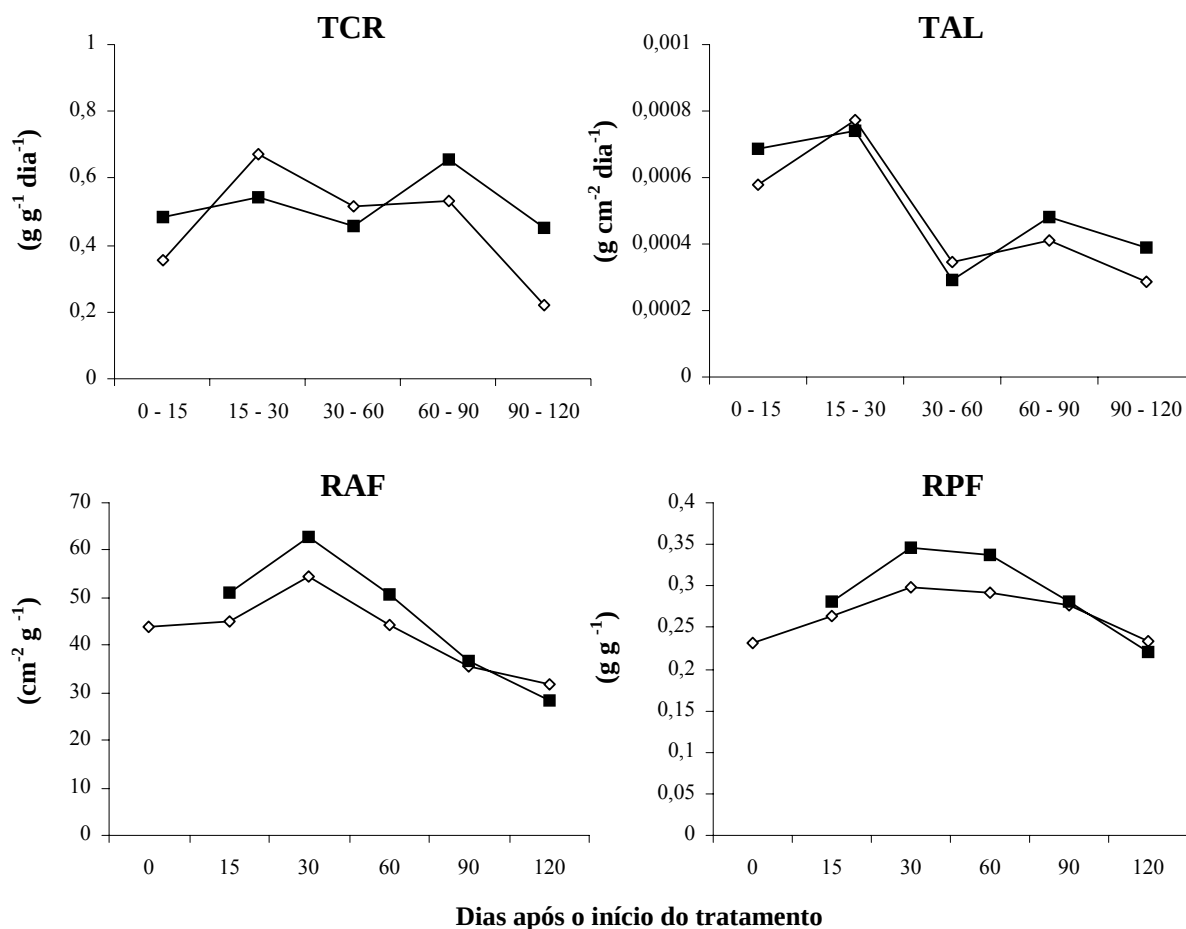


Figura 7. TCR (taxa de crescimento relativo), TAL (taxa de assimilação líquida), RAF (razão da área foliar) e RPF (razão do peso da folha) em plantas de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm ■) e elevada (~720 ppm ◇) de CO₂.

Conforme Pritchard *et al.* (1999), a diminuição da RAF e da RPF sugere que as plantas alocaram menos carbono para a produção de área foliar, especialmente em plantas mantidas em concentração elevada de CO₂. Os resultados obtidos com *V. herbacea* indicam que a partir dos 60 dias, aproximadamente, as plantas apresentaram maior alocação de biomassa para os órgãos subterrâneos de reserva do que para os órgãos aéreos e que esta alocação foi mais acentuada nas plantas mantidas em concentração elevada de CO₂.

Fotossíntese

As plantas mantidas em atmosfera ambiente de CO₂ apresentaram pequenas variações na fotossíntese durante todo o experimento (figura 8). As plantas tratadas apresentaram taxas fotossintéticas mais elevadas durante todo o período experimental, com valores estatisticamente diferentes aos 30, 60 e 120 dias, quando apresentaram valores de 87%, 72% e 63% maiores em relação às taxas apresentadas pelas plantas controle nos mesmos períodos (figura 8). Aos 15 e 30 dias houve um aumento da taxa, em relação ao tempo 0, seguido de uma pequena queda aos 60 dias após o que se manteve estável até os 120 dias. Esta diminuição ocorreu possivelmente devido à aclimação fotossintética ou “down-regulation”, definida por Stitt (1991) como um conjunto de processos fisiológicos que causam diminuição da capacidade fotossintética em plantas sob altas concentrações de CO₂, comum em plantas C3, como é o caso de *V. herbacea*.

Existem dois mecanismos para a diminuição da fotossíntese pela elevada concentração de CO₂. O primeiro mecanismo ocorre pela inibição da expressão dos genes relacionados à fotossíntese, particularmente aqueles que codificam a síntese da Rubisco, causada pelo acúmulo dos açúcares (principalmente a sacarose) nas folhas (Stitt 1991, Koch 1996, Farrar *et al.* 2000, Long *et al.* 2004). Esse mecanismo é geralmente encontrado em folhas jovens e leva à aclimação das plantas pela elevada concentração de CO₂. O segundo mecanismo se dá pela aceleração da ontogenia e uma antecipação da iniciação da senescência foliar (Miller *et al.* 1997, Kauter *et al.* 2000, Ludwig & Sonnewald 2000, Usuda 2006).

A aclimação da fotossíntese, sugerida a partir dos resultados obtidos neste estudo, pode ter ocorrido devido ao aumento da concentração de sacarose nas folhas. Apesar de não ter sido quantificado no presente estudo, o aumento no conteúdo de sacarose em folhas concomitante à diminuição da fotossíntese foi observado em plantas de *V. herbacea* submetidas à fertilização com nitrogênio (Cuzzuol 2003). A atmosfera enriquecida de CO₂,

aliada ao suprimento adequado de água e nutrientes, estimulou a fotossíntese e possivelmente levou ao aumento da concentração de sacarose nas folhas, levando à aclimação fotossintética em plantas de *V. herbacea*, como sugerido acima.

As plantas mantidas em concentração ambiente de CO₂ apresentaram, em geral, taxa de transpiração e condutância estomática mais elevadas do que as plantas tratadas (figura 8). Taxa de transpiração elevada e uma menor taxa fotossintética resultou em uma menor eficiência do uso da água (EUA) nas plantas controle. A EUA, nas plantas mantidas em atmosfera enriquecida de CO₂, apresentou diferenças estatísticas em todos os pontos analisados, que variaram de 50% a 177% em relação às plantas mantidas em atmosfera ambiente.

Previsões indicam que o aumento da concentração de CO₂ atmosférico levará a mudanças nos padrões de precipitação e aumento do déficit hídrico no solo em áreas extensas do planeta (Baker *et al.* 1997, Naumburg *et al.* 2004, IPCC 2007), que por sua vez levarão a mudanças na composição da vegetação. No Brasil, 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). Nessas condições, plantas que apresentem adaptações à baixa disponibilidade de água, entre elas maior EUA, serão melhores adaptadas às condições previstas. Os resultados sobre a EUA em plantas tratadas sugerem que *V. herbacea*, uma espécie que em atmosfera ambiente já possui adaptações à baixa disponibilidade de água, como a presença de órgãos de reserva subterrâneos com concentração elevada de frutanos, poderá ter um maior sucesso adaptativo às novas condições hídricas sob condições de elevado CO₂.

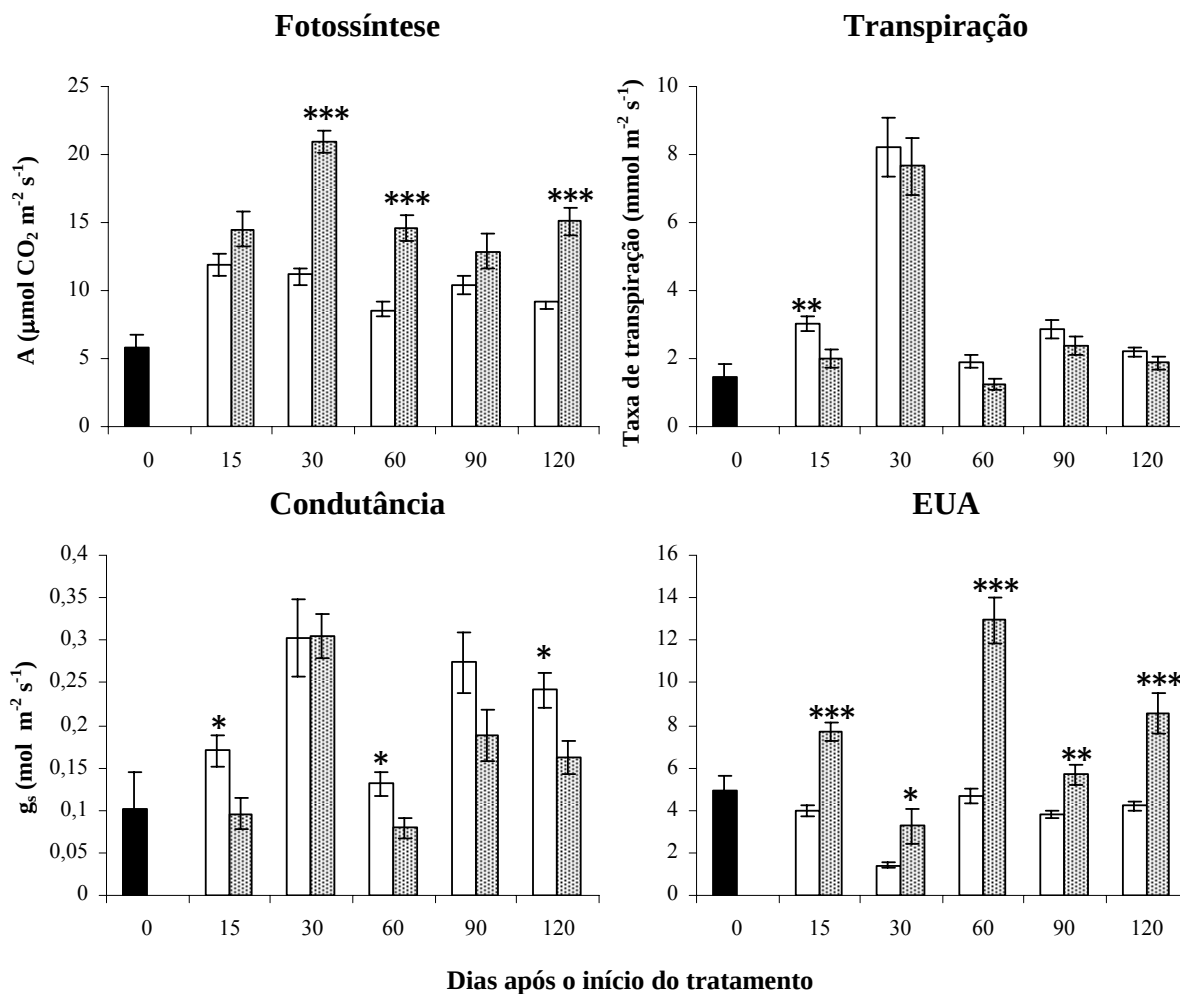


Figura 8. Assimilação fotossintética, transpiração, condutância estomática e eficiência do uso da água (EUA) a $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de folhas de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente ($\sim 380 \text{ ppm}$ □) e elevada ($\sim 720 \text{ ppm}$ ▨) de CO_2 por 0 (■), 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Os valores representam a média de 7 plantas e as barras indicam $\pm$ o erro padrão. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Também tem sido relatado que o aumento da EUA e da fotossíntese, pela elevada concentração de CO_2 , leva a um acúmulo de matéria seca em trigo e canola (Lawlor & Mitchel 2000, Qaderi *et al.* 2006). Resultados semelhantes foram observados em plantas de *V. herbacea* submetidas ao alto CO_2 , nas quais a EUA, a fotossíntese e a biomassa foram mais elevadas do que nas plantas controle (figuras 6 e 8).

Vários estudos relatam que o crescimento em elevado CO_2 altera as características estomáticas e que esse fato estaria relacionado com a menor condutância estomática e taxa de

transpiração, encontradas nestas plantas. Segundo Murray (1995), as mudanças na condutância estomática e na EUA em plantas mantidas sob elevada concentração de CO₂ seria resultado do ajustamento na abertura dos estômatos. Embora esse parâmetro não tenha sido analisado no presente trabalho, o mesmo efeito pode ter ocorrido em plantas de *V. herbacea* mantidas sob essas condições.

Conteúdo de clorofila

Plantas mantidas em concentração ambiente de CO₂ apresentaram durante todo o período experimental maiores teores de clorofila total e de clorofilas *a* e *b* do que plantas mantidas sob atmosfera enriquecida em CO₂ (figura 9).

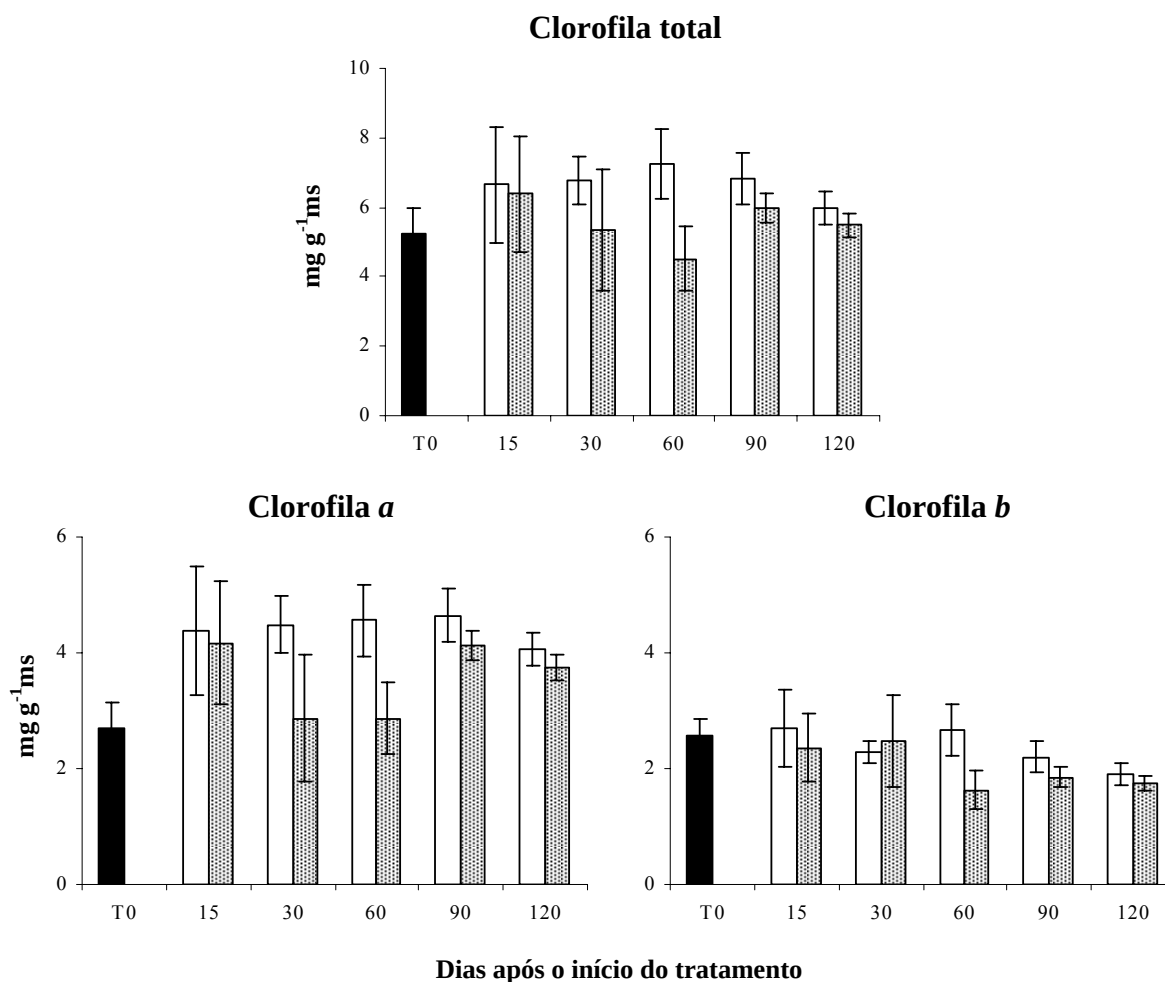


Figura 9. Concentração de clorofila *a*, *b* e total em folhas de plantas de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm □) e elevada (~720 ppm ▨) de CO₂ por 0 (■), 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Os valores indicam a média de dez amostras e as barras indicam ± o erro padrão.

Qaderi *et al.* (2006) verificaram, em *Brassica napus* mantidas sob concentrações elevadas de CO₂, a ocorrência de taxas relativamente altas de assimilação fotossintética, acompanhadas de conteúdos elevados de clorofila, quando comparadas às plantas mantidas sob concentração ambiente de CO₂, sugerindo que a maior disponibilidade de CO₂ promoveu a produção dessas moléculas fotossintéticas. Entretanto, o mesmo não foi verificado em plantas de *V. herbacea* submetidas à atmosfera enriquecida em CO₂. Nessas plantas, o aumento da taxa fotossintética (figura 8) não foi acompanhado por aumento do conteúdo de clorofila.

Segundo Lambers *et al.* (1998), aumento na concentração de clorofila, em especial a clorofila *a*, indica maior investimento na formação do fotossistema II. Os resultados obtidos com *V. herbacea* sugerem que as plantas tratadas, mesmo apresentando uma maior eficiência fotossintética, investiram menos na formação do aparato fotossintético do que as plantas controle.

Conteúdo de parede celular e celulose

Os dados da figura 10 mostram os rendimentos de parede celular, em porcentagem de matéria seca, dos resíduos obtidos após a extração de frutanos de rizóforos de *V. herbacea* em concentrações ambiente e elevada de CO₂. O maior rendimento de parede celular foi observado aos 15 dias após o início do tratamento. As plantas tratadas apresentaram, em geral, valores pouco superiores aos observados para as plantas controle, sendo a maior diferença observada aos 60 dias.

Em relação à porcentagem relativa de celulose, observou-se um aumento ao longo do período experimental, principalmente nas plantas controle (figura 11). Diferenças entre lotes de plantas só foram observadas aos 15 e 30 dias após o início do tratamento, com maior proporção de celulose nas plantas mantidas sob elevado CO₂. Esses resultados sugerem que o carbono assimilado pela fotossíntese, especialmente aos 30 dias, foi preferencialmente

direcionado para a síntese de carboidratos estruturais, uma vez que não foi verificado neste período, acúmulo diferencial de frutanos. A redução na porcentagem relativa de celulose aos 60 dias deve-se, possivelmente, ao aparecimento de novos rizóforos, ou seja, tecidos mais jovens que apresentam menor quantidade relativa de celulose.

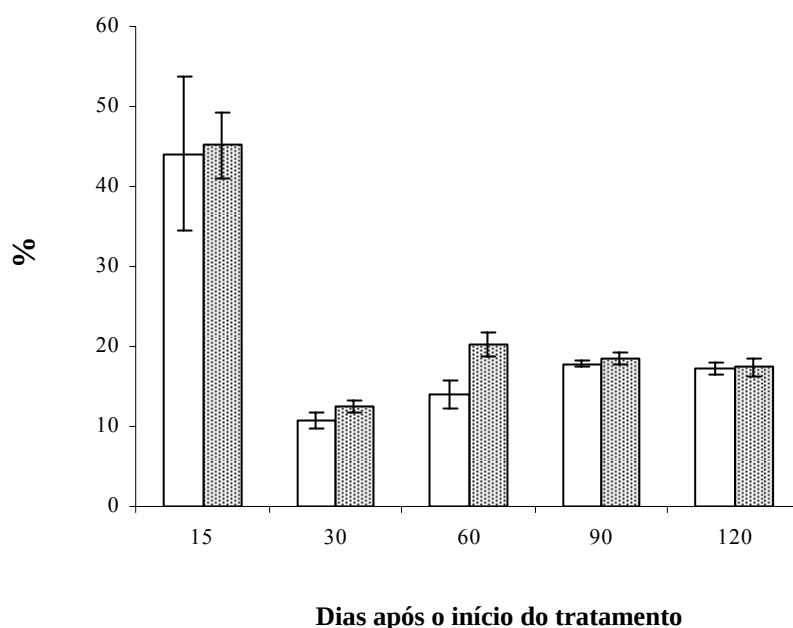


Figura 10. Rendimento de parede celular em rizóforos de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm □) e elevada (~720 ppm ▨) de CO₂. Os valores indicam a média de três amostras.

Embora existam relatos de que o aumento de CO₂ atmosférico pode promover um aumento de celulose da parede celular (Buckeridge & Aida 2002, Aranda *et al.* 2006), no presente estudo, este aumento só foi observado no início do experimento, devido, provavelmente, a um maior investimento na produção e crescimento de células neste período do que no acúmulo de reservas.

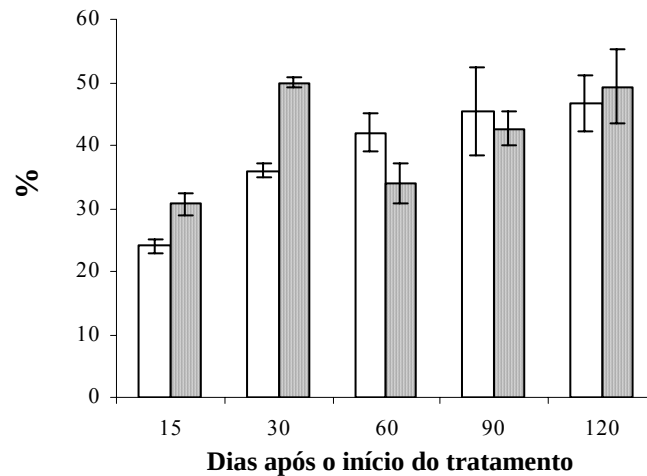


Figura 11. Porcentagem relativa de celulose presente nas paredes celulares de rizóforos de plantas de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm □) e elevada (~720 ppm ■) de CO₂. Os valores indicam a média de três amostras e as barras indicam $\pm$ o erro padrão.

A análise da composição dos monossacarídeos da parede celular bruta é apresentada na figura 12. Na detecção dos açúcares por HPAEC/PAD, não foi possível a separação da xilose e da manose, sendo esses dois monossacarídeos representados como um único pico, que nesse trabalho será denominado xilose/manose.

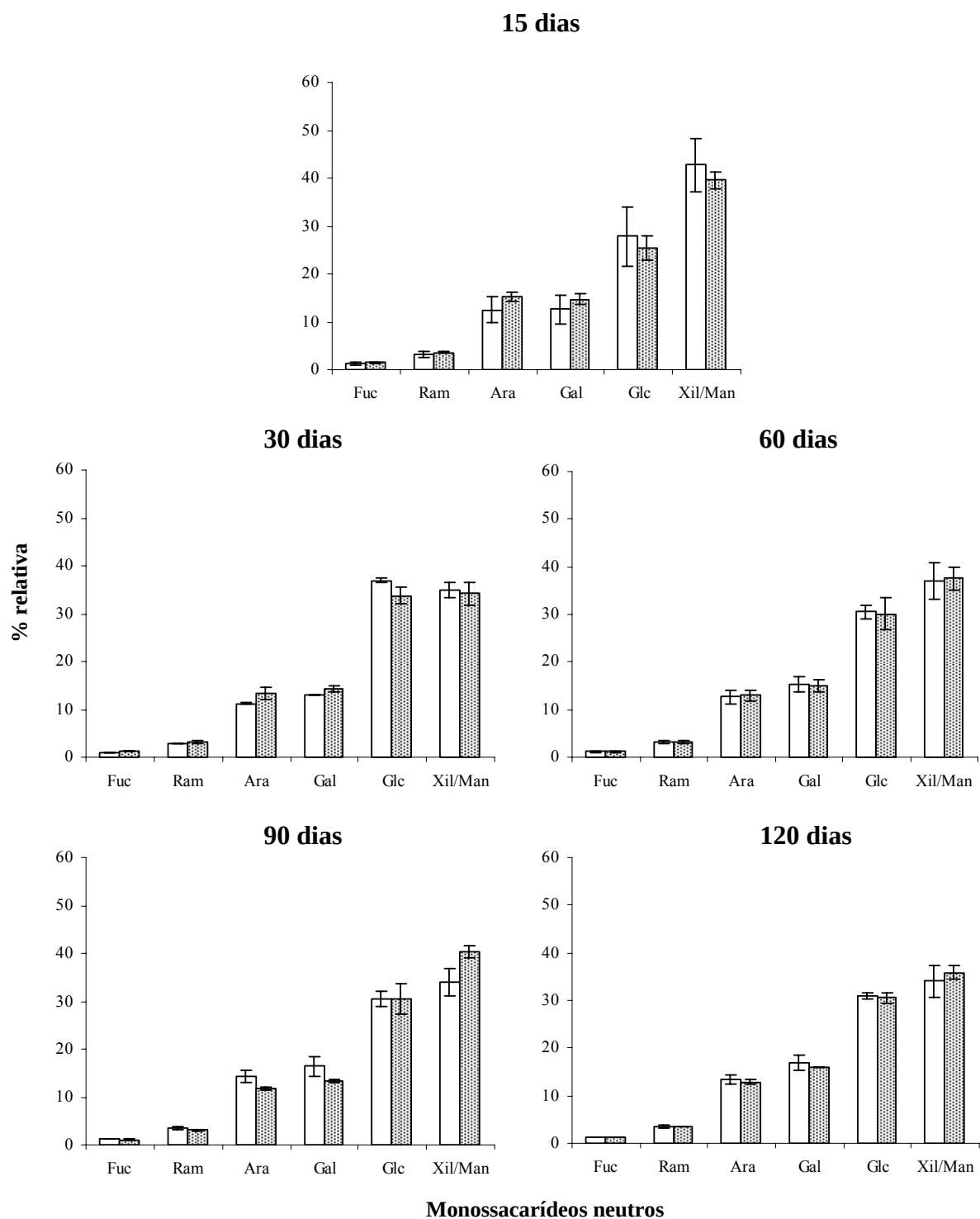


Figura 12. Proporção relativa (%) dos monossacarídeos neutros da parede celular dos rizóforos de plantas de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm □) e elevada (~720 ppm ▨) de CO₂ após análise por HPAEC/PAD dos hidrolisados. Fuc – fucose, Ram – ramnose, Ara – arabinose, Gal – galactose, Glc – glucose, Xil/Man – xilose/manose não separados na análise. Os valores indicam a média de três amostras e as barras indicam ± o erro padrão.

Durante todo o período experimental, não foram observadas diferenças significativas na composição dos polissacarídeos de parede celular entre as plantas tratadas e controle. Pela composição em monossacarídeos, polissacarídeos formados por xilose, glucose e galactose, parecem ser predominantes nos rizóforos de *V. herbacea* e devem compor xiloglucanos, comumente encontrados em paredes celulares de dicotiledôneas (Carpita & Gibeaut 1993) e xilanos já descritos em órgãos subterrâneos de espécies de cerrado (Figueiredo-Ribeiro *et al.* 1992).

Atividades das enzimas SST, FFT, FEH e invertase

As atividades da SST e FFT foram, em geral, mais elevadas nas plantas tratadas do que nas plantas controle (figura 13). A atividade da SST foi mais elevada principalmente aos 15 dias e novamente aos 90 e 120 dias. A atividade da SST é induzida em condições onde há um aumento na concentração de sacarose, como por exemplo, em plantas submetidas à anoxia (Albretch *et al.* 1993), baixa temperatura (Jeong & Housley 1990, Prud'homme *et al.* 1993), iluminação contínua de folhas (Simmen *et al.* 1993, Person & 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). Os resultados indicam que em plantas mantidas sob atmosfera enriquecida em CO₂, parece haver um estímulo à síntese de frutanos a partir do carbono excedente disponibilizado na forma de sacarose.

A atividade da FFT, enzima responsável pela redistribuição dos resíduos de frutose entre as cadeias de frutanos de diferentes tamanhos, foi maior do que a atividade da SST em ambos os lotes. Taxas de atividade mais elevadas para FFT, conforme detectado no presente estudo já foram relatados em estudos realizados anteriormente com *V. herbacea* (Asega & Carvalho 2004, Portes & Carvalho 2006). Comparando-se os dois grupos de plantas, as tratadas apresentaram, em geral, taxas de atividade de FFT superiores às observadas nas plantas controle. Em *V. herbacea*, a atividade de FFT foi detectada em várias fases

fenológicas da planta, como dormência, brotação e fase vegetativa (Asega & Carvalho 2004, Portes & Carvalho 2006), indicando que esta enzima é ativa tanto em fases em que o metabolismo de frutanos está voltado para a síntese, como em fases de mobilização dessas reservas. Isso porque nas fases de biossíntese intensiva de frutanos, a atuação da FFT é importante para catalisar o alongamento das cadeias. Por outro lado, durante a mobilização, a sua atuação é favorável ao encurtamento das moléculas, facilitando a atuação da FEH, que, em geral, em asteráceas, é mais ativa sobre cadeias mais curtas de frutanos (Asega & Carvalho 2004).

Em plantas mantidas sob atmosfera ambiente de CO₂ foi observada uma tendência de atividade mais elevada da FEH, principalmente aos 30 dias após o início do experimento (figura 13). Nesse período, as plantas controle apresentaram uma TCR mais elevada (figura 7), quando comparada à obtida nos demais tempos, sugerindo que o crescimento aéreo das plantas controle impôs uma maior demanda pelo uso das reservas de carbono, favorecendo o aumento de atividade da FEH. O papel dessa enzima no metabolismo de frutanos é, principalmente, mobilizar reservas quando a demanda energética da planta aumenta, como em situações onde é necessário o uso dessas reservas para o crescimento dos órgãos aéreos, conforme verificado em várias espécies de Asteraceae, como *Taraxacum officinale* (Rutherford & Deacon 1974), *C. intybus* (Van den Ende & Van Laere 1996) e *Helianthus tuberosus* (Marx *et al.* 1997). Estudos realizados durante o ciclo fenológico em *V. herbacea* mostraram que a FEH presente nos rizóforos apresenta atividade elevada apenas na época de brotação (Ribeiro Sobrinho *et al.* 1996) e que esta enzima pode ser induzida, em outras fases fenológicas, pela excisão e rebrota de seus ramos aéreos (Asega & Carvalho 2004).

No presente estudo, as plantas mantidas sob alto CO₂ apresentaram atividades mais elevadas de SST e atividades inferiores de FEH quando comparadas às plantas controle, sugerindo que o aumento de atividade de biossíntese de frutanos estaria associado não apenas ao aumento da disponibilidade de fotossintatos para o órgão de reserva, como também à

diminuição da mobilização desses compostos pela FEH nessas plantas. Esses resultados estão de acordo com a hipótese apresentada por Frehner *et al.* (1984) e discutida por Asega & Carvalho (2004) sobre o controle temporal entre as enzimas do metabolismo de frutanos presentes no mesmo compartimento celular, o vacúolo. Uma vez que as mudanças nas atividades da SST e FEH estão sempre em direções contrárias, De Roover *et al.* (1999), estudando a atividade dessas enzimas em plantas de *C. intybus* submetidas à desfolhação, sugeriram que os genes dessas enzimas são regulados pelo mesmo indutor, por exemplo, a sacarose. O aumento da concentração desse dissacarídeo poderia estimular o gene da SST e inibir o gene da FEH.

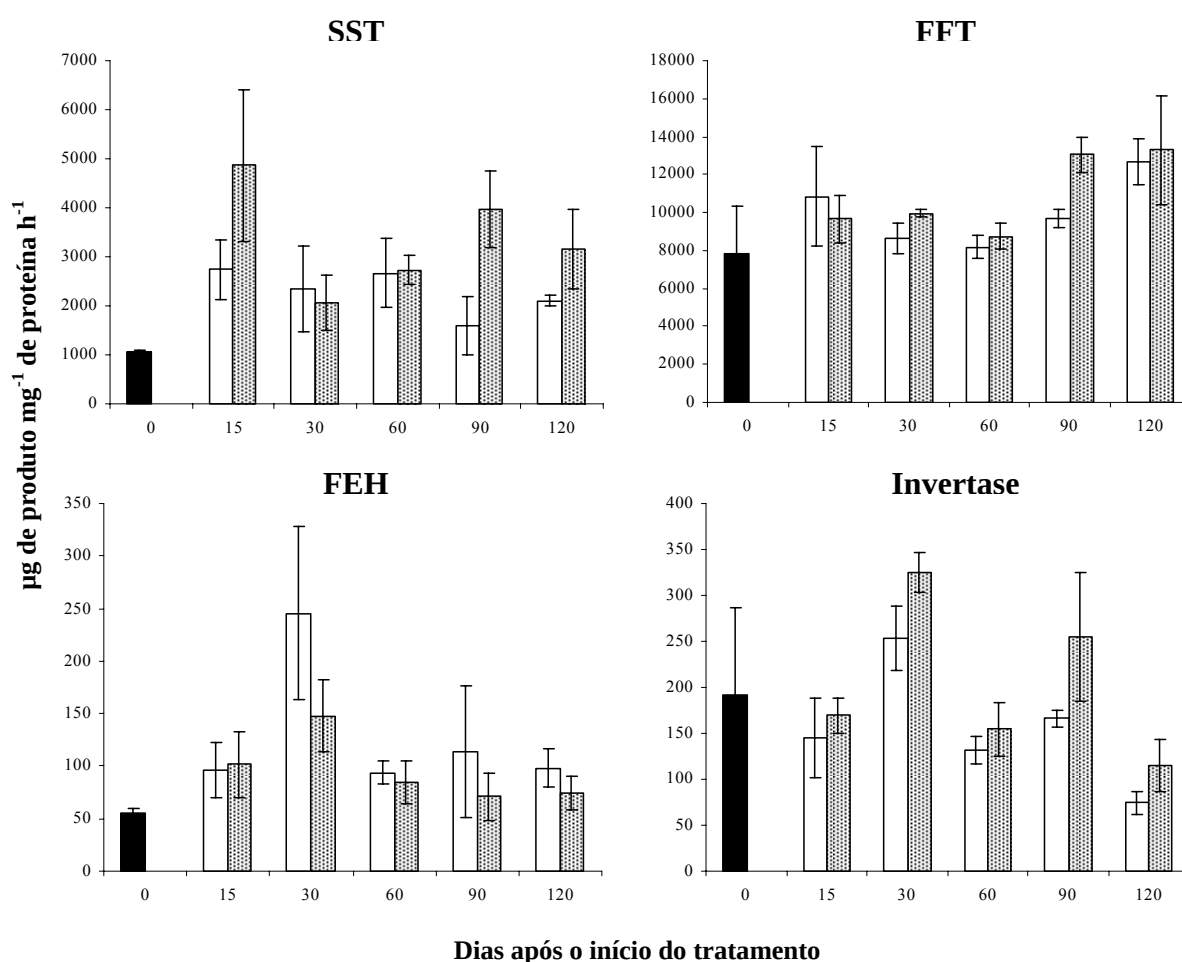


Figura 13. Atividades de SST e FFT após 1 hora de incubação, de FEH após 30 minutos de incubação e Invertase após 4 horas de incubação em rizóforos de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm □) e elevada (~720 ppm ■) de CO₂ por 0 (■), 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Os valores indicam a média de três amostras e as barras indicam ± o erro padrão.

A atividade da invertase foi, em geral, mais elevada nas plantas submetidas à atmosfera enriquecida em CO₂ do que nas plantas controle, principalmente aos 30 e 90 dias após o início do tratamento. Aos 30 dias, o aumento da atividade de invertase nas plantas tratadas pode estar relacionado à maior disponibilidade de sacarose devido à maior taxa fotossintética apresentada nesse período. O carbono excedente foi, aparentemente, utilizado pela planta para crescimento da parte aérea (figura 6), que ocorreu anteriormente ao aumento de biomassa e acúmulo de frutanos.

Por outro lado, aos 90 dias, as plantas tratadas apresentaram maior TCR (taxa de crescimento relativo) do que as plantas controle, sem apresentar, contudo, atividade elevada de FEH, que desempenha, principalmente, o papel de mobilizar reservas quando a demanda energética da planta aumenta, conforme discutido anteriormente. Sendo assim, a atividade elevada de invertase nesse período pode ser consequência do aumento da quantidade disponível de sacarose, que favoreceu o incremento da biomassa aérea e subterrânea nesse ponto amostrado (figura 6).

Conteúdo e produção de frutanos

Na figura 14 são apresentados os conteúdos de frutanos totais, fruto-oligo e -polissacarídeos. As concentrações de frutanos totais foram semelhantes em ambos os grupos de plantas e apresentaram pequenas variações ao longo do período analisado.

O conteúdo de fruto-oligossacarídeos também não apresentou, em geral, diferenças entre os dois grupos de plantas e ao longo do período experimental, exceto aos 15 dias, quando foi mais elevado nas plantas sob atmosfera enriquecida em CO₂. O conteúdo de oligossacarídeos mais elevado aos 15 dias coincidiu com a atividade mais elevada de SST, quando comparado às plantas mantidas sob atmosfera ambiente (figura 13).

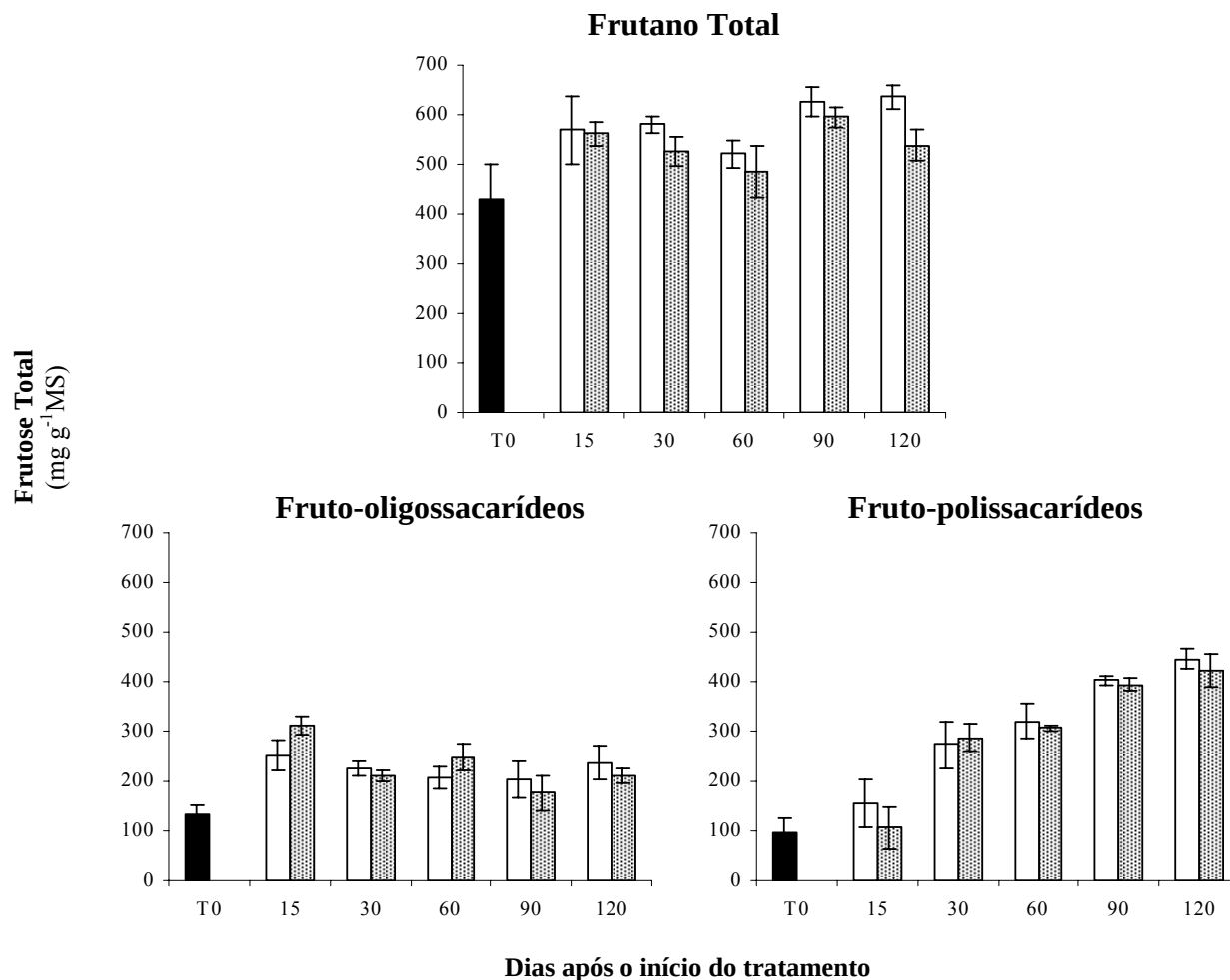


Figura 14. Conteúdo de frutano total, fruto-oligo e –polissacarídeos em rizóforos de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm □) e elevada (~720 ppm ▨) de CO₂ por 0 (■), 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Os valores indicam a média de três amostras e as barras indicam ± o erro padrão.

O conteúdo de fruto-polissacarídeos apresentou um aumento gradual ao longo do período experimental, consistente com o crescimento das plantas. Os resultados indicam que os fotoassimilados translocados para o órgão subterrâneo de reserva foram utilizados para a manutenção da quantidade disponível de fruto-oligossacarídeos e no alongamento da cadeia de frutanos, por ação da enzima FFT, que apresentou aumento de sua atividade nos dois lotes de plantas, especialmente aos 90 e 120 dias.

A análise dos fruto-oligossacarídeos por HPAEC/PAD revelou a presença de todos os membros da série homóloga da inulina, com grau de polimerização (GP) máximo de

aproximadamente 23 nesta fração, além da glucose, frutose e sacarose, tanto nas plantas tratadas, como nas plantas controle, em todos os tempos analisados (figura 15). A análise permitiu também a visualização de algumas variações na proporção dos componentes desta fração.

O perfil dos oligossacarídeos presentes no início do experimento (tempo 0) mostrou maior proporção de frutose e sacarose em relação aos demais componentes desta fração, coerente com o esperado em rizóforos cuja reserva está sendo mobilizada para o estabelecimento da planta. O crescimento de novos ramos na fase de brotação está associado à hidrólise de frutanos pela FEH e, portanto, ao aumento da frutose livre e sacarose (Carvalho & Dietrich 1993, Asega & Carvalho, 2004).

A partir dos 30 dias, observou-se um aumento na proporção de oligossacarídeos de GP 5-9, tanto nas plantas controle como nas tratadas. Essa distribuição das cadeias foi mantida até o final do experimento.

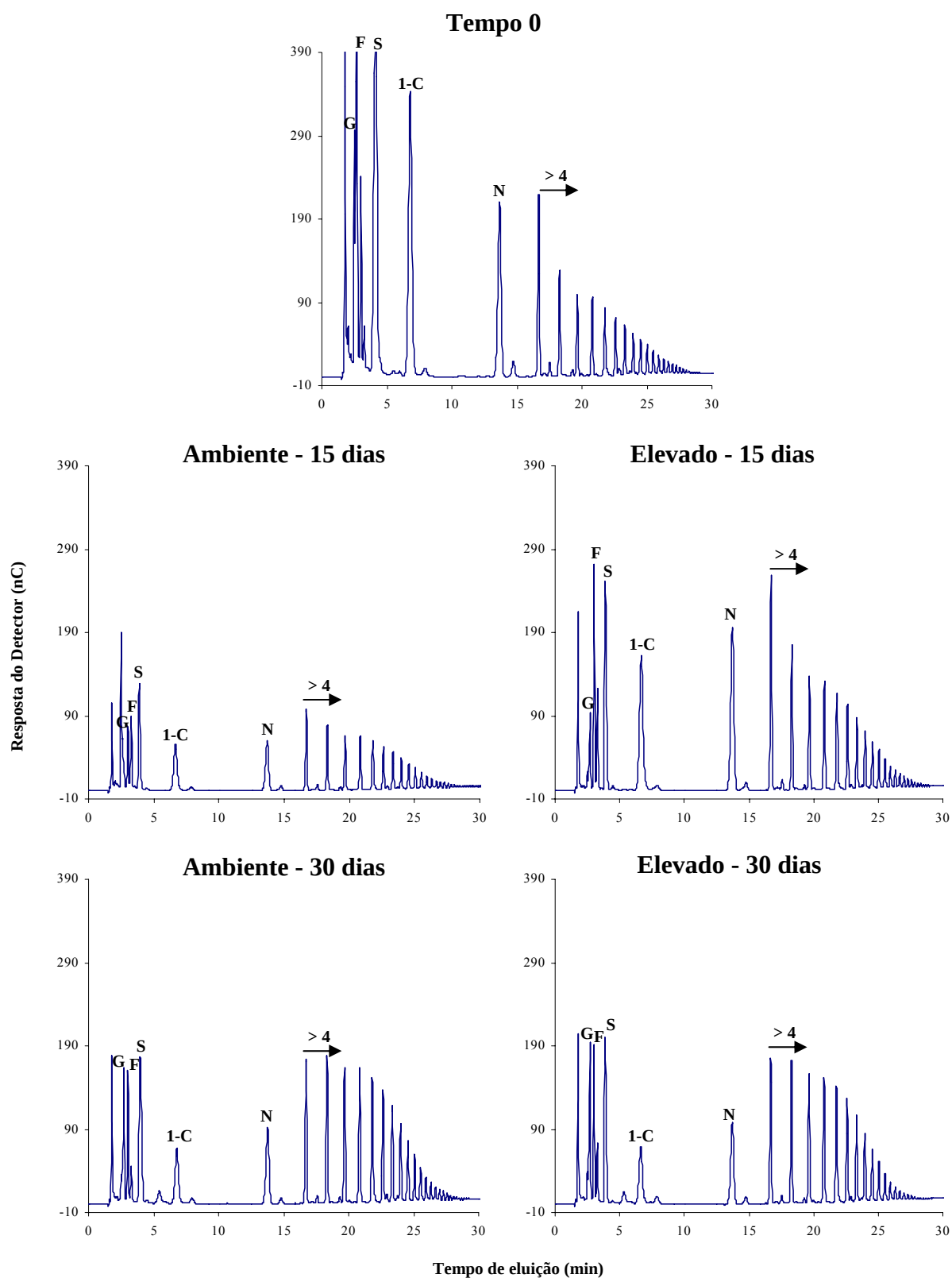
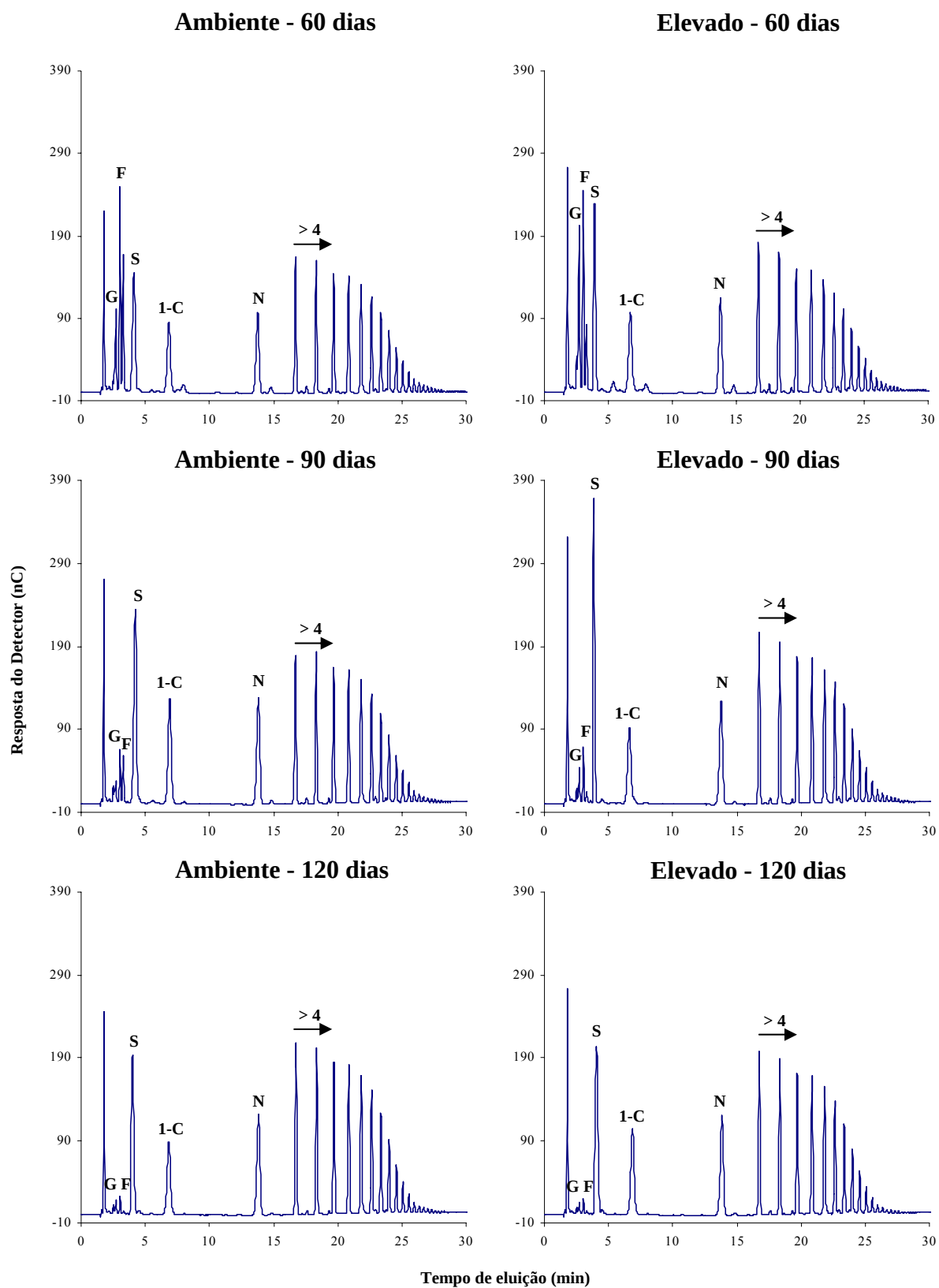


Figura 15. Análise por HPAEC/PAD dos fruto-oligosacarídeos de rizóforos de plantas de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm) e elevada (~720 ppm) de CO₂. G – glucose, F – frutose, S – sacarose, 1-C – 1-kestose, N – nistose, > 4 – frutanos com grau de polimerização maior que 4.



Continuação – figura 15

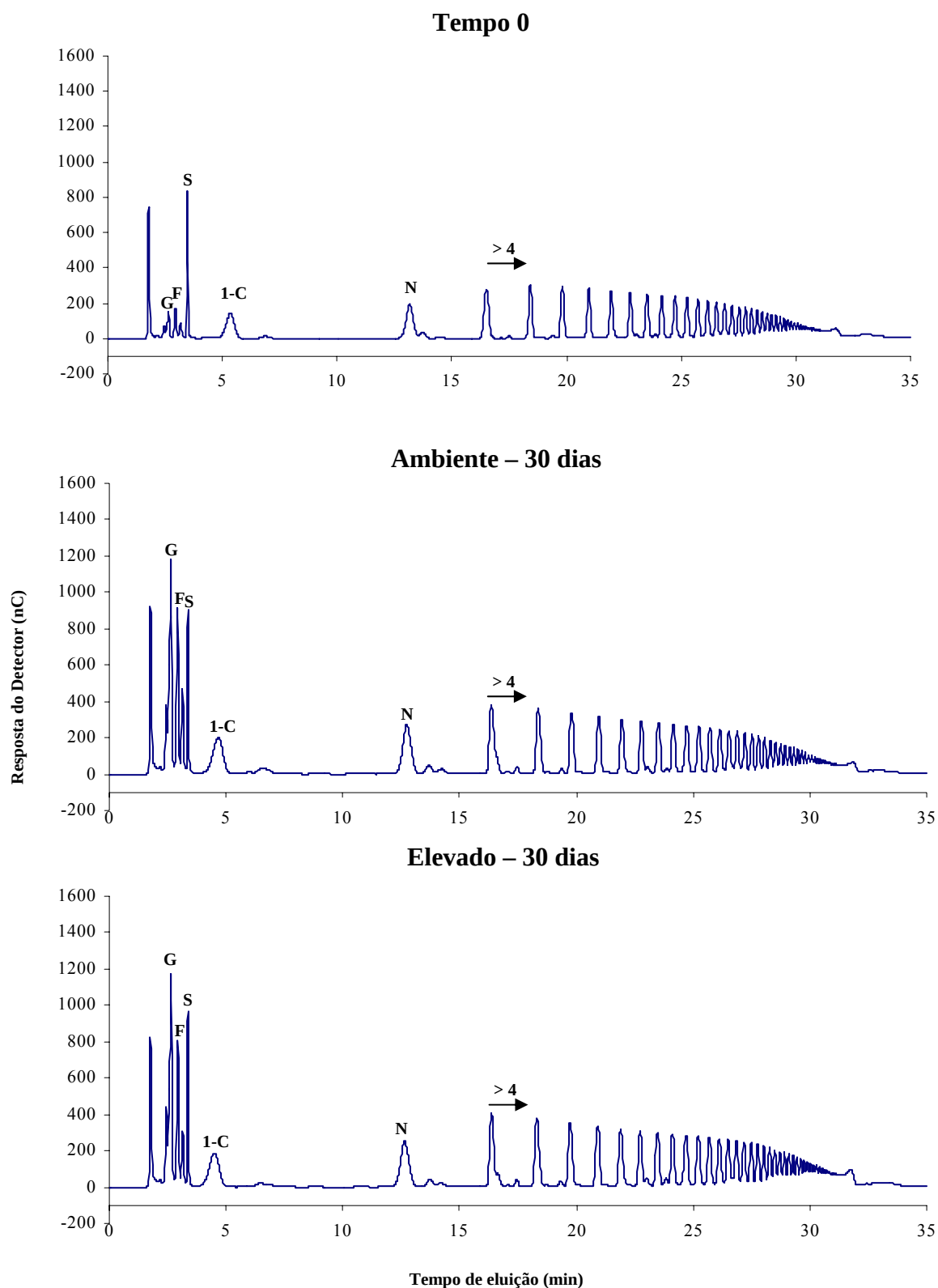
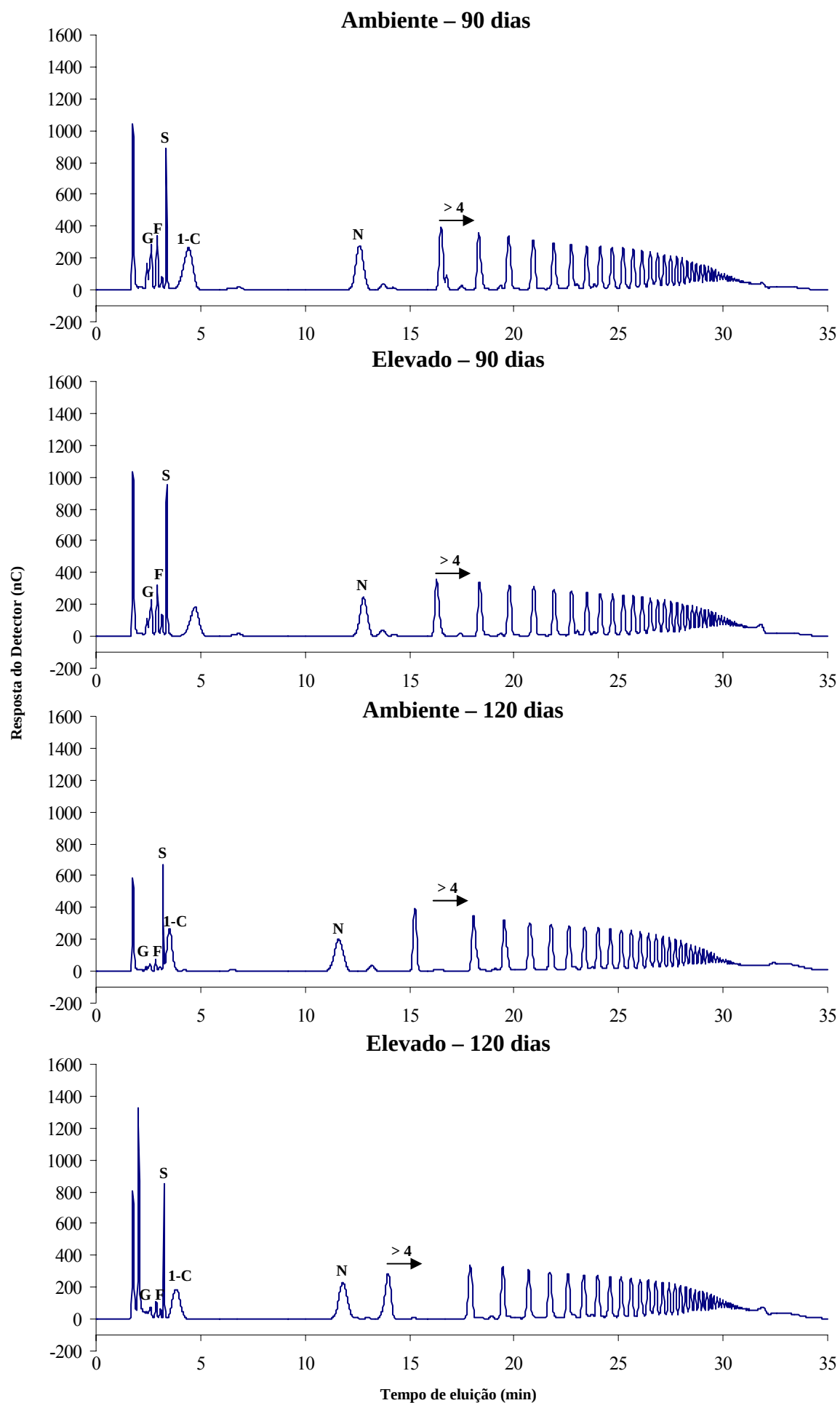


Figura 16. Análise por HPAEC/PAD dos frutanos totais de rizóforos de plantas de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm) e elevada (~720 ppm) de CO₂. G – glucose, F – frutose, S – sacarose, 1-C – 1-cestose, N – nistose, > 4 – frutanos com grau de polimerização maior que 4.



A figura 16 apresenta o perfil cromatográfico por HPAEC/PAD dos frutanos totais no tempo 0 e aos 30, 90 e 120 dias após o início do tratamento. A distribuição das moléculas foi semelhante nas plantas de ambos os lotes, embora as submetidas à atmosfera enriquecida em CO₂ tenham apresentado uma tendência à formação de cadeias maiores, possivelmente em decorrência da maior atividade da FFT encontrada nestas plantas (figura 13).

Embora os dados de literatura demonstrem que a exposição à atmosfera enriquecida em CO₂ promove o crescimento e o acúmulo de carboidratos, dentre estes os carboidratos não-estruturais, como frutanos em *Lolium perenne* (Isopp *et al.* 2000), trigo e *Poa alpina* (Smart *et al.* 1994, Baxter *et al.* 1997, Sild *et al.* 1999), o aumento da concentração de frutanos, por unidade de massa, não foi observado em plantas de *V. herbacea* mantidas nessas condições.

As diferenças na produção de frutanos foram, entretanto, significativas quando calculadas em relação à biomassa total de rizóforos. Neste caso, como o aumento de biomassa desses órgãos foi estimulado pelo aumento de CO₂ (figura 6), a produção de frutanos nessas plantas, ao final do período de exposição, foi 24% superior à verificada nas plantas controle (figura 17). Com relação às duas frações analisadas, foram observados aumentos de 39% e 30% na produção de fruto-polissacarídeos e de fruto-oligossacarídeos, respectivamente, demonstrando claramente o efeito promotor do CO₂ na produção de frutanos em *V. herbacea*.

Aumento da produção de carboidratos sem aumento da concentração desses compostos em plantas com órgãos subterrâneos de reserva submetidas à concentração elevada de CO₂, também foi observado em cenoura (31%), beterraba (21%) e batata (40%) (Wheeler *et al.* 1994, Miglietta *et al.* 1998, Demmers-Derks *et al.* 1998). Esses autores verificaram que o aumento na produção de carboidratos não-estruturais dessas plantas mantidas nessas condições, foi devido, principalmente, ao incremento da biomassa subterrânea.

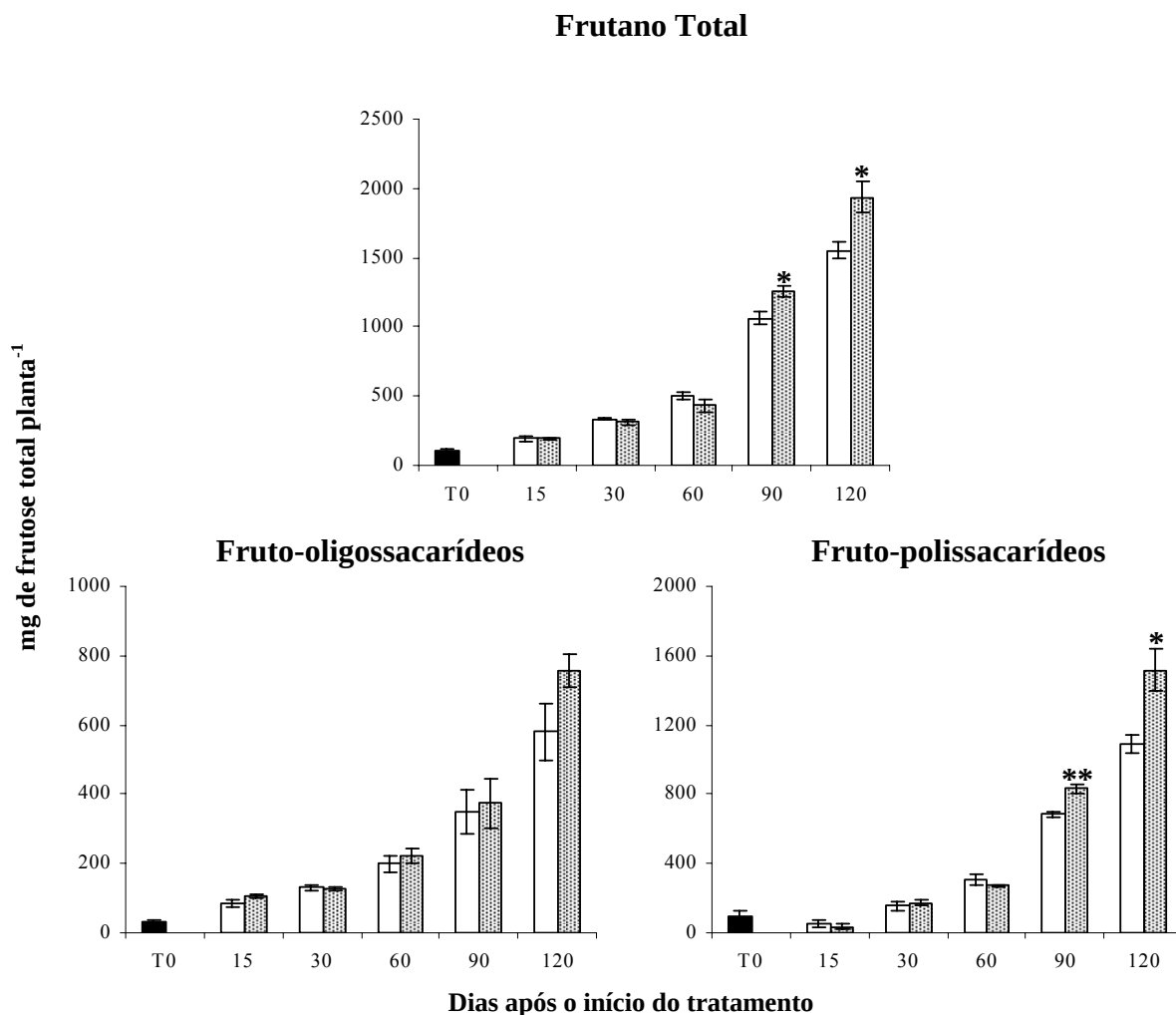


Figura 17. Produção de frutano total, fruto-oligo e –polissacarídeos em rizóforos de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm □) e elevada (~720 ppm ▨) de CO₂ por 0 (■), 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Os valores indicam a média de três amostras e as barras indicam $\pm$ o erro padrão. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Em plantas de *V. herbacea*, o aumento na produção de inulina foi verificado anteriormente por Carvalho *et al.* (1998) e Cuzzuol *et al.* (2003) em estudos sobre o efeito da adubação nitrogenada no crescimento e na produção de frutanos. No primeiro caso, os autores verificaram que o aumento foi diretamente relacionado ao tempo de cultivo das plantas e não à fertilização com nutrientes. Por outro lado, Cuzzuol *et al.* (2003) verificaram que plantas com 12 meses de cultivo apresentaram rendimento máximo de 6 g por planta, com a aplicação de concentrações elevadas de nitrogênio, correspondendo a um aumento de 100% em relação às plantas controle. Portanto, tratamentos que visam ao aumento da biomassa dos rizóforos de

V. herbacea promovem o aumento da produtividade nesta espécie, sem promover aumento no conteúdo de frutanos, como no caso das plantas submetidas à atmosfera enriquecida em CO₂.

Exsudação de frutanos

Na figura 18 são apresentados os conteúdos de frutose total na água de lavagem dos rizóforos de *V. herbacea*, por unidade de massa de matéria seca (A) e fresca (B) dos rizóforos. Conforme pode ser observado, a exsudação foi detectada em todos os pontos amostrados, em ambas as condições de cultivo. Entretanto, as plantas mantidas em elevada concentração de CO₂ mostraram, em geral, tendência a valores mais elevados aos 15, 30 e 60 dias após o início do tratamento.

Pouco se conhece sobre a exsudação de frutanos em plantas que possuem órgãos subterrâneos de reserva. Cordeiro Neto *et al.* (1997), estudando a rizosfera de asteráceas herbáceas, dentre estas *V. herbacea*, em uma área do cerrado de Moji-Guaçu, SP, verificaram que 87% dos fungos isolados possuem atividade inulinásica *in vitro* (Pessoni *et al.* 1999), sugerindo que os órgãos subterrâneos dessas espécies devem fornecer carbono na forma de inulina para a microbiota associada à rizosfera dessa espécie.

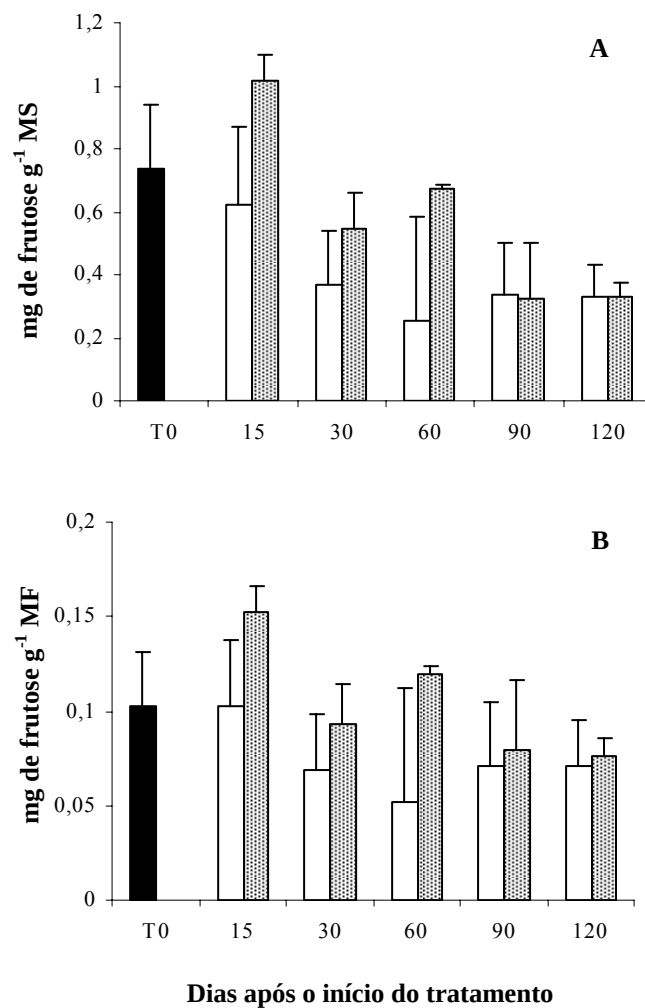


Figura 18. Conteúdo de frutose total por massa seca **(A)** e fresca **(B)** dos rizóforos na água de lavagem desses órgãos de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm □) e elevada (~720 ppm ▨) de CO₂ por 0 (■), 15, 30, 60, 90 e 120 dias. Os valores indicam a média de três amostras e as barras indicam ± o erro padrão.

Analisando os exsudatos de rizóforos de *V. herbacea* por HPAEC/PAD (figura 19), verificou-se a presença de 1-cestose, nistose e os demais membros da série homóloga da inulina com grau de polimerização > 4, principalmente aos 60, 90 e 120 dias. Entre os lotes, nota-se que as plantas tratadas apresentaram cadeias mais longas do que as plantas controle.

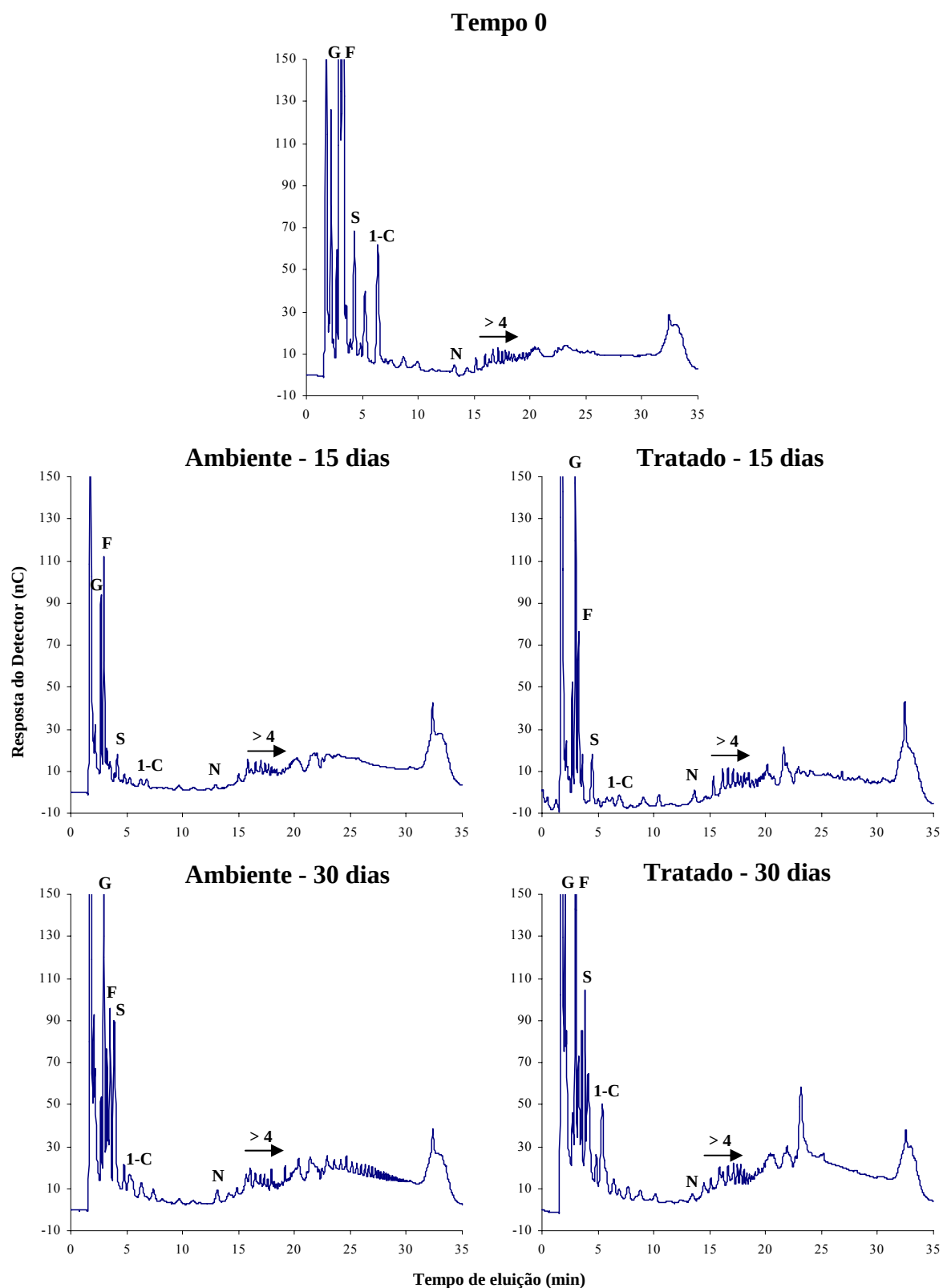
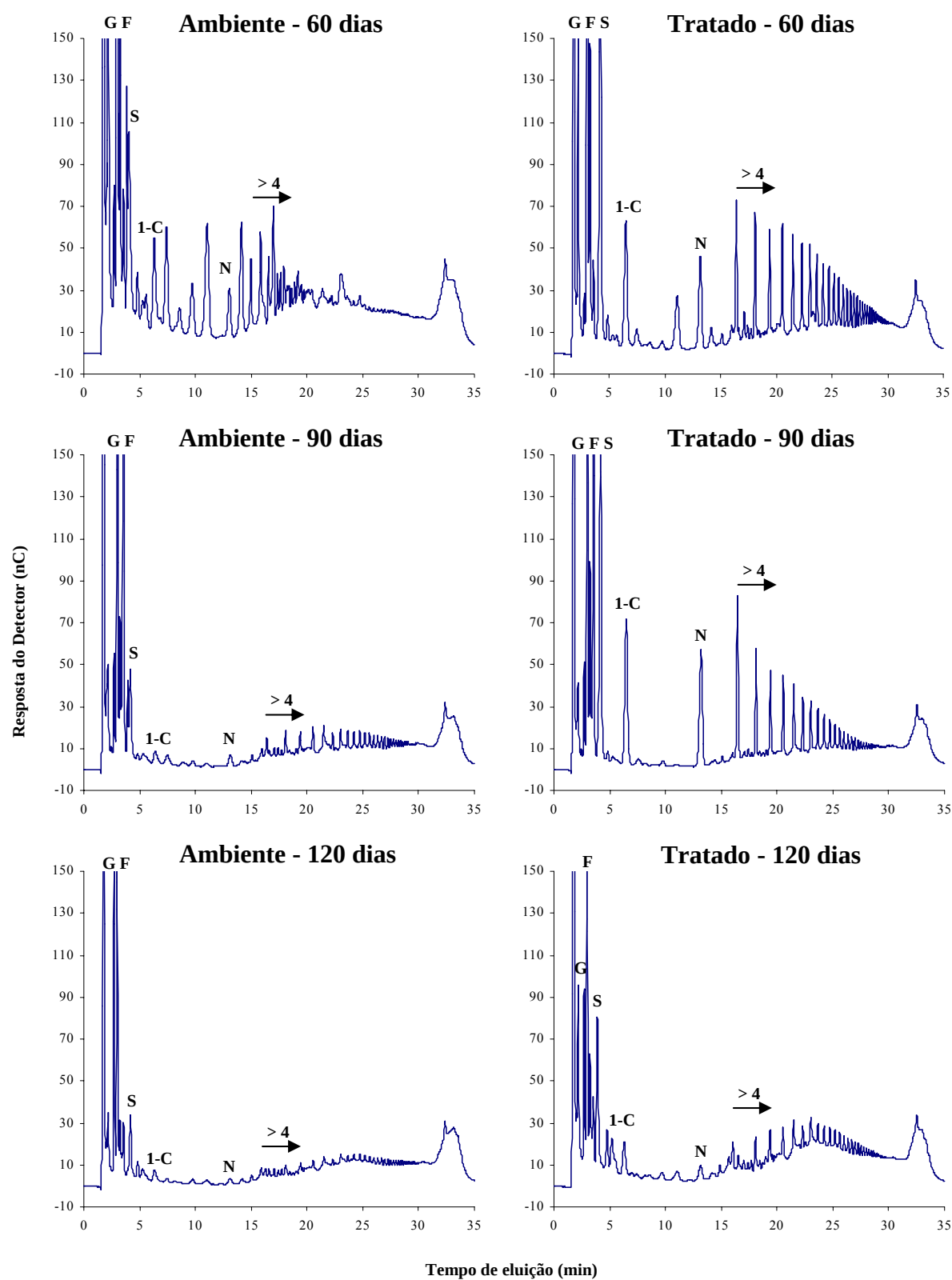


Figura 19. Análise por HPAEC/PAD dos exsudados de rizóforos de plantas de *V. herbacea* mantidas em concentrações ambiente (~380 ppm) e elevada (~720 ppm) de CO₂. G – glucose, F – frutose, S – sacarose, 1-C – 1-cestose, N – nistose, > 4 – frutanos com grau de polimerização maior que 4.



Continuação - figura 19

Relatos sobre a exsudação de carboidratos para o solo e seu aumento em atmosfera elevada de CO₂ sugerem que a maior disponibilidade de carbono também leva a uma maior deposição junto à rizosfera (Lambers 1996, Hungate *et al.* 1997, Körner 2006).

No caso de *V. herbacea*, entretanto, é importante salientar que alguns fungos encontrados na sua rizosfera também possuem a capacidade de sintetizar inulina (R.A.B. Pessoni, comunicação pessoal). Desse modo, a ocorrência da série homóloga apresentada na figura 18 precisa ser mais bem analisada, para confirmar a procedência dos frutanos encontrados na água de lavagem dos rizóforos. De qualquer modo, fica claro o efeito da atmosfera enriquecida em CO₂, disponibilizando carbono para a microbiota associada aos rizóforos de *V. herbacea*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cerrado é o segundo maior bioma no território brasileiro, estando atrás apenas da floresta amazônica (Coutinho 2002). A vegetação do cerrado apresenta crescimento sazonal e uma série de estratégias adaptativas para superar condições adversas como o fogo, a seca e o estresse nutricional característico deste bioma. Parte das estratégias inclui a presença massiva de órgãos subterrâneos espessados em plantas herbáceas que atravessam períodos de acúmulo de fotoassimilados durante o seu ciclo de desenvolvimento (Mantovani & Martins 1988).

Dentre as espécies herbáceas do cerrado que possuem órgãos subterrâneos de reserva, destaca-se *Vernonia herbacea* devido ao seu elevado conteúdo de frutanos. Estudos foram realizados com esta espécie com a finalidade de se conhecer as respostas do metabolismo de frutanos frente a fatores ambientais adversos, como temperatura (Dias-Tagliacozzo *et al.* 1999, Portes & Carvalho 2006, Asega 2007), déficit hídrico (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004, Garcia 2006) e disponibilidade de nutrientes (Carvalho *et al.* 1998, Cuzzuol *et al.* 2003, Cuzzuol *et al.* 2005). Com o presente trabalho, buscou-se compreender como essa espécie responde à elevação da concentração de CO₂ atmosférico.

Previsões estimam que ainda nesse século os níveis atmosféricos de CO₂ estarão próximos de 720 ppm (Houghton *et al.* 1996) e isso acarretará em mudanças nos padrões de precipitação e aumento do déficit hídrico no solo em áreas extensas do planeta (Baker *et al.* 1997, Naumburg *et al.* 2004, IPCC 2007), que por sua vez acarretarão em mudanças na composição da vegetação. No Brasil, prevê-se que haverá uma substituição de parte da floresta amazônica pelo cerrado (IPCC 2007), bioma marcado por duas estações bem definidas – verão chuvoso e inverno seco – (Coutinho 2002). Nessas condições, plantas que apresentem adaptações à baixa disponibilidade de água, entre elas maior eficiência do uso da água (EUA), serão mais bem adaptadas às condições previstas. Dentre estas, plantas de *V. herbacea* sob a concentração de CO₂ atual já apresentam adaptações à baixa disponibilidade

de água e a temperaturas adversas, como por exemplo, a presença de órgãos subterrâneos de reserva com concentrações elevadas de frutanos. No presente trabalho, foi verificado que plantas submetidas à atmosfera enriquecida em CO₂ apresentaram aumento da eficiência do uso da água (EUA), sugerindo um maior sucesso na adaptação às novas condições hídricas sob elevado CO₂.

Lawlor & Mitchel (2000) e Qaderi *et al.* (2006) relataram que aumentos na EUA e na fotossíntese, pela elevada concentração de CO₂, são acompanhados por um acúmulo de matéria seca. Plantas de *V. herbacea* submetidas ao alto CO₂ também apresentaram maiores valores de EUA, fotossíntese e biomassa do que plantas mantidas sob atmosfera ambiente. O aumento de biomassa foi observado especialmente nos órgãos subterrâneos de reserva a partir dos 90 dias de tratamento.

Embora seja relatado na literatura que altas concentrações de CO₂ promovem aumento no conteúdo de carboidratos não-estruturais em folhas de gramíneas acumuladoras de frutanos (Isopp *et al.* 2000, Smart *et al.* 1994, Baxter *et al.* 1997, Sild *et al.* 1999), o mesmo não foi verificado nos órgãos de reserva de *V. herbacea*. Entretanto, quando calculado em relação à biomassa total dos rizóforos, o aumento da concentração de CO₂ promoveu um aumento na produção de inulina, principalmente na fração de fruto-polissacarídeos, que ao final do período de análise foi 39 % mais elevada do que nas plantas controle. Segundo Pollock (1986), condições promotoras do crescimento levam à redução do conteúdo de carboidratos. Este efeito foi verificado em plantas de *V. herbacea* cujo crescimento foi induzido por concentrações elevadas de nitrogênio (Cuzzuol *et al.* 2003).

Aumento da produção por aumento de biomassa subterrânea e não por aumento de concentração de carboidratos também foi verificado em cenoura, beterraba e batata (Wheeler *et al.* 1994, Miglietta *et al.* 1998, Demmers-Derks *et al.* 1998) submetidas à concentração elevada de CO₂.

A exsudação de carboidratos e o efeito promotor do alto CO₂ neste processo têm sido amplamente discutidos na literatura (Lambers 1996, Hungate *et al.* 1997, Körner 2006). No presente estudo a ocorrência de exsudação de frutanos por rizóforos de *V. herbacea*, bem como o aumento da exsudação em plantas submetidas à atmosfera enriquecida de CO₂ foi relatada pela primeira vez. Entretanto, como as condições experimentais utilizadas não permitiram descartar a hipótese de síntese dos frutanos por microorganismos presentes na rizosfera da planta, outros experimentos deverão ser conduzidos em condições assépticas para confirmação desses resultados.

Existe uma grande distância entre experimentos realizados com plantas em atmosfera enriquecida em CO₂ e a necessidade de se compreender e prever as respostas das plantas em campo ou em seu bioma natural. Entretanto, isto não tem impedido tentativas de se utilizar resultados experimentais obtidos a partir de modelos para prever cenários futuros para plantas em condições ambientais desconhecidas. Os resultados deste estudo com uma espécie herbácea de cerrado em condições controladas demonstraram que o aumento da concentração de CO₂ atmosférico exerceu um efeito positivo no crescimento e na produção de frutanos dessas plantas que poderá eventualmente ser aplicado no cenário futuro de aumento da concentração de CO₂ atmosférico, para a vasta vegetação herbácea acumuladora de frutanos ocorrente neste bioma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Allen, L.H.** 1990. Plant responses to rising carbon dioxide and potential interactions with air pollutants. *Journal of Environmental Quality* 19: 15-34.
- 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 (^{13}C) partitioning in chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of Experimental Botany* 48: 25-33.
- Aranda, X., Agusti, C., Joffre, R. & Fleck, I.** 2006. Photosynthesis, growth and structural characteristics of holm oak resprouts originated from plants grown under elevated CO_2 . *Physiologia Plantarum* 128: 302-312.
- 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.
- 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.

- Batalha, M.A. & Mantovani, W.** 2000. Reproductive phenological patterns of cerrado plant science at the Pé-do-Gigante Reserve (Santa Rita do Passa Quatro, SP, Brazil): a comparison between the herbaceous and woody floras. *Revista Brasileira de Biologia* 60: 129-145.
- Baxter, R., Ashender, T.W. & Farrar, J.F.** 1997. Effect of elevated CO₂ and nutrient status on growth, dry matter partitioning and nutrient content of *Poa alpina* var. *Vivipara* L. *Journal of Experimental Botany* 312: 1477 – 1486.
- Bonnett, G.D. & Simpson, R.J.** 1993. Fructan-hydrolizing activities from *Lolium ridigum* Gaudin. *New Phytologist* 123: 443-451.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Braga, M.R., Pessoni, R.A.B. & Dietrich, S.M.C.** 1998. Cell wall polysaccharide composition of leaves of tropical rubiaceae differing in phytoalexin response. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 10: 71-78.
- Buckeridge, M.S. & Aida, M.P.M.** 2002. Carbon sequestration in the rain forest: alternatives using environmentally friendly biotechnology. *Biota Neotropica*. Disponível em<<http://www.biotaneotropica.org.br/v2n1/en/abstract?point-of-view+BN00902012002>>.
- Caemmerer, S. von & Farquhar, G.D.** 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387
- 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.
- Campbell, B.** 1996. The miombo in transition, woodlands and welfare in Africa. CIFOR, Bogor.

- Carpita, N.C. & Gibeaut, D.M.** 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical proprieties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1-30.
- 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., Pinto M.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21: 281-285.
- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C.** 1997. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. *New Phytologist* 136: 153-161.
- Centritto, M., Lee, H.S.J. & Jarvis, P.G.** 1999. Increased growth in elevated [CO₂]: an early, short-term response? *Global Change Biology* 5: 623-633.
- Ceulemans R., Janssens, J.A. & Jach, M.E.** 1999. Effects of CO₂ enrichment on trees and forests: Lessons to be learned in view of future ecosystem studies. *Annals of Botany* 84: 577-590.
- 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.

- Cochrane, T.T, Azevedo, L.G., Thomas, D., Madeira Netto, J., Adamoli, J. & Verdesio, J.J.** 1985. Land use and productive potential of American Savannas. Australian Academy of Science, Canberra.
- Cordeiro Neto, F., Pessoni, R.A.B. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1997. Fungos produtores de inulinases isolados da rizosfera de asteráceas herbáceas do cerrado. Revista Brasileira de Ciências do Solo, 21: 149-153.
- 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.** 2003. Nutrição mineral no crescimento e no metabolismo de carboidratos solúveis em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Cuzzuol, G.R.F., Carvalho, M.A.M., Barbedo, C.J. & Zaidan, L.B.P.** 2003. Crescimento e conteúdo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas à adubação nitrogenada. Revista Brasileira de Botânica 26: 81-91.
- 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.
- 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.

- Demel, R.A., Dorrepaal, E., Ebskamp, M.J.M., Smeekens, J.C.M. & de Kruijff, B.** 1998. Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 1375: 36-42.
- Demmers-Derks, H., Mitchell, R.A.C., Mitchell, V.J. & Lawlor, D.W.** 1998. Response of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) yield and biochemical composition to elevated CO₂ and temperature at two nitrogen applications. Plant, Cell and Environment 21: 829-836.
- Días, S.** 1995. Elevated CO₂ responsiveness, interactions at the community level and plant functional types. Journal of Biogeography 22: 289-295.
- 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.
- Dietrich, S.M.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1985. Organos subterrneos y propagacion vegetativa en plantas de los cerrados brasileiros. Medio Ambiente 7: 45-52.
- 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.
- ESRL - Earth System Research Laboratory.** 2007. Disponível em <<http://www.esrl.noaa.gov/>>. Acesso em abril de 2007.
- Farrar, J.F.** 1996. Sinks – integral parts of a whole plant. Journal of Experimental Botany 47: 1273-1279.

- Farrar, J., Pollock, C. & Gallagher, J.** 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Science* 154: 1-11.
- Ferris, R. & Taylor, G.** 1994. Increased root growth in elevated CO₂: a biophysical analysis of root cell elongation. *Journal of experimental Botany* 280: 1603-1612.
- Field, C.B, Chapin, F.S.III, Matson, P.A. & Mooney, H.A.** 1992. Responses of terrestrial ecosystems to the changing atmosphere: A resource-based approach. *Annual Review of Ecological System* 23: 201-235.
- 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.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Isejima, E.M., Dietrich, S. M. C., Corrêa, J. B. C.** 1992. Hemicellulosic polysaccharides from the xylopodium of *Ocimum nudicaule*: changes in composition in dormancy and sprouting. *Annals of Botany* 70: 405-408.
- 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.
- Garcia, P.M.A.** 2006. Efeito do déficit hídrico no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae). Monografia. Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo.
- Gardner, S.D.L., Bosac, C. & Taylor, G.** 1995. Leaf growth of hybrid poplar following exposure to elevated CO₂. *New Phytologist* 131: 81-90.
- Grace, J., San José, J., Meir, P., Miranda, H.S. & Montes, R.A.** 2006. Productivity and carbon fluxes of tropical savannas. *Journal of Biogeography* 33: 387 – 400.
- Hall, D.O., Parton, W.J. & Scurlock, J.M.** 1995. Response of temperate and tropical grassland to CO₂ and climate change. *Journal of Biogeography* 22: 537-547.

- 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.
- Hilbert, D.W., Larigauderie, A. & Reynolds, J.F.** 1991. The influence of carbon dioxide and daily photon-flux density on optimal leaf nitrogen concentration and root:shoot ratio. *Annals of Botany* 68: 365-376.
- 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.

- Hungate, B.A., Holland, E.A., Jackson, R.B., Chapin, F.S.Iii, Mooney, H.A. & Field, C.B.** 1997. The fate of carbon in grasslands under carbon dioxide enrichment. *Nature* 388: 576-579.
- Hunt, R.** 1982. Plant growth curves - The functional approach to plant growth analysis. Edward Arnold, London.
- Hunt, R., Causton, D.R., Shipley, B. & Askew, A.P.** 2002. A Modern Tool for Classical Plant Growth Analysis. *Annals of Botany* 90: 485-488.
- Hunt, R., Hand, D.W., Hannah, M.A. & Neal, A.M.** 1991. Response to CO₂ enrichment in 27 herbaceous species. *Functional Ecology* 5: 410-421.
- IPCC - Intergovernmental Panel Climate Change.** 2007. Summary for policymakers. Disponível em <<http://www.ipcc.ch>>. Acesso em abril de 2007.
- Isopp, H., Frehner, M., Almeida, J.P.F, Blum, H., Daepp, M., Hartwig, U.A., Lüscher, A., Suter, D. & Nösberger, J.** 2000. Nitrogen plays a major role in leaves when source-sink relations change: C and N metabolism in *Lolium perenne* growing under free air CO₂ enrichment. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 851-858.
- Jang, J.C & Sheen J.** 1994. Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell* 6: 1665-1679.
- Jarvis, P.G.** 1989. Atmospheric carbon dioxide and forest. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B324*: 369 – 392.
- 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.
- Kauder, F., Ludewing, F. & Heineke, D.** 2000. Ontogenetic changes of potato plants during acclimation to elevated carbon dioxide. *Journal of Experimental Botany* 51: 429-437.
- Koch, K.E.** 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 23-48.

- 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.
- Körner, C. & Bazzaz, F.A.** 1996. Carbon dioxide, populations and communities. Academic Press, San Diego.
- Lambers, H., Stulen, I. & van den Werf, A.** Carbon use in root respiration as affected by elevated atmospheric O₂. *Plant and Soil* 187: 251-263.
- Lambers, J., Chapin, F.S. & Pons, T.L.** 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag, New York.
- Lawlor, D.W. & Mitchell, R.A.C.** 2000. Crop ecosystem responses to climatic change: wheat. In *Climate Change and global crop Productivity* (K.R. Reddy, H.F. Hodges eds.) CABI Publishing, Wallingford.
- Lichtenthaler, H.K. & Wellburn, A.R.** 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591 – 592.
- Long, S.P., Ainsworth, E.A., Rogers, A. & Ort, D.R.** 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: plants face the future. *Annual Review of Plant Biology* 55: 591 – 628.
- Ludewing, F. & Sonnewald, U.** 2000. High CO₂-mediated down regulation of photosynthetic gene transcripts is caused by accelerated leaf senescence rather than sugar accumulation. *FEBS Letters* 479: 19-24.

- Luo, Y., Field, C.B. & Mooney, H.A.** 1994. Predicting responses of photosynthesis and root fraction to elevated CO₂: Interactions among carbon, nitrogen and growth. *Plant Cell and Environmental* 17: 1195-1204.
- Malhi, Y., Baldocchi, D.D. & Jarvis, P.G.** 1999. The carbon balance of tropical, temperate and boreal forest. *Plant, Cell and Environment* 22: 715 – 740.
- Marschner, H.** 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Marx, S.P., Nosberger, J. & Frehner, M.** 1997. Seasonal variation of fructan- β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β -(2,1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). *New Phytologist* 135: 267-277.
- 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.
- Menaut, J.C.** 1983. The vegetation of African Savannas.
- 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.
- Migletta, F., Magliulo, V., Bindi, M., Cerio, L., Vaccari, F.P., Luduca, V. & Peressotti, A.** 1998. Free air CO₂ enrichment of potato (*Solanum tuberosum* L.): development, growth and yield. *Global Change Biology* 4: 163-172.
- Miller, A., Tsai, C-H., Hemphill, D., Endres, M., Rodermal, S. & Spalding, M.** 1997. Elevated CO₂ effects during leaf ontogeny. *Plant Physiology* 115: 1195-1200.
- 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.

- 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.
- Pessoni, R.A.B., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Braga, M.R.** 1999. Extracellular inulinases from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (Asteraceae). *Journal of Applied Microbiology* 86: 141-147.
- 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.
- 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.

- Poorter, H.** 1993. Interspecific variation in the growth response of plants to an elevated and ambiente CO₂ concentration. *Vegetation* 104/105: 77-97
- Poorter, H. & Navas, M-L.** 2003. Plant grown and competition at elevated CO₂: on winners, losers and functional groups. *New Phytologist* 157: 175-198.
- 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.T. & Carvalho, M.A.M.** 2006. Spatial distribution of fructans and fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby in different developmental phases. *Plant Science* 170: 624-633.
- Pritchard, S.G., Rogers, H.H., Prior, S.A., Peterson, C.M.** 1999. Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Global Change Biology* 5: 807 – 837.
- Prud’homme, M.P. & Gonzalez, B. Billard, J.P. & Boucaud, J.** 1992. Carbohydrate content, fructan and sucrose enzymes activities in roots, stubble and leaves of ryegrass (*Lolium perenne*) as affected by source/sink modification after cutting. *Journal of Plant Physiology* 140: 282 – 291.
- Qaderi, M.M., Kurepin, L.V. & Reid, D.M.** 2006. Growth and physiological responses of canola (*Brassica napus*) to three components of global climate change: temperature, carbon dioxide and drought. *Physiologia Plantarum* 128: 710-721.
- Ranasinghe, S. & Taylor, G.** 1996. Mechanism for increased leaf growth in elevated CO₂. *Journal of Experimental Botany* 47: 349-358.
- Ribeiro Sobrinho, D.S., Buckeridge, M. S. & Carvalho, M.A.M.** 1996. Fructan hydrolase from rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby and its role in fructan mobilization. In Third International Fructan Conference, Utah. Abstracts, Third International Fructan Conference, Utah, p.45.

- 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.
- Rutherford, P.P & Deacon, A.C.** 1974. Seasonal variation in dandelion roots of fructosan composition, metabolism and response to treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Annals of Botany* 38: 251-260.
- Scarascia-Mugnozza, G.E., Karnosky, D.F., Ceulemans, R. & Innes, J.L.** 2001. The impact of CO₂ and other greenhouse gases on forest ecosystems: an introduction. CAB International.
- Scurlock, J.M.O. & Hall, D.O.** 1998. The global carbon sink, a grassland perspective. *Global Change Biology* 4: 229-233.
- Sild, E., Younis, S., Pleijel, H. & Selldén, G.** 1999. Effect of CO₂ enrichment on non-structural carbohydrates in leaves, stems and ears of spring wheat. *Physiologia Plantarum* 107: 60-67.
- Simmen, U., Obenland, D., Boller, T. & Wiemken, A.** 1993. Fructan synthesis in excised barley leaves. *Plant Physiology* 101: 459-468.
- Smart, D.R., Chatterton, N.J. & Bugbee, B.** 1994. The influence of elevated CO₂ on non-structural carbohydrate distribution and fructan accumulation in wheat canopies. *Plant, Cell and Environmental* 17: 435 – 442.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-63.
- Stellen, W., Noble, I., Canadell, J., Apps, M., Schulze, E.D., Jarvis, P.G., Baldocchi, D., Ciais, P., Cramer, W., Ehleringer, J., Farquhar, G., Field, C.B., Ghazi, A., Gifford,**

- R., Heimann, M., Houghton, R., Kabat, P., Körner, C., Lambin, E., Linder, S., Mooney, H.A., Murdiyarso, D., Post, W.M., Prentice, C., Raupach, M.R., Schimel, D.S., Shvidenko, A. & Valentini, R.** 1998. The terrestrial carbon cycle: implications for the Kyoto protocol. *Science* 280: 1393 – 1394.
- Stitt, M.** 1991. Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environmental* 14: 741 – 762.
- Taylor, J.A. & Lloyd, J.** 1992. Sources and sinks of atmospheric CO₂. *Australian Journal of Botany* 40: 407 – 418.
- Taylor, G., Ranasinghe, S., Bosac, C., Gardner, S.D.L. & Ferris, R.** 1994. Elevated CO₂ and plant growth: cellular mechanisms and responses of whole plants. *Journal of Experimental Botany* 45: 1761-1774.
- Teng, N., Wang, J., Chen, T., Wu, X., Wang, Y. & Lin, J.** 2006. Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 172: 92-103.
- 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.
- Usuda, H.** 2004. Effect of growth under elevated CO₂ on the capacity of photosynthesis in two radish cultivars differing in capacity of storage root. *Plant Production Science* 7: 386 – 396.
- 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. & 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.
- 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.
- Wheeler, T.R., Morison, J.L.L., Ellis, R.H. & Hadley, P.** 1994. The effect of CO₂, temperature and their interaction on the growth and yield of carrot (*Daucus carota* L.). Plant, Cell and Environment 17: 1275-1284.
- Williams, R.F.** 1946. The physiology of plant growth with special reference to the concept of net assimilation rate. Annals of Botany 10: 41-72.