



ARETUSA DANIELA RESENDE MENDES

**DINÂMICA DA COMPOSIÇÃO ORGÂNICA E
MINERAL EM FOLHAS EM DIFERENTES
ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EM
SERINGUEIRA**

LAVRAS - MG

2010

ARETUSA DANIELA RESENDE MENDES

**DINÂMICA DA COMPOSIÇÃO ORGÂNICA E MINERAL EM FOLHAS
EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EM
SERINGUEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS - MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Mendes, Aretusa Daniela Resende.

Dinâmica da composição orgânica e mineral em folhas em diferentes estádios de desenvolvimento em seringueira / Aretusa Daniela Resende Mendes. – Lavras : UFLA, 2010.

70 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Bibliografia.

1. Redistribuição de nutrientes. 2. Atividade enzimática. 3. Desenvolvimento foliar. 4. *Hevea brasiliensis*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 581.13

ARETUSA DANIELA RESENDE MENDES

**DINÂMICA DA COMPOSIÇÃO ORGÂNICA E MINERAL EM FOLHAS
EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EM
SERINGUEIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de julho de 2010

Dr. Antônio de Pádua Alvarenga EPAMIG

Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome UFLA

Dr. Nelson Delú Filho FEM

Dr. Paulo Araquém Ramos Cairo UESB

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

Orientador

**LAVRAS – MG
2010**

*A Deus,
criador e mantenedor de tudo. A Ele seja dada toda a honra e méritos
por me conceder mais esta vitória em minha vida. E se Ele é por nós,
quem será contra nós? Ninguém!*

*Aos meus pais,
pelo amor, incentivo e confiança, fornecendo-me forças para alcançar
minhas metas, com todo o meu amor. Sem vocês seria completamente
impossível chegar até aqui.*

*Aos meus irmãos,
pela amizade e companheirismo existente entre nós, os quais são de
grande importância na minha vida.*

*Aos meus sobrinhos Pedro, Matheus, Ana e Sofia,
pelo carinho e alegria que trouxeram para minha vida.*

OFEREÇO

A todos que nada dessa vida levaram, mas deixaram,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia/Setor Fisiologia Vegetal, pela valiosa oportunidade de realizar o doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento de parte deste projeto.

A todos os familiares e amigos que participaram dessa etapa da minha vida profissional, especialmente a Cezar e família, Marilza, Daniela, Karina, Adriana Lima, Thiago, Elma e Suerlani, novas amizades iniciadas em Lavras.

Ao Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira, pela orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome (DBI/UFLA), pelas idéias durante a realização deste trabalho.

A Prof. Dra. Janice Guedes de Carvalho (DCS/UFLA), pela orientação, apoio e ensinamentos na condução deste trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica Karina e Paulo, pela preciosa contribuição prestada, sempre que necessário.

Aos Dr. Antonio de Pádua, Dr. Paulo Cairo; Dr. Alessandro Mesquita e Dr. Nelson Delú por participarem da banca examinadora.

Ao José Osvaldo Lima Salgado, Luiz, Reinildo e Reinaldo pela disponibilidade de ajudar sempre que necessário e pelo auxílio na fazenda.

Aos meus grandes exemplos, amigos e eternos orientadores: Prof. Dr. Ernane R. Martins (UFMG-ICA) e Prof. Dr. Luiz Arnaldo Fernandes (UFMG-ICA) pela amizade, incentivo, apoio, e orientação. MUITO OBRIGADO!

Aos professores do setor de Fisiologia Vegetal, em especial o Prof. Dr. José Donizeti Alves, por todos ensinamentos transmitidos. Aos funcionários do DBI/UFLA e colegas de pós-graduação, pela convivência, atenção, auxílio na realização deste trabalho.

RESUMO

A seringueira na fase adulta possui um crescimento intermitente com o processo de troca de folhas que é caracterizado pela senescência, esse é um mecanismo que as árvores reciclam os nutrientes tanto no ciclo bioquímico, como biogeoquímico. Estudos sobre o comportamento dos compostos orgânicos e minerais nos diferentes estádios foliares são necessários, pois a conservação destes compostos é importante, pois os seringais são implantados em solos de baixa fertilidade. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a dinâmica dos nutrientes minerais e compostos orgânicos como carboidratos, aminoácidos livres e proteínas solúveis, durante o desenvolvimento foliar de seringueira, bem como algumas enzimas presentes no metabolismo do carbono e nitrogênio. As folhas utilizadas foram provenientes de plantas do clone RRIM-600, de um seringal localizado em Nepomuceno, MG. Foram selecionados oito indivíduos adultos que possuíam folhas nos diferentes estádios (B1, B2, C e D) e folhas senescentes (Sen.). As folhas nos estádios B1, B2, C e D foram coletadas das árvores nos quatro pontos ortogonais e as senescentes foram coletadas no solo após a agitação mecânica dos galhos. As folhas coletadas foram separadas em duas amostras. Uma amostra foi utilizada para a avaliação dos nutrientes minerais, nitrato e amônio, utilizando a matéria seca. A outra amostra foi para quantificar proteínas solúveis, aminoácidos livres, açúcares redutores e solúveis totais, sacarose, bem como a atividade das enzimas invertases solúveis, sintetase glutamina (GS), desidrogenase do glutamato (GDH) e sintase do glutamato dependente da ferredoxina (Fd-GOGAT), utilizando a matéria fresca. Observou-se que os nutrientes N, P, K, S, Cu e Zn diminuíram os seus teores no desenvolvimento foliar da seringueira, já para Ca, Mg, B, Fe e Mn verificou-se um comportamento inverso. A redistribuição foi maior para os nutrientes N, P, K e Cu. O teor do amônio diminuiu durante o desenvolvimento foliar até a senescência. As atividades específicas das enzimas GS e Fd-GOGAT foram maiores no estágio B2. A GDH apresentou maior atividade nos estádios B1 e B2. Os aminoácidos apresentaram maiores quantidades no estágio D e B1. As proteínas solúveis totais apresentaram maiores teores nos estádios C e D, nestes estádios as folhas estão com alta atividade metabólica. As maiores concentrações de açúcares no desenvolvimento foliar de seringueira foram observadas no estágio D. Com relação às enzimas de hidrólise da sacarose, a invertase ácida solúvel apresentou uma atividade específica superior à invertase neutra durante todos os estádios de desenvolvimento, a maior atividade específica das invertases solúveis foram no estágio B.

Palavras chaves: Redistribuição de nutrientes. Atividade enzimática. Desenvolvimento foliar. *Hevea brasiliensis*.

ABSTRACT

The rubber tree in the adult phase possesses intermittent growth with the leaf change process that is characterized by senescence, which is a mechanism by which the trees recycle nutrients in the biochemical, as well as biogeochemical cycles. Studies on the behavior of the organic compounds and minerals in the different stages leaf are necessary, because the conservation of these compounds is important, keeping in mind that the rubber plantations are implanted in low fertility soils. Based on the above, the objective of this work was to evaluate the dynamics of the mineral nutrients and organic compounds, such as carbohydrates, free amino acids and soluble proteins, during the leaf development of the rubber tree, as well as some enzymes present in the carbon and nitrogen metabolism. The leaves used were from plants of the clone RRIM-600, from a rubber tree plantation located in Nepomuceno, MG. Eight adult individuals were selected that possessed leaves at different stages (B1, B2, C and D) and senescent leaves (Sen.). The leaves at stages B1, B2, C and D were collected from the trees at the four orthogonal points and the senescent leaves were collected on the soil after the mechanical agitation of the branches. The collected leaves were separated into two samples. One sample was used for the evaluation of the mineral nutrients, nitrate and ammonium, using the leaf dry matter. The other sample was to quantify soluble proteins, free amino acids, reducing and total soluble sugars, sucrose, as well as the soluble enzymes invertase activity, glutamine synthetase (GS), glutamate dehydrogenase (GDH) and ferredoxina dependent glutamate sintase (Fd-GOGAT), using the fresh matter of the leaves. It was observed that the nutrient levels of N, P, K, S, Cu and Zn were reduced in the leaf development of the rubber tree, however for Ca, Mg, B, Fe and Mn an inverse behavior was verified. The redistribution was higher for the nutrients N, P, K and Cu. The ammonium level decreased during the leaf development until senescence. The GS and Fd-GOGAT specific enzyme activities were higher in the B2 stage. GDH presented higher activity in the B1 and stages B2. The amino acids presented higher amounts at the D and B1 stages. The total soluble proteins presented higher levels at stages C and D, at these stages the leaves are under high metabolic activity. The highest sugar concentrations in the leaf development of the rubber tree were observed at stage D. Regarding the sucrose hydrolysis enzymes, the soluble acid invertase presented a specific activity upper to the neutral invertase during all of the development stages, the highest specific activity of the soluble invertases was in stage B.

Key words: Redistribution of nutrients. Enzymatic activity. Leaf development. *Hevea brasiliensis*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Importância econômica.....	13
2.2	Ciclo da seringueira.....	14
2.3	Desenvolvimento foliar.....	16
2.4	Importância dos nutrientes minerais em seringueira.....	19
2.5	Ciclagem dos nutrientes minerais em seringueira	20
2.6	Nitrogênio no solo e na planta.....	22
2.7	Carboidratos entre tecidos fonte e tecidos dreno.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	Obtenção do material vegetal.....	29
3.2	Caracterização química do solo.....	31
3.3	Análise mineral e das formas nitrogenadas das folhas.....	32
3.4	Extração e atividade das invertases solúveis, quantificação de proteínas solúveis, aminoácidos livres, açúcares redutores, açúcares solúveis totais e sacarose.....	32
3.5	Extração e ensaio da sintetase da glutamina e da desidrogenase do glutamato.....	34
3.6	Extração e ensaio da sintase do glutamato dependente de ferredoxina.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	Teores dos nutrientes minerais nos diferentes estádios foliares...	37
4.2	Formas nitrogenadas nos diferentes estádios foliares de seringueira.....	45

4.3	Atividade das enzimas do metabolismo do nitrogênio nos diferentes estádios foliares de seringueira.....	48
4.4	Avaliações bioquímicas e da atividade das invertases solúveis nos diferentes estádios foliares de seringueira.....	52
5	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A seringueira (*Hevea brasiliensis* [(Willd. ex. ADR. Jussieu.) Muell. Arg.]) é a principal espécie explorada comercialmente para a produção de borracha natural. No Brasil a heveicultura vem se destacando cada vez mais na região sudeste, entre os estados dessa região, Minas Gerais se destaca por apresentar crescimento anual de 29,7% (ROSADO; PIRES; SANTOS, 2006).

A expansão do cultivo da seringueira tem explorado diversas condições edafoclimáticas, essa diversidade impõe o desenvolvimento de tecnologias de cultivo e exploração mais apropriadas para cada região. Para seringueira, estudos sobre o comportamento dos compostos orgânicos e minerais nos diferentes estádios da ontogenia foliar é necessário, pois a conservação destes compostos é importante, principalmente nas regiões de expansão que implantam os seringais em solos de baixa fertilidade.

A seringueira é uma árvore decídua quando adulta. Na região sudeste a queda das folhas ocorre nos meses de junho e julho, e as novas folhas emergem em agosto. Esse comportamento decíduo depende da constituição genética, da intensidade e duração do déficit hídrico na estação seca e também das condições de nutrição mineral (BATAGLIA et al., 1999).

A senescência representa o estágio final de desenvolvimento foliar e é caracterizada pela redistribuição dos compostos minerais e orgânicos das folhas senescentes, que são tecidos velhos, para os tecidos novos, isso ocorre através do ciclo bioquímico, esse ciclo diz respeito à transferência dos compostos minerais e orgânicos no próprio interior da biomassa (CALDEIRA et al., 1999).

Os nutrientes minerais na planta tem sido objeto de estudo por várias décadas, principalmente de plantas de interesse econômico. Mais recentemente, tem investigado as concentrações nutricionais, bem como a distribuição dos nutrientes nas árvores, que é fundamental para estabelecer estratégias de

amostragem com a finalidade de estudar o estado nutricional, ciclagem e exportação (CALDEIRA et al., 1999). Normalmente, a redistribuição de nutrientes dos tecidos senescentes para os tecidos em formação constitui a principal forma de transferência de nutrientes interna da árvore.

O comportamento dos nutrientes minerais em folhas de seringueira, nos diferentes estádios de desenvolvimento e na senescência tem sido pouco estudado, no entanto, as informações sobre o acúmulo e redistribuição de nutrientes na planta, auxiliaria na adequação de manejos culturais adequados para os seringais que são instalados em solos marginais.

Dentre os minerais essenciais, o nitrogênio é um elemento mineral que as plantas necessitam em grandes quantidades. Ele é importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois é um constituinte essencial de muitos componentes celulares, incluindo aminoácidos e ácidos nucleicos. Além disso, este elemento participa da composição química de diversas substâncias essenciais ao metabolismo da planta (PALLARDY, 2008).

O metabolismo do nitrogênio está intimamente interligado ao metabolismo do carbono, em diversas etapas do metabolismo vegetal. Em seringueira, o metabolismo do carbono tem sido investigado, principalmente com o propósito de compreender melhor os diferentes aspectos que envolvem a ecofisiologia e o desempenho produtivo da espécie, sob condições ambientais distintas. Os estudos têm focado especialmente nas etapas que envolvem os processos de absorção, fixação e assimilação de carbono a partir do CO₂ do ar atmosférico, na síntese de carboidratos primários nos tecidos fonte, no transporte de sacarose e sua degradação nos tecidos dreno. Assim, permanecem escassas as informações, acerca dos aspectos bioquímicos que envolvem não apenas a assimilação de CO₂, como também o transporte de carbono a partir dos locais de síntese primária de carboidratos simples (fontes) e o consumo dos assimilados nos órgãos que os utilizam (drenos).

Para a grande maioria das espécies cultivadas, sobretudo aquelas de ciclo anual e de clima temperado, o metabolismo do nitrogênio e do carbono, desde as formas preferenciais de absorção, até sua assimilação e transporte no interior da planta, tem sido satisfatoriamente estudado. O mesmo não ocorrendo para espécies arbóreas, onde os trabalhos sobre o tema são escassos. Particularmente, em relação à seringueira, alguns trabalhos nesta linha têm sido desenvolvidos pelo grupo de pesquisa *Hevea* da Universidade Federal de Lavras, cujo objetivo prioritário é conhecer as formas de absorção, assimilação e transporte do nitrogênio e do carbono em plantas de seringueira. O conhecimento do metabolismo do nitrogênio e do carbono, no desenvolvimento foliar é de fundamental importância para a cultura, uma vez que, o comportamento fisiológico desta espécie é altamente influenciado por estes.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a dinâmica dos nutrientes minerais e compostos orgânicos como carboidratos, aminoácidos livres e proteínas solúveis, durante o desenvolvimento foliar de seringueira, bem como algumas enzimas presentes no metabolismo do carbono e nitrogênio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica da seringueira

A seringueira pertence ao gênero *Hevea*, da família Euphorbiaceae. O gênero possui onze espécies conhecidas, das quais a *Hevea brasiliensis* [(Willd. ex. ADR. Jussieu.) Muell. Arg.] é a mais importante, por ser a única plantada e explorada comercialmente e apresenta maior capacidade produtiva e melhor qualidade do látex (SECCO, 2008). A borracha natural obtida no seringal é matéria-prima agrícola importante para a manufatura de uma grande quantidade de produtos, considerada estratégica e indispensável na produção de artigos essenciais para a humanidade.

A atual produção mundial de borracha natural tem se mostrado insuficiente para atender a demanda que vem aumentando significativamente a cada ano. Isto tem causado uma escassez de matéria-prima, a qual tem sido suprida, em parte, pela utilização da borracha proveniente do petróleo. As grandes oscilações de preço de mercado do petróleo e a poluição causada pela queima deste recurso não renovável apontam para uma tendência de redução no consumo de borracha sintética. Além disso, em muitos casos, a borracha natural é insubstituível, devido às suas características químicas e físicas (ROSADO; PIRES; SANTOS, 2006). Desta forma a heveicultura tem se apresentado como uma atividade promissora.

O aumento da demanda da borracha natural levou várias regiões no mundo a iniciar seu cultivo em larga escala. Os maiores produtores de borracha natural são os países da Ásia, os quais sempre tiveram o sistema de produção de borracha comercial e empregam tecnologias, como clones melhorados e tratamentos culturais adequados.

Na América Latina o sistema de produção de borracha natural vem se tornando comercial, sendo que anteriormente havia somente o extrativismo nas áreas de origem da espécie. O Brasil possui em relação aos demais países produtores, áreas incomparavelmente mais aptas ao plantio de seringueira. No entanto, pouco contribui para a produção mundial (DALL'ANTONIA et al., 2006). A produção nacional atende apenas 1/3 do mercado brasileiro, sendo o restante importado dos países asiáticos.

A expansão da heveicultura é a saída para minimizar a importação do produto na busca da auto-suficiência ou, até mesmo, ocupar novamente uma posição de relevância na produção mundial. O plantio de seringueira no país vem se expandindo, notadamente em diferentes regiões, cujas áreas possuem condições climáticas contrastantes da origem da espécie, justificadas pela busca de condições climáticas desfavoráveis ao desenvolvimento do fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) von Arx., que restringe a utilização de clones de alta produção, especialmente os “orientais”, que são normalmente susceptíveis a esse fungo.

Os maiores produtores brasileiros, atualmente, são os estados de São Paulo, Mato Grosso, Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais, participando, respectivamente, com 53%, 18%, 13%, 5% e 3% da produção nacional. Na última década, pode-se observar alta taxa de crescimento da área plantada nestes estados, destacando-se Minas Gerais com 29,7% de crescimento anual (ROSADO; PIRES; SANTOS, 2006).

2.2 Ciclo de cultivo da seringueira

A seringueira é uma cultura que tem, nas diversas fases do seu ciclo, uma estreita dependência de variáveis do ambiente físico (SÁ, 2000). As seringueiras cultivadas podem ser classificadas em três fases distintas: fase de viveiro, fase de desenvolvimento e fase de produção.

A fase de viveiro envolve o período de plantio das sementes do porta-enxerto, a enxertia e o crescimento do enxerto (clone), até que o mesmo apresente dois lançamentos maduros. Ao contrário das demais fases, a fase de viveiro é relativamente rápida, dura em torno de um ano (CARVALHO; BATISTA, 2004).

A fase de desenvolvimento, também conhecida como período de imaturidade, ocorre durante os três primeiros anos de vida, após o transplante da muda para o campo. As plantas jovens de seringueira crescem ativamente com fluxos contínuos de lançamento de novas folhas. É um período de intenso crescimento vegetativo, com grande demanda de nutrientes para a formação de tecidos no caule, galhos, folhas e raízes. Posteriormente, quando se inicia um crescimento intermitente com o processo de troca de folhas, sobretudo durante o inverno, as plantas são consideradas adultas (BATAGLIA et al., 1999). Esse comportamento decíduo da seringueira, caracterizado pela senescência, queda das folhas e reenfolhamento, depende da constituição genética, da intensidade e duração do déficit hídrico na estação seca e também das condições de nutrição mineral (GONÇALVES et al., 1989; BATAGLIA et al., 1999).

A fase de produção envolve o período de exploração do seringal, ou seja, quando as plantas estão aptas para iniciar a sangria. Após o início da sangria, observa-se uma redução no ritmo de crescimento das plantas, que se deve a uma alteração na relação fonte-dreno, tendo em vista que a partição de fotoassimilados, antes direcionadas apenas para o crescimento, também passa a ser dirigida à reconstituição do látex extraído através da sangria (VIRGENS FILHO, 2008). A produção de látex (borracha) em um seringal pode se prolongar por mais de 30 anos.

2.3 Desenvolvimento foliar

As folhas de seringueira são trifoliadas, com pecíolo longo; a base engrossada no pulvino exibe 3 (1-3) glândulas na junção dos pecíolos, com disposição espiralada para direita. Em cada brotação as primeiras folhas são maiores e mais distanciadas entre si, com adensamento terminal de folhas menores para o ápice. O folíolo central é pouco diferente dos laterais, comumente um pouco maior e com a base um pouco mais estreita (SECCO, 2008).

Os ciclos da ontogenia foliar de plantas de seringueira compreendem quatro estádios A, B, C e D (Figura 1), relacionadas com o nível de atividade do meristema apical e com as fases de desenvolvimento foliar (HALLÉ; OLDEMAN; TOMLINSON, 1978).

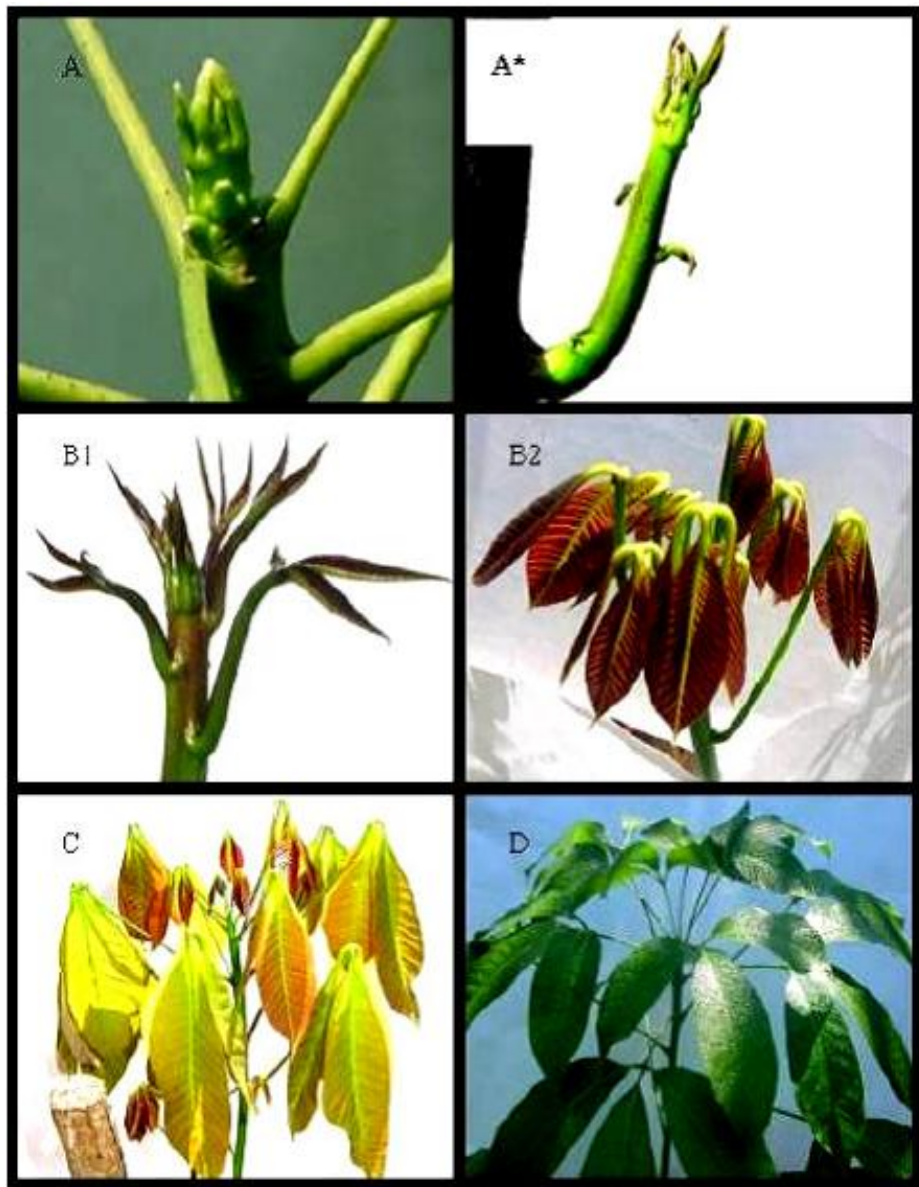


Figura 1 Ilustrações dos diferentes estádios foliares, A (A gema apical e A* gema vegetativa), B (B1 e B2), C e D, durante a ontogenia foliar de seringueira, em condições de campo
Fonte Miguel (2005)

No estágio A, a gema apical, anteriormente em repouso, entra em atividade de divisão celular e morfogênese (formação de primórdios foliares e gemas axilares). O intumescimento de gema é facilmente visível, graças ao afastamento das escamas protetoras que expõem as interiores. Esse estágio tem duração média de nove dias.

No estágio B, correspondente à fase de alongamento, a atividade mitótica (divisão celular) no meristema apical reduz-se sensivelmente a partir do início do alongamento, sendo quase nula quando o crescimento torna-se mais rápido, ficando restrita ao folíolo, a gema em desenvolvimento e ao meristema subapical, responsável pelo crescimento longitudinal, juntamente com o alongamento celular. Neste estágio, que dura, em média 10 dias são caracterizados dois subestádios. No B1, os folíolos estão na posição vertical com o ápice voltado para cima, fortemente carregados de antocianinas. Os primórdios basais formam escamas ou catafilos, que portam uma gema axilar, com maior distância entre si do que entre as folhas verdadeiras. Nesses catafilos, há geralmente, nectários extraflorais visitados por formigas. No B2, os ápices dos folíolos estão voltados para baixo, com coloração antociânica intensa.

No estágio C, os folíolos encontram-se pendentes, flácidos e de cor verde. Os últimos primórdios foliares, que chegam a atingir o formato de pequeninas folhas trifoliadas, abortam e caem em seguida. Os primórdios foliares que surgem após as folhas pequenas que caem não se desenvolvem até o estágio de folhas, mas transformam-se em escamas que protegem o meristema apical e os primórdios foliares internos, paralisando o crescimento. A duração é de cerca de oito dias.

O estágio D corresponde à fase de dormência da gema apical com folhas totalmente expandidas e amadurecidas. Esta fase dura, geralmente, 13 dias sob condições normais de crescimento ativo (HALLÉ; OLDEMAN; TOMLINSON, 1978). Segundo Miguel (2005) neste estágio ocorre maior a fotossíntese líquida,

sendo também acompanhada por maiores teores de clorofilas, da eficiência fotoquímica do fotossistema II, da eficiência de carboxilação, da condutância estomática, da transpiração e da eficiência no uso da água, paralelamente à formação e estruturação dos tecidos parenquimáticos foliares, do limbo foliar e maior densidade estomática.

A seringueira é uma árvore caducifólia, a senescência é o estágio final de desenvolvimento da folha. A senescência é definida como um processo altamente regulado, durante o qual, vários mecanismos metabólicos são ativados, enquanto que outros são inativados. Durante a senescência, inúmeras alterações ocorrem no órgão para o reaproveitamento de nutrientes importantes, como o fósforo e o nitrogênio (LIM; KIM; NAM, 2007).

2.4 Importância dos nutrientes minerais em seringueira

A recomendação correta de adubação para uma cultura depende de um grande volume de experimentação, o que se torna bastante difícil no caso de plantas perenes, em especial a seringueira. O conhecimento do estado nutricional da seringueira é um requisito básico para a recomendação adequada de fertilizantes, visando aumentar a produtividade. A avaliação, tanto de solos como de folhas, tem servido de base para a discriminação de adubação, de acordo com o tipo de solo e com o estado de nutrição das plantas (BATAGLIA; CARDOSO; CARRETERO, 1988).

Estudos sobre a nutrição mineral da seringueira e o uso correto de adubos foram realizados por Bataglia, Cardoso e Carretero (1988), Falcão (1996), Murbach (1997), Bataglia e Santos (1998), Murbach et al. (1999), Virgens Filho; Moreira e Castro (2001), Carmo et al. (2002), Carvalho e Batista (2004) e Roque et al. (2004), nos quais foram analisados os efeitos dos adubos no desenvolvimento das árvores e na produção de borracha.

Bataglia, Cardoso e Carretero (1988) comparando seringais com diferentes níveis de produtividade, verificaram por meio de análise de folha, que os nutrientes nitrogênio (N) e potássio (K), foram os que mais estiveram relacionados com as maiores produtividades.

Carmo et al. (2002), analisando 25 seringais em produção, na Zona da Mata de Minas Gerais, observaram que a maioria dos seringais encontra-se implantado em solo de baixa fertilidade, e que a produção de borracha foi menor nos seringais que apresentavam baixos teores de N e K nos solos e nas folhas.

Os autores Virgens Filho, Moreira e Castro (2001) avaliaram o efeito da calagem e da adubação nitrogenada, fosfatada e potássica sobre o estado nutricional e produção de borracha, em seringueiras com 16 anos de campo, cultivadas no Planalto Ocidental Paulista e verificaram que a adubação com NPK incrementou o teor foliar de P e enxofre (S), apenas na presença de calagem. Os teores foliares de N, P, S, cobre (Cu) e zinco (Zn) foram afetados negativamente pela ausência da calagem e da adubação, enquanto os teores de K, cálcio (Ca), magnésio (Mg), boro (B), ferro (Fe) e manganês (Mn) não apresentaram diferenças significativas. A maior produção de borracha seca foi obtida na presença de calagem com as seguintes doses $N= 80 \text{ kg.ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$; $P= 17,5 \text{ kg.ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$ e $K= 33 \text{ kg.ha}^{-1}\text{ano}^{-1}$.

2.5 Ciclagem dos nutrientes minerais em seringueira

Estudos relacionados à ciclagem de nutrientes em várias espécies já foram feitos por diversos autores como, por exemplo, em *Eucalyptus* sp., estudado por Tuner e Lambert (2008); *Eucalyptus globulus* por Schumacher e Caldeira (2001) e Schumacher (1998); *Acacia mearnsii* por Caldeira et al. (1999) e Caldeira et al. (2000), *Hevea brasiliensis* e *Pinus oocarpa*, por Silvia,

Santos e Paiva (1998) e Rodrigues et al. (2000), *Pinus* e *Eucalyptus* por Schumacher et al. (2004), *Tapirira guianensis* por Nascimento et al. (2007).

A variação dos nutrientes minerais depende de vários fatores, entre eles pragas e doenças, idade das árvores e das folhas, posição na copa, estação do ano, disponibilidade do nutriente no solo e características nutricionais de cada espécie (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

A idade da folha merece destaque, por afetar a distribuição dos nutrientes, em função da redistribuição de determinados nutrientes móveis para outros órgãos, como folhas novas, órgãos de reserva, frutos e regiões de crescimento antes da abscisão (CALDEIRA et al., 1999). Esta é uma das maneiras utilizadas pela planta para conservar parte dos nutrientes absorvidos.

A seringueira é uma árvore decídua, em que a queda das folhas normalmente ocorre nos meses de junho e julho, e as novas folhas emergem em agosto. Esse comportamento decíduo depende da constituição genética, da intensidade e duração do déficit hídrico na estação seca e também das condições de nutrição mineral (BATAGLIA et al., 1999).

A reciclagem dos compostos orgânicos e minerais na senescência e na abscisão das folhas ocorre através do ciclo bioquímico e do biogeoquímico. O ciclo bioquímico envolve a redistribuição dos compostos minerais de tecidos velhos para os novos da planta, ou seja, diz respeito à transferência dos compostos minerais no próprio interior da biomassa (CALDEIRA et al., 1999). Os fluxos de nutrientes no ciclo bioquímico são controlados por mecanismos de conservação, o qual para cultura da seringueira, torna-se essencial, pois a maioria dos seringais ocorre em solos de baixa fertilidade.

Silvia, Santos e Paiva (1998) avaliando a translocação de nutrientes minerais em seringueira, verificaram que os teores foliares de N, P, K e Mg diminuíram com o aumento da idade da folha. Por outro lado, os teores de Ca aumentaram com a idade da folha, apresentando teores significativamente

inferiores nas folhas jovens, por ser imóveis na planta. Os teores de S não apresentaram um padrão de variação definido. A ordem relativa da concentração de macronutrientes nas folhas da seringueira foi: $K > N > Ca > P > S > Mg$.

Resultados semelhantes aos citados anteriormente foram observados por Rodrigues et al. (2000), que concluíram que a redistribuição de N, P e K desempenham um papel importante na nutrição da seringueira.

2.6 Nitrogênio no solo e na planta

Dentre os minerais essenciais, o nitrogênio (N) é o que se encontra em maiores quantidades nos vegetais, sendo de fundamental importância na produção de biomassa. Além disso, este elemento participa da composição química de diversas substâncias essenciais ao metabolismo da planta, como clorofilas, proteínas, enzimas, fitormônios, poliaminas e moléculas do metabolismo secundário, tais como alcalóides (PALLARDY, 2008).

As principais formas de nitrogênio no solo são as formas orgânicas, e apenas uma pequena parte do N total encontra-se nas formas minerais de amônio (NH_4^+) e de nitrato (NO_3^-), que são as formas de absorção de N pela planta. Os teores de N inorgânico são altamente dinâmicos no solo, sendo alterados constantemente, em razão dos processos de mineralização, através da amonificação e aminação da matéria orgânica e da imobilização, pelos microorganismos (VALÉRIO, 2002), o que nem sempre ocasiona eficiência no seu aproveitamento pelas plantas.

Na maioria das espécies a forma preferencial de absorção de nitrogênio é o nitrato, uma vez que altos níveis de amônio são tóxicos para as plantas. Assim, quando absorvido pelas plantas, o nitrato (NO_3^-) pode ser reduzido a amônio (NH_4^+) por meio da ação sequencial das enzimas redutase de nitrato e redutase do nitrito. A primeira etapa da assimilação é a redução de NO_3^- a NO_2^- ,

no citoplasma celular pela ação catalítica da enzima redutase de nitrato. O nitrito (NO_2^-) é um íon altamente reativo, potencialmente tóxico. As células vegetais transportam imediatamente o NO_2^- gerado durante a redução de nitrato do citosol, para os cloroplastos nas folhas e plastídeos nas raízes. Nessas organelas, a enzima redutase do nitrito reduz NO_2^- a NH_4^+ e este é incorporado a compostos orgânicos, como aminoácidos e amidas.

Em geral, quando as raízes recebem pequenas quantidades de nitrato, o mesmo é reduzido, principalmente nesses órgãos. Entretanto, à medida que o suprimento de nitrato aumenta, uma proporção maior de nitrato absorvido é translocada para a parte aérea, onde é assimilado (MARSCHNER, 1995). Mesmo sob condições similares de disponibilidade de nitrato, o balanço do metabolismo do nitrato entre raízes e a parte aérea varia de espécie para espécie. Em plantas jovens de seringueira essa enzima é ativa apenas no sistema radicular (DELÚ FILHO et al., 1998), apesar de não existir nenhum relato sobre esse processo em árvores adultas, tudo indica que em seringueira que a assimilação do nitrato ocorre exclusivamente na raiz. A redução do nitrato no sistema radicular pode representar uma vantagem, pois sendo a seringueira uma planta decídua, na época de reenfolhamento, o seu sistema de redução do nitrato estaria intacto para exercer tal função, não ficando dependente da retranslocação de N-orgânico de outras partes da planta.

O amônio presente nas células é convertido a aminoácidos, sendo o ácido glutâmico o principal aminoácido formado. A assimilação do N amoniacal em aminoácidos depende diretamente de duas enzimas: a sintetase da glutamina (GS) e a sintase do glutamato (GOGAT). A sintetase da glutamina (GS) catalisa a conversão de glutamato a glutamina, em uma reação dependente de ATP e um cátion bivalente como co-fator (Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Co^{2+}). Conhecem-se duas isoformas de GS nas plantas: uma presente no citosol (GS-1) e outra localizada nos cloroplastos ou nos plastídios (GS-2) das raízes (SODEK, 2004).

Em trabalho realizado com plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes concentrações de nitrato e amônio, Lemos et al. (1999) observaram que a atividade da GS foi aumentada quando nitrato foi adicionado ao meio de cultivo, sendo maior nas lâminas foliares do que nas raízes. Além disso, os autores verificaram uma alta correlação entre a atividade da GS nas lâminas foliares e raízes e a atividade da RN nas raízes, sugerindo que a GS radicular parece ser altamente dependente do amônio produzido nas raízes após a assimilação pela RN, o mesmo não ocorrendo nas lâminas foliares, pois neste sítio os altos valores de atividade da GS indicam que outras fontes de amônio, além daquele transportado via corrente transpiratória estão sendo utilizados como, por exemplo, o amônio liberado durante a fotorrespiração (WALLSGROVE et al., 1983) e outras reações que liberam amônio como o metabolismo da asparagina por meio da ação da asparaginase (LEA; ROBINSON; STEWART, 1990). Estes aspectos ainda precisam ser elucidados para a seringueira.

Resultados semelhantes aos de Lemos et al. (1999) foram observados por Delú Filho et al. (1998) os quais relataram maior atividade da GS em lâminas foliares de plantas jovens de seringueira, quando comparada com a atividade da enzima em raízes e atividade dessa enzima aumentou com a adição de nitrato ao meio. No entanto, resposta diferenciada foi observada por Alves (2001), que encontrou maior atividade da GS em raízes quando comparado com a atividade da enzima em lâminas foliares.

A enzima sintase do glutamato (GOGAT) catalisa a conversão de glutamina e 2-oxoglutarato em duas moléculas de glutamato. Duas diferentes formas da enzima estão presentes em plantas superiores, sendo que uma utiliza NADH como fonte de poder redutor e, a outra, a ferredoxina. A enzima dependente de ferredoxina está localizada nos cloroplastos de folhas e sua atividade aumenta durante o desenvolvimento das folhas, sob condições de luz e

está envolvida no metabolismo fotorrespiratório do nitrogênio. A atividade da enzima dependente de NADH tem sido detectada em tecidos não verdes, a exemplo de raízes e feixes vasculares de folhas em desenvolvimento. Nas raízes, a NADH-GOGAT está envolvida na assimilação do NH_4^+ absorvido na rizosfera.

Segundo Delú Filho et al. (1998) a alta atividade Fd-GOGAT é encontrada em lâminas foliares de plantas jovens de seringueira e seu aumento é diretamente proporcional à adição de nitrato ao meio de cultivo. O comportamento das enzimas GS/GOGAT nas folhas parece estar operando conjuntamente nesta espécie, com a GS fornecendo substrato para a Fd-GOGAT (LE MOS et al., 1999; DELÚ FILHO et al., 1998).

A compreensão da regulação da GS e GOGAT são bastante complexa. Dependendo do tecido da célula ou do compartimento celular em que essas enzimas se localizam ou do estágio de desenvolvimento do órgão vegetal, as atividades das enzimas são diferentes. Acredita-se que haja múltiplos controles de regulação atuando em nível gênico e/ou protéico que modificariam a atividade da GS. É importante considerar essa complexidade ao se estudar a GS e a GOGAT, pois as suas funções em conjunto com as de outras enzimas permitem à planta balancear o metabolismo do carbono e nitrogênio em diferentes órgãos e regiões celulares, nas diferentes horas do dia e sob diversas condições ambientais (MIFFLIN; HABASH, 2002).

O amônio pode ser assimilado através de uma rota alternativa, conhecida como rota da desidrogenase do glutamato (GDH). A enzima desidrogenase do glutamato catalisa a reação reversível que sintetiza ou desamina o glutamato. Uma forma NADH-dependente da GDH é encontrada nas mitocôndrias e uma forma NADPH-dependente ocorre nos cloroplastos de órgãos fotossintetizantes. Embora ambas as formas sejam relativamente abundantes, elas não podem substituir a rota da GS/GOGAT para assimilação do amônio, tendo como função

principal desaminar o glutamato. Stitt et al. (2002) sugerem que a GDH pode ter um papel cuja ação da enzima varia de acordo com as necessidades celulares, com relação aos conteúdos de glutamato e esqueletos carbônicos.

Após a redução de NO_3^- e assimilação de NH_4^+ nas raízes, os compostos nitrogenados são transportados, via xilema, para a parte aérea da planta. Dependendo das condições ambientais e concentração externa de nitrato e amônio, os compostos transportados são essencialmente aminoácidos. Desses, cerca de 20 são usados na formação de proteínas. Estas participam como enzimas nos processos metabólicos das plantas, tendo assim uma função funcional e estrutural. Daí a importância do nitrogênio para as plantas, pois é componente essencial dos aminoácidos, enzimas e coenzimas, dos ácidos nucleicos, dos nucleotídeos, das membranas, de vários hormônios e da molécula da clorofila entre outros metabólitos essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal.

2.7 Carboidratos entre tecidos fonte e tecidos dreno

Devido à presença maciça de compostos orgânicos (cerca de 90%) na constituição da matéria seca de todos os tecidos e produtos vegetais, o conhecimento sobre o metabolismo do carbono é considerado fundamental para compreensão dos processos fisiológicos, que promovem o crescimento e o desenvolvimento das plantas, os quais resultam da atividade fotossintética. O restante da matéria seca advém da absorção de nutrientes minerais do solo, os quais, apesar de requeridos em quantidades pequenas, são indispensáveis para a vida da planta. As contribuições isoladas da fotossíntese e da nutrição mineral para o crescimento são difíceis de quantificar, devido à estreita relação entre esses dois processos, de tal forma que deficiências em um, prejudicam o outro, direta e/ou indiretamente (OLIVEIRA et al., 2008).

A assimilação e a fixação do CO₂ ocorrem predominantemente nas células do mesofilo das folhas maduras. As folhas fotossinteticamente ativas produzem mais carboidratos do que consomem, portanto, atuam como fontes de carbono. Por outro lado, existem diferentes tecidos drenos que dependem de uma fonte exógena de açúcares (HO, 1988). O controle da integração entre o sistema fonte e dreno se dá pela forte relação existente entre os tecidos, sendo que a exportação de sacarose das células foliares é o principal fator de ligação entre a assimilação do carbono pela fonte e a sua utilização no dreno (ROITSCH; EHNE, 2000).

O transporte de carboidratos primários produzidos nas folhas visa o atendimento às demandas dos drenos, que são regiões de crescimento e desenvolvimento. Na maioria das plantas de importância agrícola, há uma hierarquia natural de órgãos que atuam como drenos importadores de fotoassimilados. Entretanto, nas plantas lenhosas, a natureza sazonal do seu desenvolvimento ocasiona, em maior ou menor intensidade, uma superposição de utilização de fotoassimilados, por diversos órgãos em crescimento (WARDLAW, 1990).

A sacarose é a forma de açúcar mais comumente transportada pela seiva nas plantas superiores e distribuída para os vários tecidos, em particular aos drenos formados por zonas de metabolismos ativos (JACOB et al., 1988). A sacarose tem que ser hidrolisada em hexoses, para sua utilização, uma reação que é mediada, tanto por invertases como por sacarose sintase.

As invertases promovem a hidrólise irreversível de sacarose, a glicose e frutose, e são enzimas cujo K_m para sacarose é relativamente baixo (7 a 15 mM) (AVIGAD, 1982). A sacarose sintase (SuSy), exclusiva de plantas, promove a clivagem de sacarose dependente de UDP, produzindo UDP-glicose e frutose. O K_m da SuSy para a sacarose é relativamente alto (40 a 200 mM) e a atividade da

enzima é limitada pelas concentrações de sacarose e UDP no citosol (AVIGAD, 1982; LOEF; STITT; GEIGENBERGER, 1999).

Existem dois grupos de invertases, com diferentes propriedades bioquímicas e localizações subcelulares. Segundo Sturm (1999), as funções específicas das isoformas de invertase não são claras, mas parecem regular a entrada de sacarose nas suas diferentes vias de utilização. A maioria das espécies contém pelo menos duas isoformas de invertase vacuolar, que se acumulam como proteínas solúveis (invertases ácidas solúveis), no lúmen desse compartimento acidificado. De maneira similar, existem algumas isoformas de invertase extracelular (invertases de parede celular) que são ionicamente ligadas à parede celular. Invertases de vacúolo e de parede celular promovem a clivagem de sacarose com maior eficiência, quando submetidas a níveis de pH entre 4,5 e 5,0. Além disso, as plantas têm, pelo menos, duas isoformas de invertases citoplasmáticas, denominadas neutras ou alcalinas, cuja atividade sacarolítica é maximizada em níveis de pH entre 7,0 e 7,8 (QUICK; SCHAFFER, 1996). A invertase neutra é considerada uma enzima de manutenção, envolvida na degradação de sacarose, quando as atividades da invertase ácida e da SuSy são baixas (COPELAND, 1990).

As hexoses produzidas pela hidrólise da sacarose podem assumir destinos diferentes, de acordo com a demanda da planta. Giaquinta (1977), em seus estudos, observou que elas podem ser fosforiladas e entrar na via glicolítica para respiração ou podem ser usadas como precursores de compostos estruturais da célula.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises do nitrogênio total, nitrato, amônio, proteínas solúveis totais, aminoácidos livres, açúcares solúveis totais, açúcares redutores, atividade das enzimas das invertases solúveis, sintetase glutamina (GS), desidrogenase do glutamato (GDH) e sintase do glutamato dependente da ferredoxina (Fd-GOGAT) foram realizadas no Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas do Departamento de Biologia/Setor Fisiologia Vegetal situado na Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

As análises dos nutrientes minerais fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, ferro, manganês e zinco foram realizadas no Laboratório de Análise Foliar do Departamento de Química, situado na Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

A análise química do solo foi realizada no Laboratório de Análises de Solos do Departamento de Ciência do Solo, situado na Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

3.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de seringueira utilizadas foram provenientes de plantas do clone RRIM-600, de um seringal com cinco anos de idade, localizado na Fazenda Carandaí, no município de Nepomuceno, Minas Gerais. O seringal está localizado nas coordenadas 21°17'33" S e 45°10'41" W, a uma altitude de 904 m. O clima do município é do tipo CWB segundo a classificação de Köppen (mesotérmico com verões brandos e suaves e estiagem de inverno).

Foram selecionados oito indivíduos adultos que apresentavam uniformidade entre o perímetro do caule, altura das árvores e que possuíam folhas nos diferentes estádios (B1, B2, C e D) e folhas senescentes (Sen.). As

identificações desses estádios fenológicos foram feitas baseando-se na caracterização e descrição de Hallé, Oldeman e Tomlinson (1978).

As folhas nos estádios B1, B2, C e D foram coletadas das árvores com auxílio de um podão, nos quatro pontos ortogonais. As folhas senescentes foram coletadas no chão. Para se ter a certeza de que as folhas pertenciam às árvores selecionadas, a área da projeção da copa de cada árvore foi limpa, retirando galhos e folhas ali existentes. Posteriormente, os galhos da árvore foram agitados até que suas folhas senescentes caíssem no chão e essas fossem coletadas. O horário de coleta das folhas foi de 08:00 às 10:00 horas.

As folhas coletadas foram separadas em duas amostras de cada estádio. Uma amostra foi utilizada para a avaliação dos nutrientes minerais (nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn)), nitrato e amônio, estas amostras foram armazenadas em sacos de papel Kraft. Posteriormente, no laboratório, as folhas foram lavadas e secas em estufa de circulação forçada de ar a $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ até peso constante.

A outra amostra foi para quantificar proteínas solúveis totais, aminoácidos livres, açúcares redutores e solúveis totais, sacarose, bem como a atividade das enzimas invertases solúveis, sintetase glutamina (GS), desidrogenase do glutamato (GDH) e sintase do glutamato dependente da ferredoxina (Fd-GOGAT). Estas amostras tiveram suas folhas imediatamente acondicionadas em garrafas térmicas (9 litros) com gelo. No laboratório, as folhas de cada estádio tiveram o limbo foliar lavado e picado em pequenos pedaços de $0,5\text{ cm}^2$. Os diferentes estádios foram pesados em amostras de um grama, colocados em papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em *freezer* -86°C para posteriores análises.

3.2 Caracterização química do solo

Amostras de solos foram coletadas, na profundidade de 0-20 cm, nos quatro pontos ortogonais na projeção da copa de cada planta, posteriormente as quatro amostras simples foram homogeneizadas, compondo uma amostra composta. As determinações químicas da amostra composta de cada planta foram realizadas de acordo com a metodologia preconizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (1999), essas análises foram utilizadas para verificação da fertilidade do solo. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 Caracterização química de amostras de solo coletadas na camada de 0-20 cm

pH ¹	P ²	K ²	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al
	-----mg.dm ⁻³ -----		-----cmol _c .dm ⁻³ -----			
4,41±0,05	2,38±0,26	62,25±8,42	1,16±0,13	0,45±0,05	0,73±0,09	5,25±0,2
Ac. Muito elevada	MBx.	Méd.	Méd.	Méd.	Méd.	Alto
S ₀₄ ⁴	B ³	Cu ²	Fe ²	Mn ²	Zn ²	M.O ⁴
-----mg.dm ⁻³ -----						dag.kg ⁻¹
7,03±0,30	0,15±0,02	2,00±0,07	63,44±6,25	20,51±0,71	1,88±0,79	1,9±0,08
Méd.	Bx.	Alto	Alto	Alto	Bom	Bx.
P-rem.	t ⁵	T ⁶	SB ⁷	V ⁸	m ⁹	
mg.L ⁻¹	-----cmol _c .dm ⁻³ -----			-----%-----		
21,19±0,8	2,50±0,14	7,03±0,30	1,78±0,19	25,03±1,97	30,03±4,28	
	Méd.	Méd.	Méd.	Bx.	Méd.	

¹pH em H₂O, KCl e CaCl₂; ²Extrator Mehlich 1; ³Extrator água quente; ⁴Matéria orgânica; ⁵Capacidade de troca catiônica efetiva; ⁶Capacidade de troca catiônica a pH 7,0; ⁷Soma de bases trocáveis; ⁸Índice de saturação de bases; ⁹Índice de saturação de alumínio

3.3 Análise mineral e das formas nitrogenadas das folhas

As folhas secas de cada estágio foram moídas em moinho tipo Willey com malha de 20 *mesh*. Após a moagem, os teores dos macronutrientes e micronutrientes foram analisados quimicamente de acordo com Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

O nitrato das folhas foi extraído em água a 45 °C, por uma hora e quantificado colorimetricamente por nitrificação do ácido salicílico, leitura em espectrofotômetro a 410 nm (CATALDO et al., 1975). O amônio foi extraído através da mineralização por via úmida em ácido sulfúrico concentrado, e dosado usando o reagente Nessler (JACKSON, 1958), com leitura a 480 nm em espectrofotômetro.

A redistribuição dos nutrientes minerais foi calculada comparando-se os teores dos nutrientes na folha senescente com o teor das folhas maduras (estádio D), de acordo com Attiwill, Guthrie e Leuning (1978):

$$\text{Redistribuição (\%)} = \frac{\text{Teor da folha senescente} - \text{Teor da folha madura}}{\text{Teor da folha madura}} \times 100$$

3.4 Extração e atividade das invertases solúveis, quantificação de proteínas solúveis, aminoácidos livres, açúcares redutores, açúcares solúveis totais e sacarose

Para extração das invertases solúveis, 1g de tecido foliar de cada estágio foi homogeneizado em graal com nitrogênio líquido, sendo acrescido 4 ml do meio extrator constituído de tampão fosfato de potássio no pH 7,5 (100 mM),

fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (1mM), $MgCl_2$ (5 mM) e ditioneitol (DTT) (1 mM), em seguida foi centrifugado a 18000 x g a 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante, denominado de extrato enzimático sacarolítico, foi utilizado como fonte enzimática.

Para o ensaio da invertase ácida solúvel, uma alíquota de 200 μ L do extrato enzimático sacarolítico foi adicionada ao meio de reação constituído por tampão acetato de sódio no pH 4,5 (100 mM), $MgCl_2$ (5 mM), e sacarose (200 mM), perfazendo um volume final de 2 mL. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria, a 37°C durante 70 minutos. Para o ensaio da invertase neutra usou-se o mesmo procedimento, porém o tampão utilizado no meio de reação foi o tampão fosfato de potássio no pH 7,5 (100 mM). Alíquotas de 50 μ l foram coletadas ao final de 10 e 70 minutos para a dosagem da atividade enzimática.

As atividades enzimáticas foram avaliadas pela dosagem de açúcares redutores produzidos, segundo o método de dinitrosalicilato descrito por Miller (1959). As atividades foram expressas em μ mol de açúcares redutores (AR) produzidos, por grama de matéria fresca por hora.

Para a quantificação das proteínas solúveis, aminoácidos livres, açúcares redutores e solúveis totais foram usadas alíquotas do extrato obtido para o ensaio das invertases. As proteínas solúveis e aminoácidos livres foram determinados segundo metodologia descrita por Bradford (1976) e Yemm e Coccking (1955), respectivamente. Os teores açúcares redutores, de acordo com Miller (1959) e os açúcares solúveis totais foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Yemm e Coccking (1954).

As concentrações de sacarose foram determinadas pela diferença entre os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, multiplicado pelo fator 0,95, segundo Martim (2003).

3.5 Extração e ensaio da sintetase da glutamina e da desidrogenase do glutamato

O extrato enzimático para as enzimas GS e GDH foi obtido de 1g de tecido foliar de cada estágio, por homogeneização em graal com nitrogênio líquido e acrescido 4 ml de um meio extrator, com a seguinte composição: tampão Tris-HCl no pH 7,5 (100 mM), ditioneitol (DTT) (2 mM), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (1 mM) e 10% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Em seguida foi centrifugado a 18000 x g a 4 °C por 20 minutos (DELÚ FILHO et al., 1998). O sobrenadante (extrato enzimático GS/GDH) foi acondicionado em tubos tipo eppendorfs distintos para cada enzima, congelados em nitrogênio líquido e mantidos em *freezer* -86 °C, para posteriores análises.

Para o ensaio da GS a quantidade de 300 µL do extrato enzimático GS/GDH foi adicionada a 700 µL de um meio contendo tampão Tris-HCl no pH 7,5 (100 mM), 2-mercaptoetanol (10 mM), MgSO₄.7H₂O (40 mM), NH₂OHCl (10 mM), ATP (10 mM), glutamato (50 mM), incubando-se a mistura durante 30 minutos a 30 °C. A reação foi paralisada pela adição de 1 mL de FeCl₃ a 370 mM. Após a centrifugação a 6858 x g por cinco minutos, o quelato Fe-L-Glutamil-γ-hiroxamato (GHA) (RATAJCZACK; RATAJCZACK; MAZUROWA, 1981) produzido, foi determinado espectrofotometricamente a 540 nm. O resultado foi expresso em µmoles de GHA.g⁻¹.MF.min⁻¹, levando-se em consideração que 1 µmol de glutamil hidroxamato nas condições de ensaio mostra uma absorbância de 0,34 (MORI, 1981).

O ensaio da GDH foi realizado utilizando-se uma alíquota de 50 µL do extrato enzimático GS/GDH, sendo este diluído três vezes no tampão de extração. O volume de 50 µL do extrato diluído foi adicionado a um meio de reação contendo tampão Tris-HCl no pH 7,8 (100 mM), (NH₄)₂SO₄ (100 mM),

2-oxoglutarato (10 mM), CaCl_2 (4 mM). Todo esse conjunto foi pré-incubado por 3 minutos a 25 °C e, na sequência, foi adicionado NADH (0,1 mM) e procedeu-se o monitoramento da oxidação do poder redutor durante 10 minutos a 340 nm (DELÚ FILHO et al., 1998). A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{moles GLU.g}^{-1}.\text{MF.min}^{-1}$.

3.6 Extração e ensaio da sintase do glutamato dependente de ferredoxina

A enzima sintase do glutamato dependente de ferredoxina (Fd-GOGAT) foi extraída e quantificada segundo Delú Filho et al. (1998). A extração Fd-GOGAT foi realizada macerando 1g de tecido foliar de cada estágio em gral com nitrogênio líquido e acrescido 5 ml de um meio extrator, com a seguinte composição: tampão fosfato de potássio no pH 7,5 (500 mM), ditioneitol (DTT) (2 mM), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) (1 mM), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (1 mM) e 10% (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Em seguida o extrato foi centrifugado a 27429 x g por 20 minutos, e o sobrenadante (extrato enzimático Fd-GOGAT) foi acondicionado em tubos tipo eppendorfs mantidos em gelo. Para o ensaio, uma alíquota de 300 μL do extrato enzimático Fd-GOGAT foi adicionado a 900 μL de um meio contendo tampão fosfato de potássio no pH 7,5 (500 mM), glutamina (15 mM), 2-oxoglutarato (15 mM) e metil viologênio (2 mg/mL). A mistura foi incubada por dois minutos a 30 °C, e a reação foi iniciada. Com a adição de 300 μL da seguinte mistura: 16 mg de ditionito de sódio + 16 mg de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) por ml de água destilada. A reação foi paralisada por imersão dos tubos tipo eppendorfs em água a 90 °C por dois minutos, posteriormente agitou-se os tubos tipo eppendorfs em vortex até o desaparecimento da cor azul e em seguida foi centrifugado durante cinco minutos a 29715 x g.

A alíquota de 1 mL foi retirada de cada amostra e aplicada em coluna DOWEX 1 x 8X na forma acética. Após lavagem da coluna com 15 mL de água bidestilada, foram utilizados 7 mL de ácido acético (300 mM) para eluir o glutamato, que ficou retido à coluna, sendo este volume coletado em tubos de vidro, do qual foi retirado 1 mL para reação colorimétrica para determinação do aminoácido pelo método descrito por Yemm e Coccking (1955).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teores dos nutrientes minerais nos diferentes estádios foliares de seringueira

A faixa de teores considerados adequados às folhas maduras (estádio D) de seringueiras adultas para macronutrientes (g/kg) foram determinadas por diversos autores (Tabela 2).

Tabela 2 Valores de referência para interpretação dos resultados de análises de tecidos foliares de seringueira adulta

Autores	N	P	K	Ca	Mg	S
				g/kg		
Cantarutti et al., 2007	26-35	1,6-2,3	10-14	7,5-8,5	1,7-2,5	1,8-2,6
Raij et al., 1996	29-35	1,6-2,5	10-17	7,0-9,0	1,7-2,5	1,8-2,6
Garcia et al., 1999	30-35	2,0-2,5	12-15	4,0-10	2,4-4,0	1,4-2,6

Nas condições em que o estudo foi realizado, observaram os seguintes teores nas folhas maduras (estádio D) (g/kg): 32,0 de N, 1,6 de P, 7,7 de K, 16,0 de Ca, 4,0 de Mg e 3,6 de S. De acordo com os autores citados na Tabela 2 os teores de N e P estão dentro da faixa considerada adequada, o Ca e o S tiveram teores acima dos adequados. O Mg foi o nutriente que apresentou teor adequado segundo Garcia et al. (1999), no entanto para Cantarutti et al. (2007) e Raij et al. (1996) o teor encontrado no presente trabalho está acima do adequado. O K foi o macronutriente que apresentou um teor inferior aos citados nas literaturas.

O baixo teor de K encontrado nas folhas do seringal em estudo pode estar relacionado com acidez e CTC do solo (Tabela 1), sob essas condições pode ocorrer uma maior lixiviação deste nutriente. O K⁺ compete com vários

cátions pelos sítios de absorção na membrana plasmática, principalmente com NH_4^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} (ERNANI; ALMEIDA; SANTOS, 2007). Assim, a menor absorção de potássio pelas plantas se deve a baixa concentração deste íon na solução do solo, e conseqüentemente favorecendo a absorção dos cátions que competem pelo sítio de absorção.

A maior absorção de Ca^{2+} e Mg^{2+} provavelmente se deve a maior exigência desta cultura a esses nutrientes, o cálcio é um dos nutrientes mais exigido pela seringueira, sobretudo na fase adulta, e o magnésio é de extrema importância para a produtividade da cultura (CARVALHO; CARVALHO; ASSIS, 2000).

Observa-se no Gráfico 1, que o teor de macronutrientes nas folhas variou em função do estágio de desenvolvimento foliar.

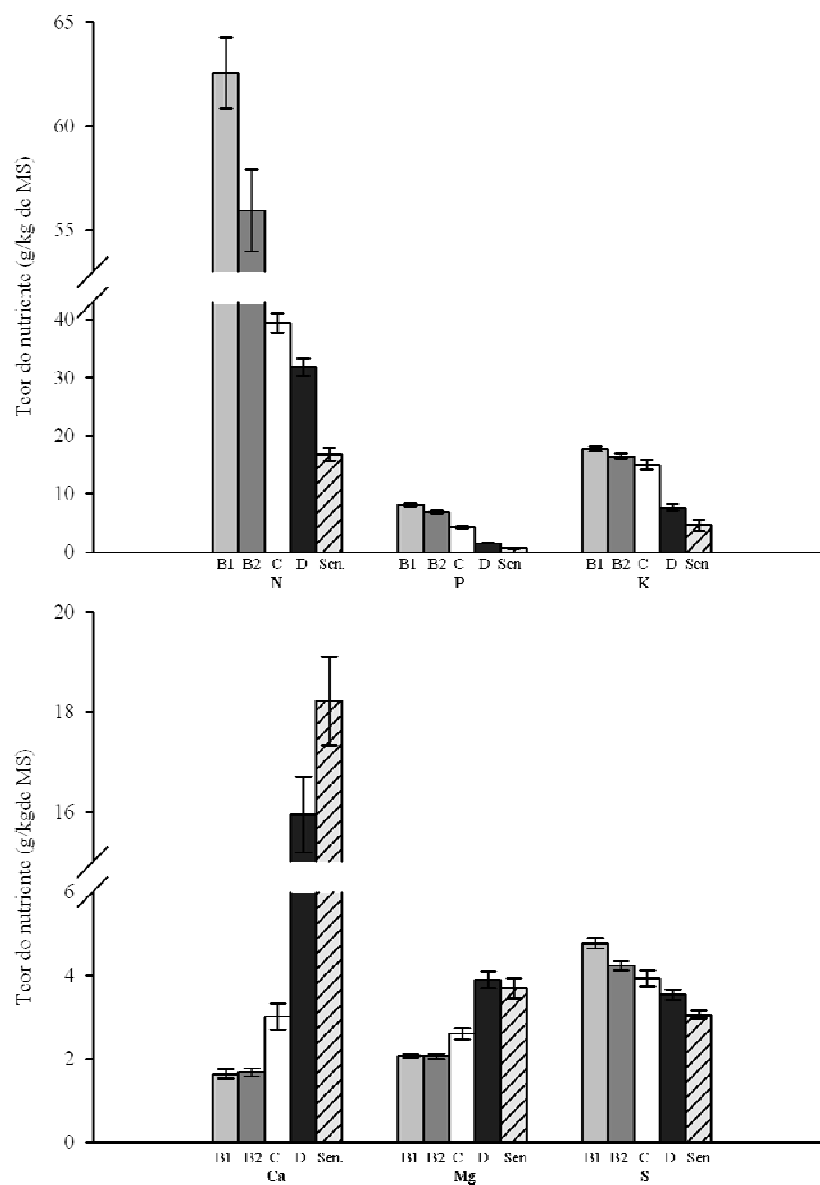


Gráfico 1 Teores dos nutrientes: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) em diferentes estádios de desenvolvimento foliar de seringueira (clone RRIM-600). As barras indicam o erro padrão da média de oito repetições

Dentro dos macronutrientes, o nitrogênio foi o elemento mais abundante nos diferentes estádios de desenvolvimento da folha de seringueira, exceto para o estágio senescente que apresentou o teor de cálcio maior que o teor do nitrogênio.

Os teores de nitrogênio, fósforo e potássio reduziram significativamente nos diferentes estádios de desenvolvimento foliar (Gráfico 1). A redução dos teores de N, P e K sugerem uma redistribuição desses nutrientes das folhas fontes, que são as folhas do estágio D e as senescentes, para regiões de crescimento da planta. Essa redistribuição dos nutrientes é importante para conservação destes, no interior da planta.

O teor do Mg aumentou a partir do estágio C e não apresentou diferença entre o estágio D e a folha senescente. Os íons de Mg têm papel específico na ativação de enzimas envolvidas na respiração, fotossíntese e síntese de DNA e RNA (TAIZ; ZEIGER, 2009), possivelmente o aumento no teor de Mg seja justificado, por este ser requerido nestes estádios. Segundo Miguel (2005), o estágio D de desenvolvimento da folha é o que apresenta maior teor de clorofila e maior taxa fotossintética.

A semelhança dos nutrientes N, P e K, o enxofre foi redistribuído das folhas maduras (estádio D) e senescentes para as folhas em desenvolvimento (estádio B1 e B2), apresentando maior teor no estágio B1 e o menor na folha senescente (Gráfico 1), porém a redistribuição do S foi menor que a observada para o N, P e K.

O nutriente cálcio apresentou um aumento significativo com o desenvolvimento foliar. O Ca é um elemento estrutural, a elevação dos teores de cálcio com a idade das folhas pode ser explicada, principalmente, pelo aumento na produção de material estrutural e pela baixa mobilidade deste elemento na planta (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A redistribuição dos macronutrientes é apresentada na Tabela 3. Observa-se que cerca de -47,1% de N, -55,0% de P, -40,0% de K, -5,2% de Mg e -13,9% de S foram redistribuídos das folhas senescentes para os órgãos em crescimento. Assim, os nutrientes que mais redistribuíram nas folhas de seringueira foram N, P e K. Para o Ca observou-se um acúmulo com o desenvolvimento foliar, mostrando que este não foi redistribuído. O teor do Ca aumentou em 14,2% do estágio inicial da folha, mostrando assim sua imobilização na planta. Rodrigues et al. (2000), avaliando as concentrações e redistribuição de nutrientes em folhas em *H. brasiliensis* e *P. oocarpa*, encontraram percentuais de redistribuição em seringueiras semelhantes ao apresentado neste trabalho.

Tabela 3 Redistribuição de macronutrientes (%) nas folhas de seringueira (clone do RRIM-600)

Redistribuição					
N	P	K	Ca	Mg	S
-47,1	-55,0	-40,0	+14,2	-5,2	-13,9

A ordem relativa do teor de macronutrientes nas folhas maduras (estádio D) de seringueira encontrada no presente estudo foi: N>K>Ca>Mg≥S>P. Esse resultado diverge dos encontrados por Shorrocks (1979) que encontrou a seguinte ordem N>K>Ca>Mg>P>S, e por Rodrigues et al. (2000) e Silva, Santos e Paiva (1998) que apresentaram a ordem K>N>Ca>P>S>Mg. Essa ordem dos teores dos nutrientes pode variar em função do clone, fase fenológica que a planta se encontra, das condições edafoclimáticas e das práticas de manejo adotadas no seringal.

Para os micronutrientes, a faixa de teores considerados adequados às folhas maduras (estádio D) de seringueiras adultas foi determinada por diversos autores (Tabela 4).

Tabela 4 Valores de referência para interpretação dos resultados de análises de tecidos foliares de seringueira adulta

Autores	B	Cu	Fe mg/kg	Mn	Zn
Cantaturatti et al., 2007	20-70	10-15	70-90	15-40	20-30
Raij et al., 1996	20-70	10-15	50-120	40-150	20-40
Garcia et al., 1999	20-70	10-30	66-200	40-200	25-50

Nas condições em que o estudo foi realizado, observaram os seguintes teores nas folhas maduras (estádio D) (mg/kg): 45,8 de B, 8,0 de Cu, 94,0 de Fe, 343,0 de Mn, 24,0 de Zn. Esses resultados mostram que os teores de B, Fe e Zn encontram-se dentro da faixa considerada adequada, segundo a literatura mencionada anteriormente. Para o Cu observou-se um teor inferior aos citados nas literaturas. No solo do seringal em estudo o Cu está em alta quantidade (Tabela 1), no entanto, a presença excessiva de íons metálicos, como Fe, Mn e Al, reduz a disponibilidade deste para as plantas, independente do tipo de solo (ABREU; LOPES; SANTOS, 2007). O Mn apresentou na folha madura (estádio D) um teor superior que aqueles considerados adequados na literatura referenciada anteriormente. Possivelmente se deve ao fato da maior disponibilidade deste no solo, sob condições de solo ácido a disponibilidade é alta devido à maior solubilidade dos compostos que o contém.

Os teores dos micronutrientes (Gráfico 2) variaram em função dos estádios de desenvolvimento foliar, assim como os teores dos macronutrientes. O cobre e o zinco apresentaram uma redução significativa até o estágio D e este

estádio não diferiu da folha senescente, mostrando assim uma redistribuição destes no desenvolvimento foliar da seringueira.

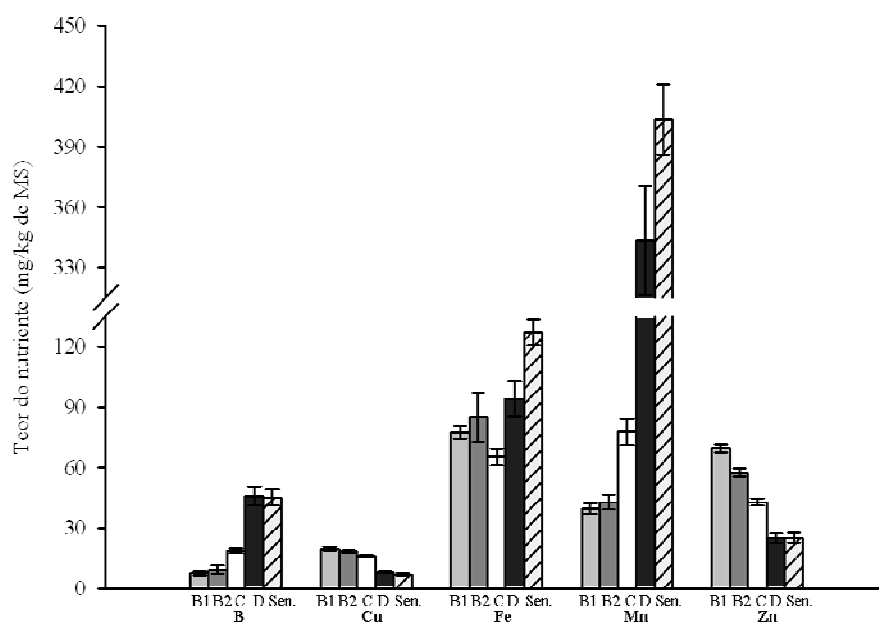


Gráfico 2 Teores dos nutrientes: boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), e zinco (Zn) em diferentes estádios de desenvolvimento foliar em seringueira (clone RRIM-600). As barras indicam o erro padrão da média de oito repetições

Entre os micronutrientes, o Cu foi o que apresentou menor teor no desenvolvimento foliar da seringueira (Gráfico 2). Shorrocks (1965) constatou que o cobre é o micronutriente menos absorvido pela seringueira, estes dados corroboram com os encontrados no presente estudo.

O ferro e manganês aumentaram seus teores com o desenvolvimento foliar, apresentando maiores teores na folha senescente. Segundo Shorrocks

(1965) o ferro é o micronutriente mais absorvido, seguido do manganês. No entanto, nas condições do presente estudo o manganês apresentou o maior teor, possivelmente devido sua maior disponibilidade no solo, seguido do ferro em folhas maduras (estádio D). O Fe tem um papel importante como componente de enzimas envolvidas na transferência de elétrons, e o Mn ativa várias enzimas nas células vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O boro apresentou um comportamento semelhante ao ferro e ao manganês, ou seja, um acúmulo com o desenvolvimento foliar. No entanto, o teor de B no estágio D e nas folhas senescentes não diferiu. O boro é um nutriente imóvel na planta, assim como o cálcio, o aumento do teor com o desenvolvimento foliar pode ser explicada pela sua imobilização.

A redistribuição dos micronutrientes é apresentada na Tabela 5. Observa-se que para a redistribuição não apresentou um padrão bem definido em função do estágio de desenvolvimento foliar, exceto para o Cu que foi redistribuído -12,7% e para o Fe e Mn que acumularam +17,5% e +35,0%, respectivamente, com o desenvolvimento foliar.

Tabela 5 Redistribuição de micronutrientes (%) nas folhas de seringueira (clone do RRIM-600)

Redistribuição				
B	Cu	Fe	Mn	Zn
-1,2	-12,7	+35,0	+17,5	+0,9

O B nutriente imóvel que foi acumulado no desenvolvimento foliar da seringueira, apresentou uma redução do seu teor do estágio D para a folha senescente (Tabela 5). O zinco foi redistribuído no desenvolvimento foliar (Gráfico 2), no entanto, apresentou uma redistribuição positiva (Tabela 5).

Observa-se que nestes dois nutrientes a redistribuição não seguiu o mesmo comportamento do teor no desenvolvimento foliar, no entanto, os valores foram insignificantes, pois não apresentaram diferença estatística em seus teores do estágio D e senescente.

A ordem relativa do teor de micronutrientes nas folhas maduras (estádio D) de seringueira encontrada no presente estudo foi: $Mn > Fe > Zn > B > Cu$. Essa ordem dos teores dos micronutrientes, a semelhança dos macronutrientes, pode variar em função do clone, fase fenológica que a planta se encontra, das condições edafoclimáticas e das práticas de manejo da adotadas no seringal.

4.2 Formas nitrogenadas nos diferentes estádios foliares de seringueira

Os processos vitais da planta, em sua maioria, estão associados à presença de nitrogênio, que participa de inúmeros compostos de importância fisiológica dentro do metabolismo das plantas. Assim, o fracionamento do nitrogênio foi realizado no intuito de identificar quais as formas nitrogenadas e o papel de algumas enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio durante o desenvolvimento foliar.

Observa-se que o teor de nitrato no estágio B2, foi maior que nos demais estádios (Gráfico 3). O nitrato presente na folha, possivelmente, seja proveniente da absorção deste em excesso pelas raízes, não sendo reduzidos nas mesmas e foram transportados para as folhas. Alves (2001) verificou a presença do nitrato no xilema de plantas jovens de seringueira.

O nitrato encontrado em todos os estádios de desenvolvimento foliar provavelmente encontra-se armazenado no vacúolo, não sendo reduzido pela redutase do nitrato (RN) na folha. Delú Filho et al. (1998) não detectaram atividade *in vivo* da redutase do nitrato em folhas de seringueira jovens cultivadas sob níveis crescentes de nitrato. Resultado semelhante foi observado

por Lemos et al. (1999) que conduziram à hipótese de que a assimilação do nitrato em seringueira acontecia somente no sistema radicular. A redução do teor de nitrato com o desenvolvimento foliar é possível pelo efeito da diluição do teor deste, em função do incremento da matéria seca nos estádios.

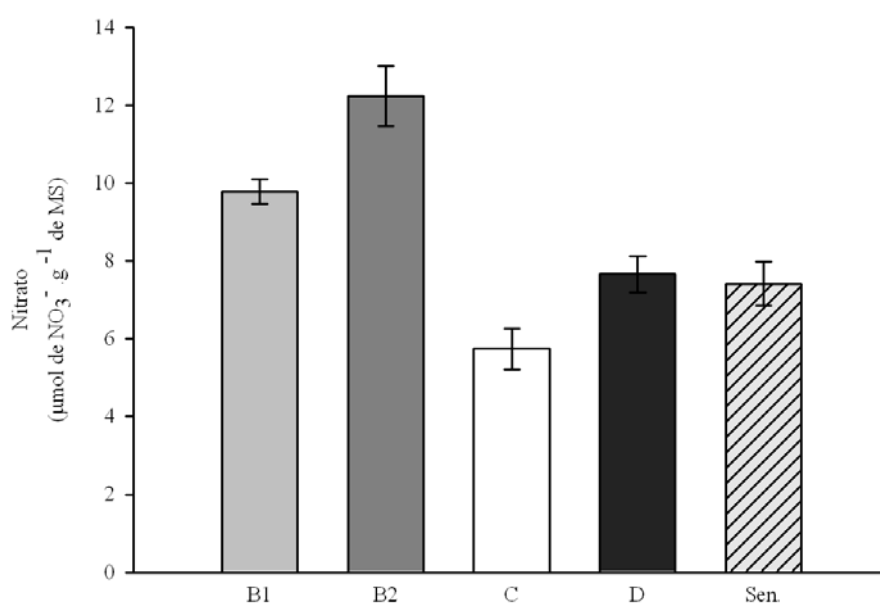


Gráfico 3 Teores de nitrato nos diferentes estádios de desenvolvimento foliar de seringueira (clone RRIM-600). As barras indicam o erro padrão da média de oito repetições

No presente estudo, observou-se que os maiores teores de amônio, assim como de nitrato, foram no início do desenvolvimento foliar (estádio B1 e B2), porém estes não apresentaram diferença entre si (Gráfico 4). Comparando os teores de nitrato e de amônio, observa-se que o amônio está presente em quantidades menores que o nitrato, provavelmente se deve a maior absorção do

NO_3^- pelas raízes. O pH do solo do seringal em estudo apresentava uma acidez muito elevada (Tabela 1), com o pH ácido inibe a absorção do NH_4^+ e favorece a do NO_3^- . Possivelmente, devido a efeitos competitivos de H^+ e OH^- no processo de absorção do NH_4^+ e NO_3^- , respectivamente (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

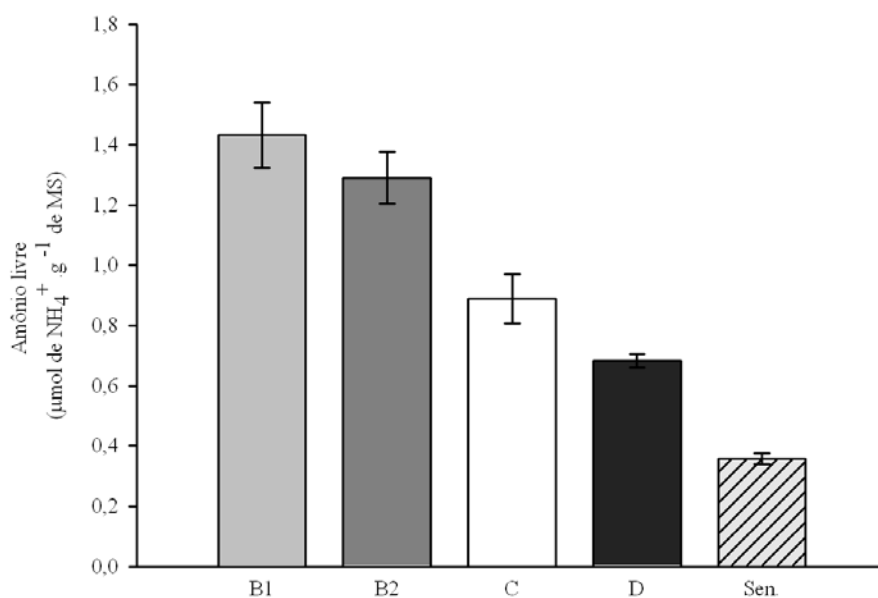


Gráfico 4 Teores de amônio livre nos diferentes estádios de desenvolvimento foliar de seringueira (clone RRIM-600). As barras indicam o erro padrão da média de oito repetições

Após o estágio C os teores de NH_4^+ reduziram significativamente até a senescência da folha (Gráfico 4). A redução no teor do amônio durante o desenvolvimento foliar, possivelmente é dada pela assimilação deste em aminoácidos e posteriormente em proteínas. Analisando as proteínas solúveis

totais (Gráfico 9) verificou-se os maiores teores nos estádios C, D e senescentes, comportamento inverso do teor do amônio, mostrando assim a incorporação do NH_4^+ em aminoácidos.

4.3 Atividade das enzimas do metabolismo do nitrogênio nos diferentes estádios foliares de seringueira

A atividade específica da enzima sintetase da glutamina (GS) foi maior no estágio B2 (Gráfico 5). Segundo Fuentes et al. (2001) uma atividade elevada da GS permite uma maior síntese de aminoácidos e conseqüentemente, de proteínas necessárias à manutenção do funcionamento dos processos metabólicos da planta, além de manter o crescimento e desenvolvimento foliar. Miguel (2005) verificou maior crescimento do lançamento foliar durante a fase de desenvolvimento no estágio B2. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Hallé, Oldeman e Tomlinson (1978) que caracterizaram o estágio B2 como a fase de maior velocidade de alongamento do eixo caulinar.

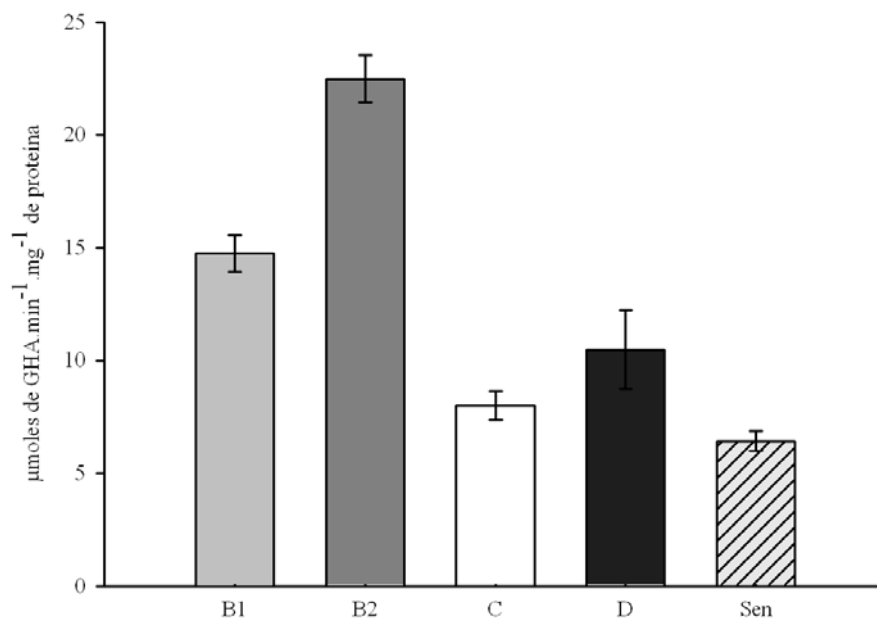


Gráfico 5 Atividade específica da sintetase da glutamina nos diferentes estádios de desenvolvimento foliar de seringueira (clone RRIM-600). As barras indicam o erro padrão da média de oito repetições

A maior atividade específica da enzima sintase do glutamato dependente de ferredoxina (Fd-GOGAT) foi observada no estágio B2 (Gráfico 6). O comportamento da Fd-GOGAT nos estádios de desenvolvimento foliar foi semelhante ao da enzima GS, mostrando que estas vias ocorrem em conjunto, com a GS fornecendo substrato para a Fd-GOGAT.

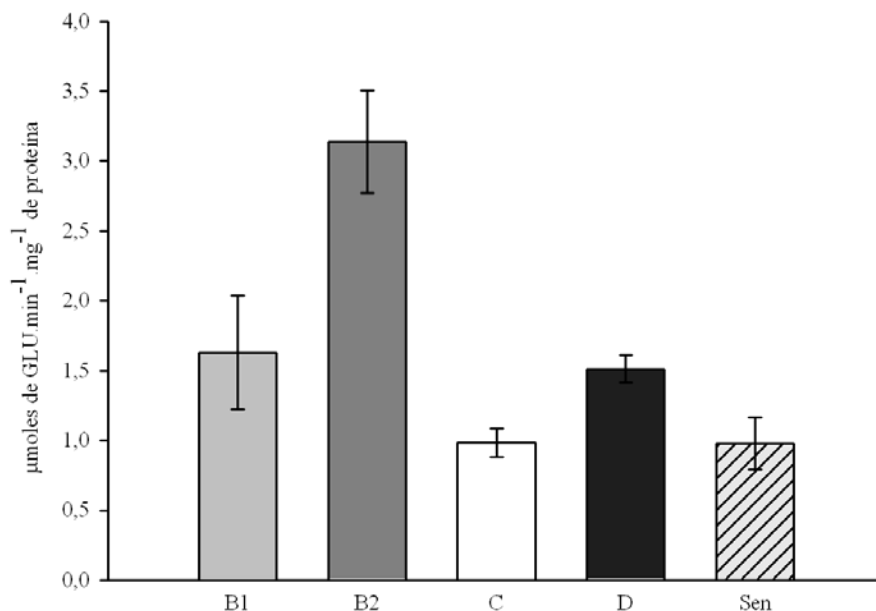


Gráfico 6 Atividade específica da sintase do glutamato dependente da ferredoxina (Fd-GOGAT) nos diferentes estádios de desenvolvimento foliar de seringueira (clone RRIM-600). As barras indicam o erro padrão da média de oito repetições

Observa-se no Gráfico 4 que os maiores teores de amônio coincidiram com a maior atividade específica da GS/GOGAT. Os compostos nitrogenados, predominantemente, são translocados na forma de glutamina, asparagina e ureídeos, de modo que a asparagina é comumente o composto preponderante de suprimento de nitrogênio para os tecidos em crescimento. Ao chegar aos órgãos drenos, a asparagina é catabolizada em aspartato e amônia, pela enzima asparaginase e a amônia é incorporada em compostos orgânicos através do sistema enzimático GS/GOGAT (CAMARGOS, 2002).

As elevadas atividades específicas da desidrogenase do glutamato (GDH) ocorreram nos dois primeiros estádios avaliados no presente estudo (Gráfico 7). Segundo Lancien, Gadal e Hodges (2000), a reação de aminação da

GDH é favorecida por amônio, glutamina ou açúcares. Assim, as altas atividades específicas da GDH possivelmente sejam pelas maiores quantidades de amônio presente nos estádios B1 e B2.

A assimilação do amônio via a GDH tem sido citada como a principal colaboradora da via GS/GOGAT, no entanto, a sua participação no metabolismo do nitrogênio tem gerado muitas controvérsias em torno da função e contribuição quantitativa da enzima (PAHLICH, 1996). Muitos trabalhos têm mostrado que a GDH atua mais no sentido de desaminação do glutamato, neste caso, o glutamato atua como substrato para produzir α -cetoglutarato. No presente estudo avaliou-se a assimilação do amônio pela GDH verificando que esta atua colaborando com a via GS/GOGAT na formação de aminoácidos, nos estádios em desenvolvimento foliar da seringueira, já a ação de catabolismo desta enzima ainda carece de mais estudos.

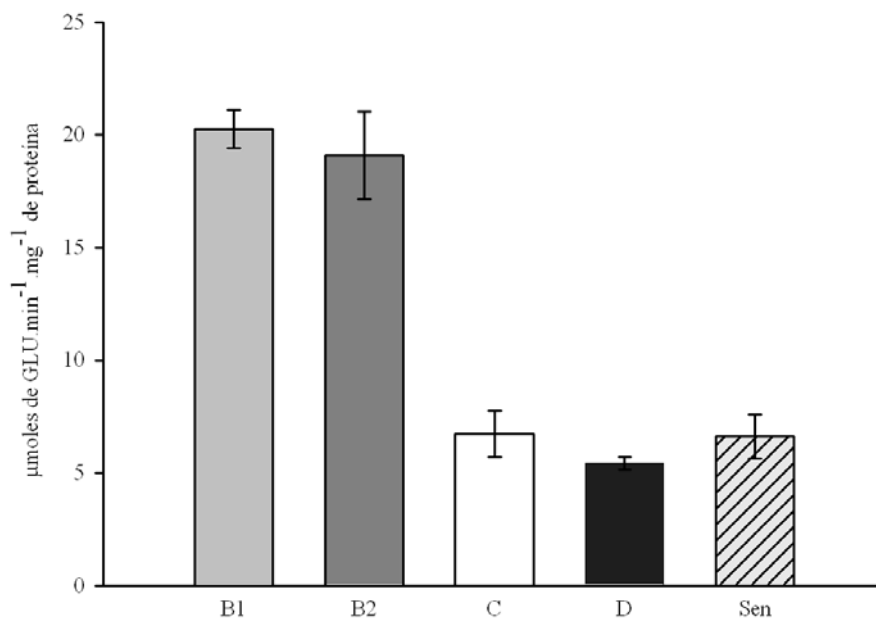


Gráfico 7 Atividade específica da desidrogenase do glutamato nos diferentes estádios de desenvolvimento foliar de seringueira (clone RRIM-600). As barras indicam o erro padrão da média de oito repetições

4.4 Avaliações bioquímicas e da atividade das invertases solúveis nos diferentes estádios foliares de seringueira

Os aminoácidos livres apresentaram maiores teores nos estádios B1, D (Gráfico 8). As folhas senescentes não apresentaram diferença estatística das folhas no estágio B1. Na senescência, grande parte das proteínas são hidrolisadas e degradadas em outros compostos nitrogenados e assim exportam para as partes em desenvolvimento para atender sua demanda metabólica, os quais recebem a maior parte de N na forma de aminoácidos, razão dos altos teores no estágio B1. Ressalta-se que a redução nos estádios B2 e C, provavelmente foram pela utilização destes para a formação de proteínas.

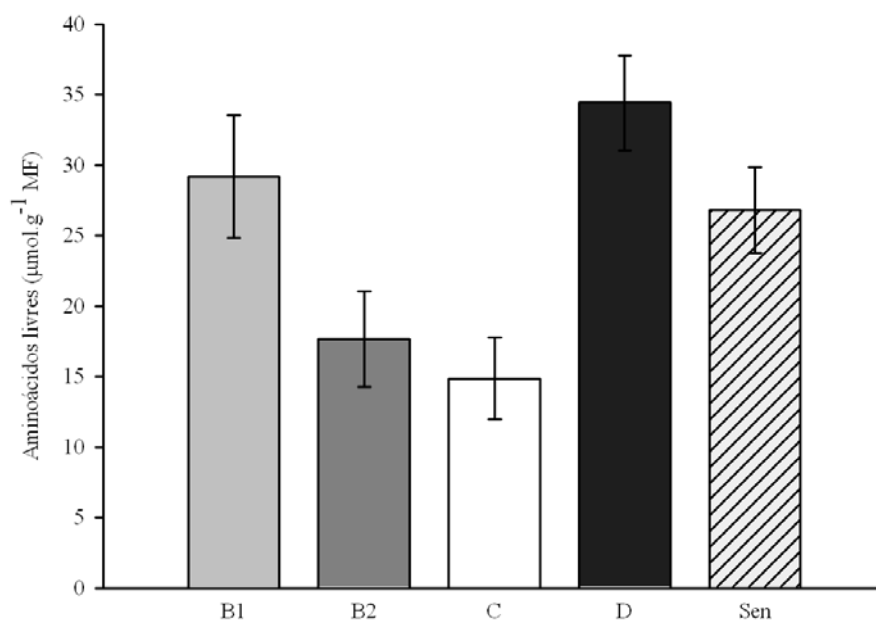


Gráfico 8 Teores de aminoácidos livres nos diferentes estádios de desenvolvimento foliar de seringueira (clone RRIM-600). As barras indicam o erro padrão da média de oito repetições

No estágio D, o aumento do teor de aminoácido, possivelmente é pela maior taxa de fotorrespiração presente neste estágio. Samsuddin e Impens (1979a, 1979b) ao estudarem plantas jovens de quatro clones malaios de seringueira, constataram que folhas novas exibem alta respiração e baixa taxa fotorrespiratória. Verificaram também que a taxa máxima de fotossíntese líquida é atingida aos 34 dias de idade da folha, estágio D, em plantas cultivadas em solução nutritiva, quando ocorrem os menores valores de resistência estomática e ponto de compensação de CO₂, embora ocorram os maiores valores de fotorrespiração.

As proteínas solúveis quantificadas no presente estudo, possivelmente foram às albuminas e as globulinas. Segundo a classificação baseada na solubilidade descrita por Osborne (1924) as albuminas e as globulinas são solúveis em água e em soluções de sais diluído, respectivamente. Analisando a Gráfico 9 verifica-se que as proteínas solúveis apresentaram o menor teor no estádio B2.

Os estádios que apresentaram os menores teores de proteínas solúveis encontram-se em crescimento, e os aminoácidos que são importados para estes estádios serão para formar proteínas estruturais, no entanto, a extração realizada não quantifica as proteínas estruturais, o que deve ser melhor investigado em trabalhos futuros.

Os estádios que apresentaram os maiores teores de proteínas solúveis foram nos estádio C e D, nestes estádios as folhas estão com alta atividade metabólica, tendo alta produção de proteína para atender a demanda do metabolismo (Gráfico 9). Nas folhas senescentes as proteínas são degradadas a aminoácidos, pela ação das proteases e essas são remobilizados para órgão drenos, razão que explica a redução no teor de proteína neste estádio.

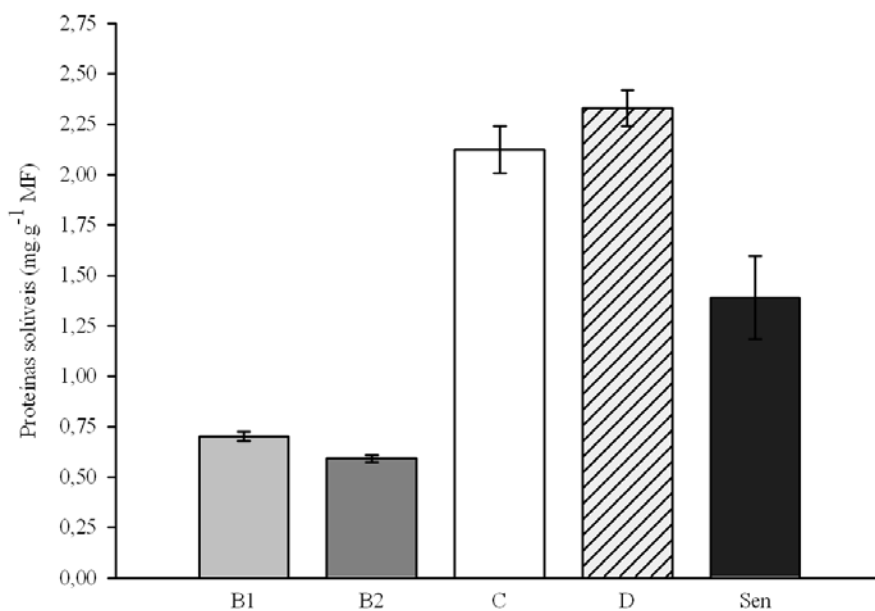


Gráfico 9 Teores de proteínas solúveis nos diferentes estádios de desenvolvimento foliar de seringueira (clone RRIM-600). As barras indicam o erro padrão da média de oito repetições

Os teores de açúcares analisados nos diferentes estádios de desenvolvimento foliar de seringueira apresentaram o mesmo comportamento (Gráfico 10). As maiores concentrações de açúcares no desenvolvimento foliar de seringueira observou-se no estádio D, em função da maior taxa metabólica resultante da sua maior capacidade fotossintética.

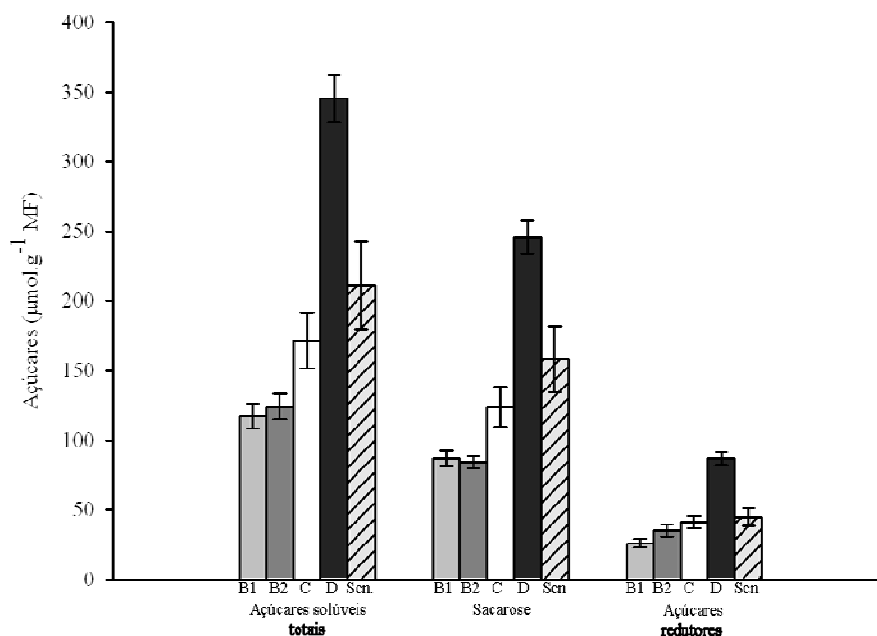


Gráfico 10 Teores de açúcares solúveis totais, sacarose e açúcares redutores em diferentes estádios de desenvolvimento foliar de seringueira (clone RRIM-600). As barras indicam o erro padrão da média de oito repetições

Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (1999) em folhas de seringueiras do clone RRIM-600 e GT-1 que apresentaram maiores teores de açúcares nos estádios em que as folhas nos estádio D, do que as que estavam no estádio B. Miguel (2005) avaliando o comportamento fotossintético de três clones de seringueira nos diferentes estádios de desenvolvimento foliar verificou que no estádio D ocorre maior a fotossíntese líquida, sendo também acompanhada por maior eficiência fotoquímica do fotossistema II e eficiência de carboxilação. O produto dessas reações são carboidratos, em especial sacarose, que produzidos para atender a demanda do próprio metabolismo e para exportar para órgãos drenos que são órgãos não-fotossintéticos e órgãos que não

produzem produtos fotossintéticos em quantidades suficientes para suas próprias necessidades de crescimento ou reserva.

Os menores teores de açúcares observados nos estádios B1 e B2, possivelmente, pela utilização destes no processo respiratório. No estágio B, as folhas de seringueira apresentam maiores taxa respiratória quando comparado com os demais estádios de desenvolvimento foliar (MIGUEL, 2005).

As atividades específicas das invertases solúveis analisadas apresentaram o mesmo comportamento no desenvolvimento foliar (Gráfico 11). Em seringueira, ainda são escassas as informações acerca das proporções entre atividades das invertases ácidas solúveis e neutras, nos órgãos drenos que caracterizam os tecidos em expansão. A invertase ácida solúvel (IA) apresentou uma atividade específica superior à invertase neutra (IN). Estes resultados não corroboram com Oliveira (1999) que observou em folhas maduras (estádio D) de seringueira uma atividade superior da invertase neutra.

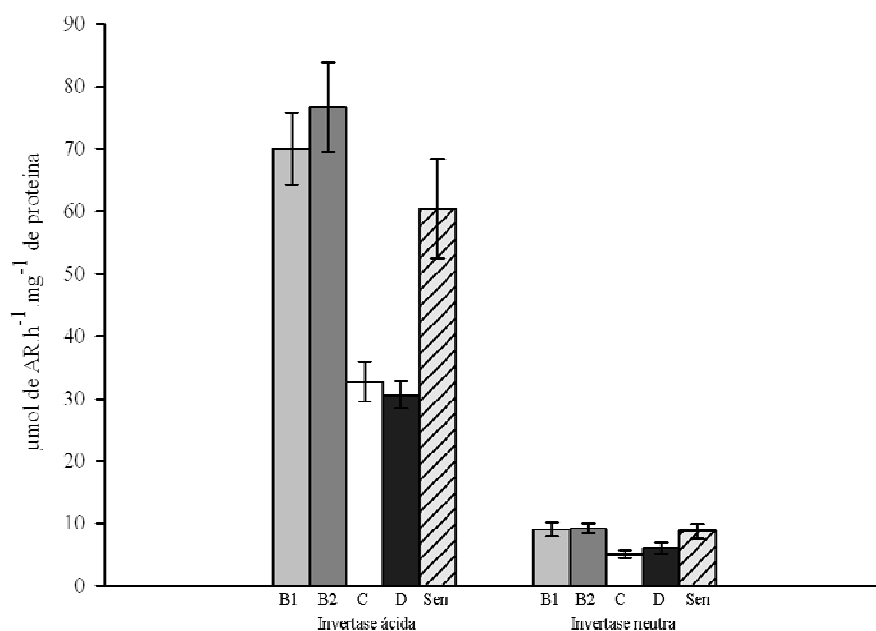


Gráfico 11 Atividade específica da invertase ácida solúvel e da invertase neutra nos diferentes estádios de desenvolvimento foliar de seringueira (clone RRIM-600). As barras indicam o erro padrão da média de oito repetições

As atividades específicas das invertases solúveis foram maiores nos estádios B1 e B2 (Gráfico 11). A invertase ácida vacuolar parece controlar a rota primária de degradação de sacarose em tecidos em expansão (WINTER; HUBER, 2000). A clivagem de sacarose, formando glicose e frutose, pode diminuir significativamente o potencial osmótico das células, sugerindo uma possível função das invertases, no alongamento celular e no crescimento de plantas (KOCH, 2004; STURM; TANG, 1999;).

As atividades específicas das invertases solúveis foram menores nos estádios nos estádios C e D, já nas folhas senescentes verificou-se um aumento na atividade específica (Gráfico 11). Nas folhas senescentes, possivelmente as

invertases solúveis são responsáveis pela quebra de sacarose para a manutenção e consumo de suas reservas.

5 CONCLUSÕES

Os nutrientes N, P, K, S, Cu e Zn diminuíram os seus teores no desenvolvimento foliar da seringueira, já para Ca, Mg, B, Fe e Mn observou-se um comportamento inverso, apresentando teores significativamente inferiores nas folhas jovens.

A redistribuição foi maior para os nutrientes N, P, K e Cu. A ordem relativa do teor de macronutrientes nas folhas da seringueira encontrada no presente estudo foi: $N > K > Ca > Mg \geq S > P$ e para micronutrientes a ordem relativa observada foi: $Mn > Fe > Zn > B > Cu$.

O teor do amônio diminuiu durante o desenvolvimento foliar até a senescência. As atividades específicas das enzimas GS e Fd-GOGAT foram maiores no estágio B2. A GDH apresentou maior atividade nos estádios B1 e B2. Nas condições do presente estudo, o teor de amônio parece ter exercido uma grande influência sobre a variação da atividade enzimática e essas atuaram mais nos estádios de maior crescimento foliar.

Os estádios D e B1 apresentaram as maiores concentrações de aminoácidos, enquanto as proteínas solúveis totais apresentaram os maiores teores nos estádios foliares C e D.

As maiores concentrações de açúcares no desenvolvimento foliar de seringueira foram observadas no estágio D. Com relação às enzimas de hidrólise da sacarose, a invertase ácida solúvel apresentou uma atividade específica superior à invertase neutra, durante todos os estádios de desenvolvimento, a maior atividade específica das invertases solúveis foram nas folhas do estágio B.

REFERÊNCIAS

ABREU, C. A., LOPES, A. S.; SANTOS, G. C. G. Micronutrientes. In: NOVAIS, R. F. et al. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 646-736.

ALVES, E. M. **Redução do nitrato, assimilação do amônio e transporte do nitrogênio em plantas jovens de seringueira**. 2001. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

ATTIWILL, P. M.; GUTHRIE, H. B.; LEUNING, R. Nutrient cycling in a *Eucalyptus oblique* (L'Hérit) forest: I. litter production and nutrient return. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 26, n. 1, p. 79-91, 1978.

AVIGAD, G. Sucrose and other disaccharides. In: LOEWUS, T. A.; TANNER, W. (Ed.). **Encyclopedia of Plant Physiology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1982. p. 217-347.

BATAGLIA, O. C.; CARDOSO, M.; CARRETERO, M. V. Situação nutricional de seringais produtivos no Estado de São Paulo. **Bragantia**, Campinas, v. 47, n. 1, p. 109-123, 1988.

BATAGLIA, O. C. et al. Efeito da adubação NPK sobre o período de imaturidade da seringueira. **Bragantia**, Campinas, v. 58, n. 2, p. 363-374, 1999.

BATAGLIA, O. C.; SANTOS, W. R. Nutrição e adubação de seringueira em formação e produção. In: CICLO DE PALESTRA SOBRE HEVEICULTURA PAULISTA, 1., Barretos, **Anais...** Barretos: SAA-APABOR, 1998, p. 45-60.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

CALDEIRA, M. V. W. et al. Ciclagem de nutrientes em *Acacia mearnsii* de Wild: V. quantificação do conteúdo de nutrientes na biomassa aérea de *Acacia mearnsii* de Wild procedência australiana. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 6, p. 977-982, nov./dez. 2000.

CALDEIRA, M. V. W. et al. Concentração e redistribuição de nutrientes nas folhas e no folheto em um povoamento de *Acácia mearnsii* de Wild no Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 19-24, jun. 1999.

CAMARGOS, L. S. **Análise das alterações no metabolismo de nitrogênio em *Canavalia ensiformes* (L) em resposta a variações na concentração de nitrato fornecida**. 2002. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

CANTARUTTI, R. B. et al. Avaliação da fertilização do solo e recomendação de fertilizantes. In: NOVAIS, R. F. et al. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 769-850.

CARMO, C. A. F. S. et al. Avaliação do estado nutricional de seringueiras implantadas na região da Zona da Mata de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1437-1444, out. 2002.

CARVALHO, A. C. A.; BATISTA, E. M. **Efeito da aplicação de fósforo no desenvolvimento da seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)**. Macapá: Embrapa Amapá, 2004. 25 p. il. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 70).

CARVALHO, J. G.; CARVALHO, M. A.; ASSIS, R. P. Calagem e gessagem na cultura da seringueira. In: VIÉGAS, I. J. M.; CARVALHO, J. G. (Org.). **Seringueira**. Nutrição e adubação no Brasil. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia, 2000. p. 175-208.

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications of Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.

COPELAND, L. **Enzymes of sucrose metabolism: methods in plant biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1990. v. 3, p. 73-83.

DALL'ANTONIA, A. C. et al. Avaliação de clones de borracha natural crua por ensaios padrão e análise dinâmico-mecânica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 16, n.3, p. 239-245, 2006.

DELÚ FILHO, N. et al. Redução do nitrato e assimilação do amônio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) cultivadas em níveis crescentes de nitrato. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, PR: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 10, n. 3, p. 185-190, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia, 1999. 370 p.

ERNANI, P. R.; ALMEIDA, J. A. de, SANTOS, F. C. Potássio. In: NOVAIS, R. F. et al. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 551-594.

FALCÃO, N. P. D. S. **Adubação NPK afetando o desenvolvimento do caule da seringueira e parâmetros fisiológicos do látex**. 1996. 134 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

FUENTES, S. I. et al. Overexpression of cytosolic glutamine synthetase increase photosynthesis and growth at low nitrogen concentration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 358, p. 1071-1081, May 2001.

GARCIA, N. C. P. et al. Seringueira. In: COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG, 1999. p. 317-322.

GIAQUINTA, R. Sucrose hydrolysis in relation to phloem translocation in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Washington, v. 60, p. 339-343, 1977.

GONÇALVES, P. S. et al. Biologia, citogenética e ploidia de espécies do gêneros *Hevea*. **O Agrônômico**, Campinas, v. 41, n. 1, p. 39-59, 1989.

HALLÉ, F.; OLDEMAN, R. A.; TOMLINSON, P. B. **Tropical trees and forest**. Berlim: Springer-Verlag, 1978. 441 p.

HO, L. C. Metabolism and compartmentation of imported sugar in sink organs in relations to sink strength. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 39, p. 355-378, June 1988.

JACKSON, M. L. Nitrogen determinations for soil and plant tissue. In: JACKSON, M. L. (Ed.). **Soil chemical analysis**. Englewood Chiffis: Prentice Hall, 1958. p. 183-204.

JACOB, J. L. et al. Latex flow, cellular regeneration and yield of *Hevea brasiliensis* influence of hormonal stimulation. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT PHYSIOLOGY, 1., 1988, New Delhi. **Proceedings...** New Delhi: Rubber Research Institute of India, 1988. p. 15-20.

KOCH, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 3, p. 235-246, June 2004.

LANCIEN, M.; GADAL, P.; HODGES, M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. **Plant Physiology**, Washington, v. 123, p. 1-8, 2000.

LEA, P. J.; ROBINSON, S. A.; STEWART, G. R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. **The Biochemistry of Plants**, London: Academic Press, v. 16, n. 1, p. 121-159, Jan. 1990.

LEMOS, G. B. et al. Atividade das enzimas de assimilação do N em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas com diferentes relações nitrato/amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, PR: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 11, n. 2, p. 113-118, 1999.

LIM, P. O.; KIM, H. J.; NAM, H. G. Leaf senescence. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 115-136. 2007.

LOEF, I.; STITT, M.; GEIGENBERGER, P. Feeding orotate leads to a specific increase in uridine nucleotide levels, resulting in a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis in discs of growing potato tubers. **Planta**, Berlin, v. 209, n. 3, p. 314-323, Sept. 1999.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.

MARTIM, S. A. **Pulverização do cafeeiro com açúcar**: potencial de uso em mudas submetidas à deficiência hídrica e na recuperação de plantas atingidas por Glyphosate. 2003. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

MIFFLIN, B. J.; HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal Experimental Botânica**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 979-987, Apr. 2002.

MIGUEL, A. A. **Comportamento fotossintético e caracterização morfoanatômica de folhas de diferentes clones de seringueira (*Hevea spp*) em Lavras-MG**. 2005. 155 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORI, T. E. S. **Metabolismo do nitrogênio durante a fase do desenvolvimento reprodutivo da soja**. 1981. 94 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)–Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1981.

MURBACH, M. R. **Efeito da adubação NPK no crescimento na produtividade e na exportação de nutrientes pela seringueira**. 1997. 91 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

MURBACH, M.R. et al. Adubação NPK e produção de borracha seca pela seringueira (*Hevea brasiliensis*). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 71-76, 1999.

NASCIMENTO, S. M. et al. Composição mineral em diferentes órgãos da cupiúva (*Tapirira guianensis* Aubl.) em parte da Floresta Atlântica em Goiana, PE. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, n. 2, p. 128-134, abr./jun. 2007.

OLIVEIRA, D. P. **Variação sazonal da produção de borracha e da atividade da invertase nos clones RRIM-600 e GT-1 de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)**. 1999. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

OLIVEIRA, L. E. M. et al. In: ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Org.). **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008. p. 599-640.

OSBORNE, T. B. **The vegetable proteins**. 2nd ed. London: Longmans Green, 1924. 154 p.

PAHLICH, E. Remarks concerning the dispute related to the function of plant glutamate dehydrogenase: commentary. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa: National Research Council of Canada, v. 74, p. 512-515, 1996.

PALLARDY, S. G. **Physiology of woody plants**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2008. 454 p.

QUICK, W. P.; SCHAFFER, A. A. Sucrose in metabolism in sources and sinks. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A. A. (Ed.). **Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York: M. Dekker, 1996. p. 115-156.

RAIJ, B. et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC, 1996. 285 p. (Boletim técnico, 100).

RATAJCZAK, L.; RATAJCZAK, W.; MAZUROWA, H. The effect of different carbon and nitrogen sources on the activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in lupine embryonic axes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 51, n. 1, p. 277-280, Mar. 1981.

RODRIGUES, M. R. L. et al. Concentração e redistribuição de nutrientes em folhas de *Hevea brasiliensis* e *Pinus oocarpa*. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 21, n. 1, p. 61-66, mar. 2000.

ROITSCH, T.; EHNE, R. Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signaling. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 27, p. 815-825, 2000.

ROQUE, C. G. et al. Estado nutricional e produtividade da seringueira em solo com calcário aplicado superficialmente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 485-490, maio 2004.

ROSADO, P. L.; PIRES, M. D. M.; SANTOS, D. F. D. 2006. Borracha natural: mercado externo e interno. In: ALVARENGA, A. D. P. et al. (Org.). **Seringueira**: aspectos econômicos e sociais e perspectivas para o seu fortalecimento. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 49-72.

SAMSUDDIN, Z.; IMPENS, I. Photosynthetic rates and diffusion resistances of seven *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. clones. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 21, n. 2, p. 154-156, 1979a.

SAMSUDDIN, Z.; IMPENS, I. The development of photosynthetic rates with leaf age in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. clonal seedlings. **Photosynthetica**, Prague, v. 13, n. 3, p. 267-270, 1979b.

SÁ, T. D. de A. Aspectos climáticos da heveicultura. In: VIÉGAS, I. J. M.; CARVALHO, J. G. (Org.). **Seringueira**. Nutrição e adubação no Brasil. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia, 2000. p. 17-34.

SCHUMACHER, M. V.; CALDEIRA, M. V. W. Estimativa da biomassa e do conteúdo de nutrientes em um povoamento de *Eucalyptus globulus* (Labillardière) sub-espécie *maidenii*. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 1, p. 45-53, 2001.

SCHUMACHER, M. V. Estudo da biomassa e dos nutrientes de um povoamento de *Eucalyptus globulus* (Labillardière) sub-espécie *bicostata*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 22, n. 2. p. 281-286. 1998.

SCHUMACHER, M. V. et al. Produção de serrapilheira em uma floresta de *Araucária angustifolia* (Bertol.) Kuntze no município de Pinhal Grande-RS. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 28, n. 1, p. 29-37, 2004.

SECCO, R. S. A botânica da seringueira [(*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D. Jussieu) Muell. Arg.)]. In: ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Org.). **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008. p. 3-24.

SILVA, A. C.; SANTOS, A. R.; PAIVA, A. V. Translocação de nutrientes em folhas de *Hevea brasiliensis* (clone) e em acículas de *Pinus oocarpa*. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v. 4, p. 11-18, 1998.

SHORROCKS, V. M. **Deficiências minerais em *Hevea* e plantas de cobertura associadas**. Brasília: Superintendência da Borracha, 1979. 76 p.

SHORROCKS, V. M. Mineral nutrition, growth and nutrient cycle of *Hevea brasiliensis*: I. growth and nutrient content. **Journal of the Rubber Research Institute of Malasia**, Kuala Lumpur, v. 19, n. 1, p. 1-8, 1965.

SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 94–113.

STITT, M. et al. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 959-970, Apr. 2002.

STURM, A. Invertases: primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, n. 1, p. 1-7, Sept. 1999.

STURM, A.; TANG, G. Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Trends in Plant Science**, London, v. 4, n. 10, p. 401-407, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

TURNER, J.; LAMBERT, M. J. Nutrient cycling in age sequences of two *Eucalyptus* plantation species. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 1701–1712, 2008.

VALÉRIO, C. R. **Resposta do feijoeiro comum ao nitrogênio no plantio em cobertura e em diferentes safras**. 2002. 62 p. Tese (Doutorado em Agricultura)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

VIRGENS FILHO, A. C.; MOREIRA, A.; CASTRO, P. R. C. Efeito da calagem e adubação da seringueira no estado nutricional e produção da borracha seca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 8, p. 1019-1026, ago. 2001.

VIRGENS FILHO, A. C. Organização e exploração do seringal. In: ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Org.). **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008, p. 127-178.

WALLSGROVE, R. M. et al. Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 301-309, May 1983.

WARDLAW, I. F. The control of carbon partitioning in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, n. 3, p. 341-381, Nov. 1990

WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 19, n. 1, p. 31-67, Jan. 2000.

YEMM, E. W.; COCCKING, E. C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, London, v. 80, n. 948, p. 209-213, 1955.

YEMM, E. W.; COCCKING, E. C. The stimulation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemistry Journal**, Ottawa, v. 57, p. 508-514, 1954.