



MARILZA NEVES DO NASCIMENTO

**ENZIMAS ENVOLVIDAS NA HIDRÓLISE DE
SACAROSE EM FOLHAS E CASCA E
ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES
CAULINARES DE SERINGUEIRA**

LAVRAS - MG

2011

MARILZA NEVES DO NASCIMENTO

**ENZIMAS ENVOLVIDAS NA HIDRÓLISE DE SACAROSE EM
FOLHAS E CASCA E ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES
CAULINARES DE 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**

Nascimento, Marilza Neves do.

Enzimas envolvidas na hidrólise de sacarose em folhas e casca e
enraizamento de brotações caulinares de seringueira / Marilza Neves
do Nascimento – Lavras : UFLA, 2010.

104 p. : il.

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

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Bibliografia.

1. *Hevea brasiliensis*. 2. Atividade enzimática. 3. Isoformas de
invertase. 4. Propagação vegetativa. 5. Enzimas sacarolíticas. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.950419524

MARILZA NEVES DO NASCIMENTO

**ENZIMAS ENVOLVIDAS NA HIDRÓLISE DE SACAROSE EM
FOLHAS E CASCA E ENRAIZAMENTO DE BROTAÇÕES
CAULINARES DE 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 29 de julho de 2010

Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome UFLA

Dr. Nelson Delú Filho FEM

Dr. Marcelo Murad Magalhães UFLA

Dr. Paulo Araquém Ramos Cairo UESB

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

Orientador

**LAVRAS – MG
2010**

A minha filha, Ana Luiza e ao meu marido, Robson,
minha motivação principal.

Ao meu pai Hilário (*in memoriam*), à minha mãe Mercedes e aos meus irmãos,
pelo amor, carinho e apoio.

Aos eternos amigos, pelo companheirismo e força.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, que me oferece conforto nas horas de refúgio.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fapemig e ao CNPq, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira, por acreditar na minha capacidade, incentivando-me sempre, com uma palavra amiga e braços abertos, pronto a ajudar.

A minha filha, Ana Luiza, pela alegria e amor infinito, que me fez sentir viva nos momentos mais difíceis.

Ao meu marido, Robson, que tentou compreender minhas ausências e irritações, e sempre esteve ao meu lado.

A minha mãe, Mercedes, e ao meu pai, Hilário (*in memoriam*), pelo exemplo de bondade, esperança, fé e por sempre acreditarem e confiarem em mim.

Aos meus irmãos e familiares, pela constante torcida, em especial minha irmã e amiga Clauzia e minha querida sobrinha Jankerle, pela ajuda nos momentos mais difíceis que passei.

Aos meus sogros, Fátima e Eustáquio, especialmente, pela atenção, preocupação e disposição em me ajudar.

À Sônia, Wilson, Junia e Fernanda, por sempre estarem presentes e dando muita atenção à minha filha.

A todos os integrantes do Grupo Hevea: Patrícia, Genáina, Paulo, Noelly, em especial Aretusa e Karina, que sempre estiveram ao meu lado nos

momentos difíceis que passei durante o período em que realizei minhas análises de laboratório e também a todos os alunos que passaram pelo grupo durante o tempo em que estive cursando o doutorado: Suerlani, Ana Karla, Anderson, Mateus e Laís.

Ao Lisandro e ao Alessandro, pelos ensinamentos e paciência.

Ao pesquisador Marcelo Murad, que sempre esteve presente durante minha formação, desde a iniciação científica, pela boa convivência e pela disponibilidade e paciência em sempre poder me ajudar.

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal, pela boa convivência.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal: Lena, Dartagnan, Evaristo, Joel, Odorêncio e Tina, por toda a ajuda e carinho que sempre tiveram por mim.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação.

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO GERAL

As rotas relacionadas com a hidrólise da sacarose são consideradas ponto de partida para a biossíntese do látex e as principais enzimas que atuam nesse processo são a sacarose sintase (SuSy) e as diferentes isoformas das invertases. No entanto, não se sabe qual é a contribuição relativa de cada uma dessas enzimas na disponibilização de hexoses para o metabolismo. Outro aspecto importante para a heveicultura é a produção de mudas dos clones melhorados e/ou selecionados, que não dependam unicamente do processo de enxertia, a exemplo do enraizamento de brotações caulinares. Entretanto, características químicas e ou anatômicas podem inviabilizar a utilização desse método. Diante do exposto, esse trabalho foi realizado com o objetivo caracterizar as condições apropriadas pelos ensaios *in vitro* e *in vivo* das atividades das enzimas envolvidas na hidrólise de sacarose (invertases e suas isoformas e sacarose sintase) em folha e casca, além de avaliar se constituintes químicos e ou características anatômicas das brotações constituem ou não limitações ao enraizamento de brotações em seringueira. O material vegetal utilizado para avaliação da atividade das enzimas invertases (e suas isoformas) e sacarose sintase (SuSy) foi coletado em 5 plantas adultas de seringueira do clone RRIM 600, com 22 anos. Para o experimento de propagação, o material vegetal (brotações caulinares) foi coletado no jardim clonal, o qual passou por um processo de poda para induzir novas brotações. Os resultados permitiram concluir que, em tecidos de folha e casca de seringueira, a hidrólise da sacarose foi exercida, predominantemente, pelas invertases ácidas. Para os ensaios enzimáticos no tecido de folha, as condições apropriadas foram: ensaio *in vivo*: pH 3,5 para invertase ácida e 7,5 invertase neutra, concentração de sacarose 200 mM e temperatura de 37°C; ensaio *in vitro*: pH 3,5 para invertase ácida e 6,0 invertase neutra, à concentração de sacarose 200 mM e temperatura de 37°C. Para os ensaios enzimáticos no tecido de casca as condições apropriadas foram: ensaio *in vivo*: pH 3,5 para invertase ácida e 6,5 invertase neutra, concentração de sacarose 200 mM; ensaio *in vitro*: pH 4,0 para invertase ácida e 6,5 invertase neutra, concentração de sacarose 200 mM e temperatura de 37°C. Ocorreu hidrólise não enzimática da sacarose na faixa de pH 2,0-3,5. A propagação assexuada por estaquia em seringueira não se mostrou promissora. Foi observado que as auxinas não induziram o sistema radicial e que as brotações caulinares com sete semanas de desenvolvimento apresentaram uma bainha de esclerênquima perivascular contínua, possivelmente atuando como uma barreira anatômica a emergência do primórdio radicular. O látex da seringueira promoveu um efeito inibitório no enraizamento de mandioca, quando as mudas foram submetidas a diferentes tempos de imersão.

Palavras chaves: *Hevea brasiliensis*. Atividade enzimática. Isoformas de invertases. Propagação vegetativa.

ABSTRACT

The pathways related to the hydrolysis of sucrose are considered the starting point for the biosynthesis of latex and the key enzymes involved in this process are the sucrose synthase (SuSy) and different isoforms of invertases, however, the relative contribution of each of these enzymes in the hexoses production for the metabolism is not known. The production of selected and/or improved clones is another important aspect to the culture of rubber trees beyond simply depending on grafting process, following the example of rooting shoot cuttings, however chemical and/or anatomical characteristics can derail the usage of this method. Thus, this study aimed to characterize the appropriate conditions for *in vitro* and *in vivo* tests on the activities of the enzymes involved in the hydrolysis of sucrose (invertases and their isoforms and sucrose synthase) in the leaf and bark, in addition to assess whether chemical components and/or anatomical characteristics of sprouts constitute limitations to rooting of the structures in rubber trees. The plant material used for evaluating the activity of the invertase enzymes (and its isoforms) and sucrose synthase (SuSy) was collected from 5 adult plants of rubber trees from clone RRIM 600 at 22 years of age. The plant material (shoot cuttings) was collected in a clonal garden for the plant material propagation experiment, in which the plants were submitted to pruning to induce new shoots. The results led to the conclusion that in the leaf and bark tissues from rubber trees, the hydrolysis of sucrose was carried out predominantly by the acidic invertases. The appropriate conditions for the enzymatic assays in leaf tissues were: *in vivo* assay: pH 3.5 for the acidic invertase and 7.5 for the neutral invertase, 200 mM sucrose concentration and temperature of 37 °C; *in vitro* assay: pH 3.5 for the acidic invertase and 6.0 for the neutral invertase, 200 mM sucrose concentration and a temperature of 37 °C. The appropriate conditions for the enzymatic assays in the bark tissue were: *in vivo* assay: pH 3.5 for the acidic invertase and 6.5 for the neutral invertase, 200 mM sucrose concentration; *in vitro* assay: pH 4.0 for the acidic invertase and 6.5 for the neutral invertase, 200 mM sucrose concentration and a temperature of 37 °C. Non-enzymatic hydrolysis of sucrose occurred in the range of pH 2.0-3.5. The asexual propagation by stem cuttings in the rubber tree did not prove to be promising. It was observed that the auxins did not induce the rooting system and that the stem budding showed a continuous perivascular sheath of sclerenchyma after seven weeks of development, possibly acting as an anatomical barrier towards the emergence of the root primordium. The rubber tree latex promoted an inhibitory effect on the rooting process of cassava, when these were subjected to different immersion times.

Keywords: *Hevea brasiliensis*. Enzyme Activity. invertase isoforms. Vegetative propagation.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3

Figura 1	Seções transversais de brotações de plantas de seringueira em diferentes idades ontológicas, após o surgimento das brotações. A) 3 semanas, B) 4 semanas, C) 5 semanas. X, Es e F indicam xilema, esclerênquima e floema, respectivamente. Barra= 100µm.....	94
Figura 2	Seções transversais de brotações de plantas de seringueira com seis semanas de desenvolvimento. A) visão distanciada; B) visão aproximada. X, Es e F indicam xilema, esclerênquima e floema, respectivamente. Barra= 100µm.....	96
Figura 3	Seção transversal de brotações de plantas de seringueira com sete semanas de desenvolvimento. X, Es e F indicam xilema, esclerênquima e floema, respectivamente. Barra= 100µm.....	97
Figura 4	Morte celular da parte basal da brotação de mandioca, quatro semanas após a aplicação do látex.....	99

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

Gráfico 1	Atividade <i>in vivo</i> (A) e <i>in vitro</i> (B) das invertases e SuSy, em função do pH do meio de incubação em lâmina foliar completamente expandida de seringueira do clone RRIM. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições.....	61
Gráfico 2	Concentração de açúcares redutores no meio de reação sem enzima em função do pH dos diferentes tampões utilizados no meio de reação. As barras representam o erro padrão da média de três repetições.....	65
Gráfico 3	Atividade <i>in vivo</i> (A) e <i>in vitro</i> (B) das invertases ácida e neutra, em função da concentração de sacarose no meio de incubação em lâmina foliar completamente expandida de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições.....	67
Gráfico 4	Teor de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose em lâmina foliar completamente expandida (estádio D) de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de três repetições.....	68
Gráfico 5	Atividade <i>in vivo</i> (A) e <i>in vitro</i> (B) das invertases ácida e neutra, em função da temperatura em lâmina foliar completamente expandida de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições.....	70
Gráfico 6	Atividade <i>in vivo</i> (A) e <i>in vitro</i> (B) das invertases e SuSy, em função do pH do meio de incubação em casca de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições.....	72
Gráfico 7	Atividade <i>in vivo</i> (A) e <i>in vitro</i> (B) das invertases ácida e neutra, em função da concentração de sacarose no meio de incubação em casca de seringueira do clone RRIM. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições.....	74

Gráfico 8	Teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose em casca de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições.....	75
Gráfico 9	Atividade <i>in vivo</i> (A) e <i>in vitro</i> (B) das invertases ácida e neutra, em função da temperatura em casca de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições.....	77
CAPÍTULO 3		
Gráfico 1	Número de raízes e comprimento da maior raiz em brotações de mandioca, em diferentes concentrações de látex, no tempo de 2 horas de imersão.....	101

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Médias das estacas enraizadas, vivas e mortas, sob diferentes concentrações de látex em três tempos de imersão.....	100
----------	---	-----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL	
1	INTRODUÇÃO..... 16
2	REFERENCIAL TEÓRICO..... 19
2.1	Exploração da seringueira..... 19
2.2	Sistema fonte e dreno: produção e transporte de sacarose na biossíntese de látex em seringueira..... 21
2.3	Produção de mudas por enraizamento de brotações caulinares... 29
	REFERÊNCIAS 38
CAPÍTULO 2: Enzimas envolvidas na hidrólise de sacarose em casca e folha de seringueira [Hevea brasiliensis (Wild. ex. Adr. de Juss.) Muell. Arg.]..... 49	
1	INTRODUÇÃO..... 52
2	MATERIAL E MÉTODOS..... 55
2.1	Ensaio <i>in vivo</i>..... 56
2.2	Ensaio <i>in vitro</i> 57
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 60
3.1	Atividades, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>, das enzimas invertases e SuSy, em função do pH do meio de reação em folha..... 60
3.2	Atividades, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>, das enzimas invertases em função da concentração de sacarose no meio de reação em folha..... 65
3.3	Atividades, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>, das enzimas invertases em função da temperatura do meio de reação em folha 69
3.4	Atividades, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>, das enzimas invertases e SuSy, em função do pH do meio de reação em casca..... 71
3.5	Atividades, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>, das enzimas invertases, em função da concentração de sacarose em casca..... 73
3.6	Atividades, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>, das enzimas invertases, em função da temperatura do meio de reação em casca..... 76
4	CONCLUSÕES..... 78
	REFERÊNCIAS 79

	CAPÍTULO 3: Produção de mudas clonais por estaquia em seringueira	84
1	INTRODUÇÃO.....	87
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	89
2.1	Experimento 1: Avaliação de diferentes concentrações de AIB e ANA no enraizamento de brotações caulinares de seringueira.....	89
2.2	Experimento 2: Avaliação da ontogênese do anel esclerenquimático em brotações de seringueira	90
2.3	Experimento 3: Avaliação de diferentes concentrações de AIB e ANA no enraizamento de brotações caulinares sem a presença da barreira anatômica.....	91
2.4	Experimento 4: Avaliação da influência de diferentes concentrações de látex no enraizamento de mandioca.....	92
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
3.1	Experimento 1: Avaliação de diferentes concentrações de AIB e ANA no enraizamento de brotações caulinares de seringueira.....	93
3.2	Experimentos 2 e 3: Ontogênese do anel esclerenquimático em brotações de seringueira e avaliação de diferentes concentrações de AIB e ANA no enraizamento de brotações caulinares de clones de seringueira antes da formação do anel esclerenquimático.....	93
3.3	Experimento 4: Influência de diferentes concentrações de látex no enraizamento de mandioca.....	98
4	CONCLUSÕES.....	102
	REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

A seringueira é considerada uma das culturas mais importantes do mundo, por ser a maior fonte de borracha natural, matéria-prima utilizada na manufatura de uma grande quantidade de produtos essenciais para a humanidade. A evolução da produção e do consumo de borracha natural no Brasil mostra que o consumo cresce em taxa bem superior à produção, gerando déficits e importações crescentes do produto.

Alguns autores (CAIRO et al., 2009; MIGUEL et al., 2007) sugerem que o estudo sobre o metabolismo que envolve a produção de látex pode ser uma ferramenta importante para a distinção de clones mais promissores, principalmente as rotas relacionadas com o sistema fonte/dreno que envolve a assimilação de CO₂, e também o transporte de sacarose a partir dos locais de síntese primária de carboidratos (fonte) e o consumo dos assimilados nos órgãos que os utilizam como precursores da biossíntese de látex (drenos).

Em seringueira, têm sido realizados estudos relacionados com as enzimas envolvidas no metabolismo do carbono, principalmente as enzimas de hidrólise de sacarose, tais como a sacarose sintase (SuSy) e as invertases, tanto na fonte como no dreno (CAIRO et al., 2009; OLIVEIRA; OLIVEIRA; DELU FILHO, 2006). Na avaliação da atividade dessas enzimas, utilizam-se ensaios diferentes *in vitro* e *in vivo*, apresentando dados que não permitem identificar qual isoforma atua de forma mais intensa, principalmente em relação à atividade das invertases ácida vacuolar e da invertase ácida apoplástica e também a distinção entre as atividades da invertase neutra e da SuSy.

Cairo (2007) sugere que o emprego do ensaio *in vitro* favorece a quantificação de açúcares redutores produzidos pela ação das enzimas solúveis (invertase neutra, invertase ácida vacuolar e SuSy). Já pelo ensaio *in vivo*, tende a quantificar predominantemente o produto da ação da invertase ácida apoplástica. Sendo assim, estudos envolvendo a determinação das condições

apropriadas dessas enzimas em seringueira devem ser realizados para compreender a contribuição de cada uma na disponibilização de hexoses para a biossíntese de látex.

Outro aspecto importante para o crescimento da heveicultura no país é a produção de mudas de clones melhorados e ou selecionados, que não dependam unicamente do processo de enxertia, a exemplo do método de propagação rápida da mandioca desenvolvido pelo CIAT (COCK et al., 1976). Isso porque se deve levar em consideração que o processo de enxertia apresenta alguns inconvenientes, como: os porta-enxertos produzidos podem apresentar heterogeneidade, incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto, além de as sementes apresentarem caráter recalcitrante e, portanto, inviáveis para o armazenamento, impedindo a produção de mudas em diferentes épocas do ano.

A utilização do enraizamento de brotações caulinares é uma alternativa para substituir a produção de mudas por enxertia (borbulhia) utilizando porta-enxertos oriundos de sementes, a fim de se obter um número elevado de mudas com rapidez, baixo custo, manutenção das características desejáveis do clone matriz e mudas uniformes em todas as épocas do ano e, ainda, que permitam ser utilizados em grande escala comercial. Entretanto, os estudos de enraizamento de brotações de seringueira realizados até o momento não têm sido bem sucedidos, provavelmente devido à interferência de inibidores químicos e/ou barreiras anatômicas presentes nas estacas/brotações.

Diante do exposto, formulou-se, aqui, a hipótese de que as enzimas sacarose sintase (SuSy) e as diferentes isoformas das invertase estão atuando na hidrólise de sacarose. No entanto, não se sabe a contribuição relativa de cada uma dessas enzimas na disponibilização de hexoses para o metabolismo da biossíntese de látex. Considera-se também a hipótese de que o enraizamento de brotações caulinares pode ser uma opção viável para a produção de mudas

clonais em seringueira, entretanto, características químicas e/ou anatômicas constituem ou não limitações que podem inviabilizar a utilização desse método.

No intuito de testar a viabilidade destas hipóteses, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar as condições apropriadas, pelos ensaios *in vitro* e *in vivo*, das atividades das enzimas envolvidas na hidrólise de sacarose (invertases e suas isoformas e sacarose sintase) em folha e casca, além de avaliar se constituintes químicos e ou características anatômicas das brotações constituem ou não limitações ao enraizamento de brotações em seringueira.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Exploração da seringueira

A seringueira pertence ao gênero *Hevea*, da família Euphorbiaceae, sendo encontrada naturalmente em uma área muito ampla, que abrange a Amazônia Brasileira, Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela, Equador, Suriname e Guiana. O gênero *Hevea* compreende as seguintes espécies: *H. brasiliensis*, *H. guianensis*, *H. benthamiana*, *H. nítida*, *H. rigidifolia*, *H. camporum*, *H. sipruceana*, *H. microphylla*, *H. camargoana*, *H. paludosa* e *H. pauciflora*, das quais a *Hevea brasiliensis* [(Willd. Ex. Adr. de Juss.) Muell.-Arg.] é a mais importante e a única cultivada e explorada comercialmente, por apresentar maior capacidade produtiva e qualidade de látex superior às demais (SECCO, 2008).

A heveicultura tem se destacado como mais uma opção ao agronegócio, pois, além de fornecer a matéria-prima essencial, borracha natural, para a fabricação de uma ampla variedade de produtos para a indústria (automobilística, materiais médico-hospitalares, calçados, móveis, etc.), suas sementes lipídicas podem ser utilizadas para a produção de biocombustíveis. Em termos de benefícios sociais e econômicos, destaca-se pela sua capacidade de geração de emprego, aumento da renda familiar, fixação do homem no campo, desenvolvimento econômico local e regional, receita com a venda da borracha e valorização da terra.

Nos últimos anos, os benefícios da heveicultura têm sido reconhecidos, também, pela ótica da sustentabilidade ambiental. A crescente concentração de CO₂ na atmosfera à taxa de 0,4% ao ano, causada por fatores diversos, tem provocado elevações na temperatura média mundial, além de contribuir para uma queda na qualidade do ar. A produção de fitomassa em plantas arbóreas e de grande porte, como a seringueira, associada à produção contínua de látex,

resulta no “sequestro” de carbono, promovido pela fotossíntese das plantas, cujo processo contribui para a redução da concentração de CO₂ no ar atmosférico, amenizando os problemas do “efeito estufa”. Há estudos que evidenciam que alguns seringais podem gerar reduções certificadas de emissões de até 249,6 toneladas de CO₂/ha.ano (JACOVINE et al., 2006; NISHI et al., 2005). O cultivo de seringueira pode, ainda, contribuir para a proteção do solo contra erosão e para a recuperação de áreas degradadas.

Atualmente, os maiores produtores mundiais de borracha natural são os países asiáticos, principalmente Tailândia, Indonésia e Malásia (INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP - IRSG, 2009). A produção de borracha natural mundial em 2008 foi superior a 10,1 milhões de toneladas, sendo 93,2% oriundas de países asiáticos (IRGS, 2009). A demanda mundial por borracha acompanha o crescimento da produção mundial de bens como um todo. Caso a demanda continue crescendo com a atual taxa, o mundo enfrentará um déficit na oferta de borracha natural de um milhão de toneladas em 2020 (GAMEIRO; GAMEIRO, 2008).

Apesar de o Brasil ser o país de origem da *Hevea brasiliensis* e possuir áreas aptas ao seu cultivo e tecnologia disponível, contribuiu, em 2008, com pouco mais de 1% da produção mundial (117,6 mil toneladas). A participação brasileira no consumo mundial foi de 351,8 mil toneladas, exibindo um déficit de cerca de 70%, que é suprido com importações do produto (IRGS, 2009).

A história da produção da borracha natural brasileira mostra que o país desfrutou da condição de principal produtor e exportador mundial no início do século XX, passando a ser, hoje, importador desta matéria-prima (BERNARDES; VEIGA; FONSECA FILHO, 2000). O estado de Minas Gerais destaca-se por apresentar uma grande área climaticamente favorável ao desenvolvimento da cultura e por ser uma área não favorável ao desenvolvimento do fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) von Arx. (CAMARGO;

MARIN; CAMARGO, 2003). Além disso, os seringais mineiros apresentam produtividade média de 1.500 kg de borracha seca/ha.ano. Estes índices, quando comparados com as médias dos principais países produtores, como Tailândia, Indonésia, e Malásia, cujas produtividades médias variam entre 750 e 1.100 kg/ha.ano, colocam o estado entre as regiões mais produtivas do mundo (CAVALCANTE; CONFORTO, 2006; COSTA et al., 2008; MESQUITA et al., 2006b).

2.2 Sistema fonte e dreno: produção e transporte de sacarose na biossíntese de látex em seringueira

Com a evolução dos vegetais superiores, ocorreu a divisão de funções entre as diferentes células, tecidos e órgãos, além do desenvolvimento de um sistema de controle e transporte entre os mesmos, para a interconexão e a coordenação dos trabalhos realizados em diferentes tecidos (WALDLAW, 1990).

Devido à dinâmica dos metabólitos formados nos tecidos fonte e os assimilados nos tecidos dreno, a planta tende a acumular matéria seca no órgão de armazenamento. Fonte é o conjunto de órgãos ou tecidos responsáveis pela produção e exportação de metabólitos, a partir dos intermediários sintetizados no processo fotossintético. O dreno é o conjunto de órgãos ou tecidos que utilizam ou armazenam os metabólitos produzidos e exportados pela fonte. É evidente a integração entre fonte e dreno, sendo a demanda intimamente associada ao fornecimento de fotoassimilados.

O controle da integração entre a fonte e o dreno se dá pela forte relação existente entre os tecidos. A exportação de sacarose das células foliares representa o principal fator de ligação entre a assimilação do carbono pela fonte e a sua utilização no dreno (ROITSCH; EHNE, 2000).

A seringueira é considerada um sistema produtivo composto por folhas, que são responsáveis pela produção de fotoassimilados e por outros órgãos (folhas, raízes, caule e ramos, flores e frutos), que são consumidores desses fotoassimilados, pelo menos em uma parte de sua vida. A biossíntese de látex e, conseqüentemente, a produção de borracha, são o resultado de uma complexa cadeia de eventos biofísicos, nutricionais e metabólicos que estão relacionados com fatores diversos, tais como a variação das condições climáticas, a produção e o transporte de fotoassimilados, a disponibilidade de carboidratos de reserva e a demanda por outros tecidos drenos das árvores (CAIRO et al., 2009; MESQUITA et al., 2006a, 2006b; MIGUEL et al., 2007).

Nas folhas de seringueira (tecidos-fontes), por meio do processo fotossintético, são produzidos os carboidratos, os quais devem ser transportados para os drenos (células laticíferas), onde ocorre o descarregamento do floema. Devido a limitações de natureza química para o transporte no floema, os carboidratos simples, que têm caráter redutor, devem ser convertidos a sacarose por uma seqüência de reações catalisadas pelas enzimas sacarose-P sintase (SPS) e sacarose-P fosfatase, sendo a SPS a enzima reguladora do processo.

A partição desses fotoassimilados é complexa, pois há uma alteração na relação fonte-dreno, após o início da sangria, observando-se uma redução no ritmo de crescimento das plantas, tendo em vista que a partição dos fotoassimilados produzidos nas folhas, em particular a sacarose, antes direcionada para atender apenas à demanda dos diferentes órgãos-drenos naturais da planta, passa a ser fortemente dirigida à reconstituição do látex extraído por meio da sangria e da regeneração da casca (VIRGENS FILHO, 2008), tornando-se importantes drenos induzidos durante a fase de produção da cultura (CAIRO et al., 2009; MESQUITA et al., 2006b; VIRGENS FILHO, 2008).

A sacarose é um dissacarídeo formado pela ligação glicosídica entre o carbono 1 da glicose e o carbono 2 da frutose, sendo, portanto, um açúcar não redutor. É o principal produto transportado via floema e distribuído entre diferentes órgãos da planta, atuando como uma importante fonte de carbono e energia (WELHAM et al., 2009).

O transporte de sacarose do tecido fonte (carregamento do floema) para o dreno (descarregamento do floema) ainda não está completamente elucidado em todas as espécies vegetais, mas o suprimento de sacarose é um passo limitante para o crescimento dos tecidos dreno. Utilizando sacarose marcada com isótopo radioativo e analisando a composição da seiva apoplástica de frutos de tomates, foi mostrado que a sacarose pode ser descarregada simplásticamente e ou apoplásticamente (DAMON et al., 1988).

Quando o descarregamento ocorre pela rota simplástica, os solutos são transferidos entre as células via espaço citosólico (plasmodesmas) e na rota apoplástica, os solutos são transferidos via parede celular. Quando a sacarose é descarregada pelo simplasto, ela pode ser preferencialmente hidrolisada pela sacarose sintase, pela invertase neutra ou pela invertase ácida do vacúolo (ROBINSON; HEWITT; BENNETT, 1988) e, quando ela é descarregada pelo apoplasto, ela é preferencialmente hidrolisada pela invertase ácida da parede celular (DAMON et al., 1988). Essas atividades regulam a entrada da sacarose em diferentes rotas bioquímicas, como respiração e biossíntese de polissacarídeos, para a parede celular ou para armazenamento. Como tais enzimas estão envolvidas no descarregamento e, conseqüentemente, na alocação de carbono nos drenos, interferindo no crescimento e metabolismo, o papel metabólico dessas enzimas de clivagem e/ou de síntese da sacarose é motivo de muitos estudos. Assim, a rota de descarregamento do floema pode ser diferente não apenas pelo tipo de dreno, mas também pelo seu estágio de

desenvolvimento, função e condições de crescimento e mais de uma rota pode existir ao longo do desenvolvimento do tecido (GEROMEL, 2006; HO, 1988).

As plantas parecem possuir vários transportadores de sacarose para coordenar o transporte nos diversos tecidos, em diferentes estádios de desenvolvimento e sob várias condições ambientais (WILLIAMS; LEMOINE; SAUER, 2000). Tais transportadores devem mover os açúcares contra um gradiente, para concentrá-los nos elementos de tubo crivado, estabelecendo condições que proporcionem o mecanismo de translocação do floema.

O primeiro transportador de sacarose foi isolado de espinafre e sua atividade funcional estudada por expressão heteróloga de seu cDNA em *Saccharomyces cerevisiae* (SoSUT1) (RIESMEIER; WILLMITZER; FROMMER, 1992). Isso possibilitou a investigação do papel e da localização dos transportadores de sacarose e a elucidação do mecanismo de carregamento e descarregamento do floema em plantas superiores (MATSUKURA et al., 2000). Assim, vários outros cDNAs codificadores de cotransportadores H⁺-sacarose foram isolados, dentre eles: StSUT1 de batata (RIESMEIER; WILLMITZER; FROMMER, 1994), SUC1 e SUC2 de *Arabidopsis* (SAUER; STOLZ, 1994), e PmSUC1 e PmSUC2 de *Plantago major* (GAHRTZ; STOLZ; SAUER, 1994). Estes transportadores são proteínas altamente hidrofóbicas, cuja estrutura consiste de dois grupos de seis regiões α -hélice transmembranas, que se separam por uma alça citoplasmática central (WILLIAMS; LEMOINE; SAUER, 2000). Sua localização no complexo ETC-CC (elementos do tubo crivado - célula companheira) está, provavelmente, relacionada com a sua função de mediar a captação de sacarose no floema, a partir do apoplasto (KHUN et al., 1996; RIESMEIER; WILLMITZER; FROMMER, 1992).

Em seringueira, ainda não é conhecido o tipo de descarregamento que ocorre nos drenos. Sabe-se, no entanto, que as enzimas de hidrólise de sacarose têm forte relação com o desempenho produtivo das plantas.

O processo de biossíntese de látex está intimamente relacionado com rotas metabólicas geradoras de energia, como também processos anabólicos (PUJADE-RENAUD et al., 1994). A sequência de reações que participam da biossíntese de látex envolve a hidrólise da sacarose, cujo processo libera hexoses para iniciar a glicólise e gerar piruvato, o qual será convertido pela enzima piruvato desidrogenase a acetil-CoA. A partir do acetil-CoA, inicia-se o anabolismo de isoprenos com o consumo de energia, nas formas de NADPH e ATP, o que permite a formação do isopentenil difosfato (IPP), unidade básica da borracha.

Nos drenos, a sacarose pode ser hidrolisada, por intermédio da ação catalisadora de duas enzimas: invertases (e suas isoformas), que hidrolisam a sacarose em glicose e frutose, que são enzimas que possuem um baixo K_m para sacarose (7 a 15 mM) e sacarose sintase (SuSy), que converte sacarose e UDP em frutose e UDP-glicose, uma enzima que possui um K_m para a sacarose relativamente alto (40 a 200 mM) e a atividade da enzima é limitada pelas concentrações de sacarose e UDP no citosol. Esse processo de hidrólise da sacarose é considerado o ponto de partida para a biossíntese do látex, pois essas enzimas assumem importante papel como reguladores metabólicos, uma vez que atuam fornecendo hexoses para atender à demanda metabólica da biossíntese de látex.

As plantas possuem um grupo de invertases que são definidas como ácidas e neutras, baseadas no pH ótimo de reação (ROITSCH; GONZALEZ, 2004; STURM, 1999; TYMOWSKA-LALANNE; KREIS, 1998). As invertases ácidas estão localizadas no vacúolo (invertases ácidas solúveis) ou associadas à parede celular (invertases ácidas insolúveis), enquanto as neutras (invertase neutra solúvel) estão localizadas no citosol (STURM, 1999; TYMOWSKA-LALANNE; KREIS, 1998).

Embora a enzima SuSy catalise uma reação reversível para a reação de síntese de sacarose (GEIGENBERGER; STITT, 1993), sua principal função fisiológica está relacionada à clivagem da sacarose nos órgãos drenos (HAWKER, 1985), sendo bastante facilitada pela elevada concentração de sacarose no floema e nas regiões de descarregamento do floema (KRUGER, 1993). Desde a sua descoberta, por Leloir e colaboradores, em 1955 (CARDINI; LELOIR; CHIRIBOGA, 1955), a SuSy tem sido reconhecida como de importante papel em vários processos metabólicos de plantas. Trata-se de uma glicosil transferase, cuja ação enzimática tem sido associada à determinação da força de drenos (ZRENNER et al., 1995) e tecidos vegetativos em desenvolvimento (PFEIFFER; KUTSCHERA, 1995).

Existem evidências de que a ação predominante desta enzima é no sentido da clivagem da sacarose, produzindo UDP-glicose e frutose. De acordo com Kruger (1993), pelo menos três argumentos sustentam essas evidências.

O primeiro argumento tem relação com a distribuição da SuSy em diferentes tecidos. A atividade da SuSy é geralmente baixa em células fotossintéticas e gliconeogênicas e é, muitas vezes, alta em tecidos com intensa atividade de crescimento, os quais dependem da sacarose como o seu substrato respiratório. Este é um aspecto que precisa ser mais bem estudado no processo de regeneração de casca de seringueira.

Em segundo lugar, em alguns tecidos, a atividade das invertases é muito menor que a da SuSy, mostrando-se insuficiente para catalisar o metabolismo da sacarose. Um bom exemplo disso é o tubérculo da batata, no qual as invertases ácida e alcalina têm atividades tão baixas que a SuSy parece assumir quase integralmente a clivagem da sacarose. Por fim, estudos realizados com mutantes de milho revelam que uma redução dos níveis de SuSy em endosperma em desenvolvimento restringe a capacidade desse tecido de metabolizar sacarose (BOYER, 1985).

Vários relatos têm indicado que a biossíntese de borracha é fortemente regulada pela disponibilidade de sacarose, sendo considerado um fator limitante nas regiões dreno (MORAES et al., 1978; TANGPAKDEE et al., 1997; TUPPY, 1985). Além disso, estes trabalhos sugerem que o fluxo de sacarose nas células laticíferas é regulado pela sua hidrólise, o que envolve as enzimas responsáveis pela sua síntese e degradação. Vários trabalhos têm evidenciado essas enzimas como responsáveis pelo fluxo e hidrólise de sacarose nos tecidos drenos (NGUYEN-QUOC; FOYER, 2001; STURM, 1999).

Em alguns trabalhos tem sido demonstrado que a atividade das invertases solúveis do “soro C” tem relação positiva com a produtividade, uma vez que indica a capacidade de regeneração do látex entre sangrias consecutivas (MESQUITA et al., 2006a).

Segundo Mesquita et al. (2006a), tanto a SuSy como as invertases solúveis promovem a hidrólise da sacarose em açúcares redutores no “soro C” da seringueira, sendo a invertase neutra a enzima mais efetiva na clivagem da sacarose. Segundo os autores, a atividade da SuSy, quando comparada à da invertase neutra, é pelo menos duas vezes menor, porém, a participação efetiva de cada uma dessas enzimas no látex e sua relação com a biossíntese do mesmo ainda não estão claramente elucidadas e carecem de estudos mais aprofundados, especialmente quanto à caracterização das mesmas e metodologias de extração e ensaio.

Cairo et al. (2009), avaliando plantas de seringueira em um jardim clonal, verificaram que a variação sazonal das condições ambientais pode provocar oscilações na atividade das enzimas invertases e SuSy. Sendo a atividade dessas enzimas nos clones avaliados (RRIM 600 e GT 1) mais elevada no período quente e chuvoso do que no período frio e seco. Vale ressaltar que a temperatura parece ter sido o fator ambiental que exerceu maior influência sobre a variação da atividade enzimática. Segundo os autores, estes resultados sugerem

uma possível associação entre a atividade das invertases e SuSy e o desempenho produtivo de plantas adultas e em franca produção. Entretanto, novos estudos em plantios clonais comerciais devem ser realizados para confirmar tais resultados, uma vez que essas informações foram obtidas em plantas de um jardim clonal e, portanto, com características de plantas jovens.

Segundo Cairo et al. (2009), a hidrólise de sacarose na casca foi exercida predominantemente pela ação da invertase ácida e, em proporções menores e equivalentes, essa atividade foi complementada pela ação da SuSy e da invertase neutra. Para analisar a atividade dessas enzimas, os autores testaram os métodos de extração “in vivo” e “in vitro” e verificaram que o método “in vivo” detectou atividade das enzimas até oito vezes maior que no método “in vitro”.

Os autores sugerem que, devido às possibilidades múltiplas de otimização das metodologias para avaliação da atividade das invertases em tecidos da casca de seringueira, novas investigações sejam realizadas, pois ainda não se sabe qual a verdadeira contribuição das isoformas das invertases (invertases solúveis e insolúveis) e da própria SuSy no metabolismo de biossíntese de látex.

De acordo com Cairo et al. (2009), a atividade da enzima SuSy e da invertase neutra apresentam atividades semelhantes. A única diferença nas condições de ensaio, *in vitro* e *in vivo*, foi a utilização da uridina difosfato (UDP), ou seja, a metodologia utilizada não separa a atividade das enzimas, podendo estar atuando as duas enzimas em conjunto.

Outra questão a ser elucidada é que o emprego do ensaio *in vivo* favorece a quantificação de açúcares redutores produzidos pela atividade da invertase ácida apoplástica e não pela invertase ácida vacuolar, uma vez que o material vegetal é adicionado diretamente ao meio de reação (CAIRO, 2007). No entanto, os transportadores de sacarose podem estar atuando nesse ensaio, fazendo com que ocorra a ação das diferentes enzimas de hidrólise de sacarose.

2.3 Produção de mudas por enraizamento de brotações caulinares

A enxertia por borbulhia é o método de propagação utilizado na produção comercial de mudas de seringueira, mas apresenta alguns inconvenientes que podem dificultar a produção comercial de mudas e obtenção de plantas uniformes quanto ao sistema radicular. Os porta-enxertos são oriundos de sementes de seringais nativos ou cultivados. As sementes apresentam caráter recalcitrante, ou seja, perdem rapidamente o poder germinativo quando o seu teor de água é reduzido a valores inferiores a 30% (BONOME, 2006; CHIN et al., 1981). Esta característica dificulta o armazenamento das sementes, restringindo a oferta de mudas em determinadas épocas do ano (FONSECA; FREIRE, 2003).

Os porta-enxertos produzidos para a produção de mudas de seringueira podem apresentar heterogeneidade e ser incompatíveis com os enxertos. Além disso, as interações fisiológicas entre porta-enxerto e enxerto podem influenciar os dados de produção do clonado.

A formação de muda de seringueira por enxertia, nas “regiões escapes”, como São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Goiás e Paraná, pode variar de 18 a 24 meses. Esse longo período no viveiro aumenta o custo da muda, por promover aumentos de gastos na utilização de mão-de-obra e de defensivos e fertilizantes.

A superação destes aspectos na produção de mudas pode ser obtida com o enraizamento de brotações caulinares por ser uma alternativa que substitui a utilização de sementes na propagação da seringueira e, por conseguinte, minimizar os problemas dessa cultura. Ainda são escassas as informações acerca da produção de mudas de seringueira que não dependam unicamente do processo convencional de enxertia (borbulhia). A propagação por estaquia, especialmente por meio do enraizamento de brotações caulinares, à semelhança

do que é feito com a propagação rápida da mandioca (*Manihot esculenta* L. Crantz) (COCK et al., 1976), poderia constituir num método agronomicamente e comercialmente viável, que permita a obtenção de uma grande quantidade de plantas com rapidez e baixo custo, com as mesmas características de sistema radicular e copa do clone matriz de origem, promovendo a manutenção das características desejáveis da planta matriz propagada.

O enraizamento de estacas/brotações caulinares é um processo complexo, estando associado a estresse por dano mecânico, mudanças nas relações de água na planta e perda de influências correlativas devido à separação da parte aérea do sistema radicular original, sendo regulado pela interação de múltiplos fatores, como fito-hormônios, carboidratos, compostos fenólicos, estado fisiológico da planta-mãe e características genéticas, substâncias nitrogenadas e aminoácidos (HARTMANN et al., 2002).

A obtenção de plantas pelo enraizamento de estacas/brotações caulinares é um processo impraticável para algumas espécies que não têm a composição química endógena necessária. Esse entrave pode ser resolvido com o emprego de alguns reguladores vegetais, especificamente do grupo das auxinas e de cofatores do enraizamento, cuja função é estimular acelerar e uniformizar o enraizamento de estacas de plantas de difícil enraizamento (ONO et al., 1994; ZANETTE, 1995).

O sucesso na propagação de uma espécie por esse método varia, principalmente, de acordo com a época do ano, o balanço hormonal e outras substâncias necessárias ao enraizamento (PEDRAS; SILVA, 1997). Sendo assim, vários são os fatores que estão envolvidos no processo de enraizamento de estacas, tanto fatores exógenos como endógenos, podendo-se citar estado fisiológico da planta matriz (presença de carboidratos, substâncias nitrogenadas, aminoácidos, auxinas, compostos fenólicos e outras substâncias), período e posição de coleta do material vegetal, juvenildade, estiolamento, presença de

folhas e gemas, idade da planta matriz e fatores do ambiente, como disponibilidade de água, luminosidade e substrato (GOMES, 1986; HARTMANN et al., 2002).

A indução do sistema radicial é provocada pela ação do ácido indol acético (IAA), uma auxina natural, que atua em conjunto com carboidratos, compostos nitrogenados e vitaminas. A primeira auxina isolada foi o ácido indol acético (IAA) que, junto com o ácido indol butírico (IBA), forma o grupo de auxinas mais conhecidas. Essas substâncias têm como principal função regular o alongamento celular e as respostas a estímulos unidirecionais, conhecidos como tropismo, além de agir no crescimento apical do caule, na divisão da carioteca, no desenvolvimento de frutos, na abscisão foliar e na formação de raízes adventícias em estacas (BENINCASA; LEITE, 2004).

A biossíntese do IAA está associada aos tecidos com rápida divisão celular e crescimento, especialmente nas partes aéreas. Porém, quase todos os tecidos vegetais são capazes de produzir baixos níveis de IAA. Os meristemas apicais, as folhas jovens, os frutos e as sementes em desenvolvimento são os principais locais de síntese. Os níveis de IAA livre nas plantas são controlados por mecanismos de biossíntese, conjugação, degradação, transporte e compartimentalização. Esse processo pode ser influenciado por fatores do meio ambiente e pela idade fisiológica da planta ou do órgão (BENINCASA; LEITE, 2004).

Após a aplicação de auxinas exógenas, ocorre transporte polar, causando o rápido acúmulo dessa substância na porção basal. O acúmulo de auxina causará a formação de uma dilatação ou calo. Esse calo é constituído por muitas células parenquimatosas, resultantes dos novos centros meristemáticos formados, ou da ativação de células do câmbio. As células destes tecidos podem vir a se diferenciar, formando os primórdios radiciais. No entanto, a formação de raízes adventícias e de calos é independente. A iniciação radicial decorre da

atividade do meristema resultante da dediferenciação das células parenquimáticas do calo. O desenvolvimento de raízes adventícias pode ser dividido em quatro estágios: dediferenciação de células diferenciadas específicas; formação de raízes iniciais a partir de certas células localizadas próximas aos tecidos vasculares; desenvolvimento de raízes iniciais em primórdios radiciais organizados e crescimento e emergência dos primórdios (HARTMANN et al., 2002).

Segundo Kersten, Lucchesi e Gutierrez (1993), as respostas à aplicação do IBA são bastante variáveis, principalmente com relação à concentração, ao tempo e à profundidade de imersão, ao tipo de estaca, época de realização, de cultivares e de formulações. Porém, com relação às concentrações de auxina, as estacas geralmente respondem de maneira típica, mostrando um aumento progressivo de enraizamento e qualidade das raízes com a elevação das concentrações de auxina até um ponto máximo. A partir desse ponto ocorre um decréscimo na resposta, devido a problemas de toxicidade. Em concentrações insuficientes pode haver a pouca formação de raízes e os calos formados podem não dediferenciar para a formação de raízes. Já em concentrações supraótimas podem ocorrer o amarelecimento e queda prematura das folhas das estacas, necrose da base ou necrose total das estacas (MESÉN, 1997).

Existem muitos métodos para aplicar quantidades suficientes de reguladores vegetais em estacas caulinares. Segundo Weaver (1982), no método de imersão rápida, a estaca permanece por, aproximadamente, 5 segundos, em solução alcoólica de auxina concentrada (500 a 10.000 mg L⁻¹). Segundo Ferreira et al. (2009), o tratamento das estacas com AIB a 8.000 mg L⁻¹, na forma de solução concentrada, no verão, foi o mais efetivo em promover o enraizamento das estacas (14%) de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax, conhecida vulgarmente como leiteiro ou pau-de-leite.

Assim, a ação das auxinas varia de espécie para espécie. Vários autores, trabalhando com diversas espécies, relataram o efeito positivo de tratamentos utilizando auxinas (GRAÇA et al., 1988; MONTALBETTI; HORMAZABAL, 1992; ONO et al., 1994; POGGIANI; SUITER FILHO, 1974). Alcântara, Abramides e Alcântara (1983), trabalhando com várias espécies de forrageiras, constataram que o ácido indol butírico, em baixas concentrações, incrementou a porcentagem de enraizamento das estacas.

As substâncias promotoras da formação de raízes estimulam de um modo mais eficaz as estacas de espécies de difícil enraizamento, ou seja, aquelas que apresentam maior quantidade de cofatores favoráveis e menor quantidade de substâncias inibidoras. Há espécies cujas estacas não enraízam bem em condições naturais, mas, quando tratadas com IAA ou seus análogos sintéticos, emitem raízes com facilidade. Estacas de determinadas espécies de difícil enraizamento necessitam ser mergulhadas em água para retirar os inibidores químicos, para depois serem tratadas pelas substâncias indutoras de enraizamento (ALVARENGA; CARVALHO, 1983).

Janick (1966) também observou que algumas espécies podem ter seu enraizamento dificultado, não por apresentarem baixos níveis de auxina endógena, mas por apresentarem inibidores de enraizamento que atuam em antagonismo às auxinas, retardando os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas. Trabalhos com estacas de videira de difícil enraizamento mostraram que a lavagem em água remove esses inibidores.

Além da concentração endógena de auxina, outros fatores influenciam o enraizamento de estacas/brotações caulinares. A oxidação de compostos fenólicos, fenômeno responsável pela liberação de exsudatos tóxicos ao tecido da estaca, tem sido apontada como fator que reduz a capacidade de enraizamento. O controle das reações de oxidação desses compostos pode vir a favorecer a formação de raízes (FACHINELLO et al., 1994).

Com relação à idade das plantas matrizes, em geral, estacas/brotações caulinares provenientes de material vegetativo juvenil enraízam com maior facilidade; quanto mais juvenis, mais rápida é a formação das raízes, melhor é a qualidade do sistema radicial formado e menor é a probabilidade de barreiras anatômicas que podem interferir negativamente para a formação de raízes adventícias (HARTMANN et al., 2002).

Outra questão fundamental é a influência dos fatores externos no enraizamento de estacas/brotações caulinares, a água, a temperatura e o substrato são os que merecem uma atenção especial. A necessidade da água para o enraizamento se fundamenta no fato de que, recém-colocadas no substrato, ainda não possuem raízes e, portanto, não têm como absorver água suficiente para compensar a transpiração e o crescimento de novas brotações.

A nebulização artificial, além de conservar a umidade elevada, reduz a temperatura da folha, mantendo uma película sob a mesma, permitindo a realização do estaqueamento em ambientes de maior luminosidade (COSTA JÚNIOR, 2000). A temperatura é outro importante fator que influencia o enraizamento das estacas/brotações, por condicionar diretamente o metabolismo das células das folhas e da base das estacas/brotações.

O ambiente em torno das estacas/brotações caulinares deve ser muito úmido, de 80% a 90%, e com temperatura amena, o que se consegue mediante uso de nebulização intermitente. A elevada umidade que se obtém, em câmara de nebulização, mantém vivas as estacas até que se enraízem, já que faz baixar a temperatura e a transpiração da folha, em razão de uma película de água que se forma em torno da mesma (RALLO; DEL-RIO, 1990). A taxa de transpiração pode ser controlada por meio da redução da área foliar das estacas, retirando-se as folhas basais e ou cortando-se as remanescentes pela metade.

O substrato é um outro fator que afeta o enraizamento e desempenha papel importante, especialmente em espécies de difícil enraizamento. De acordo

com Couvillon (1998), um substrato ideal é aquele que retém um teor de água suficiente para evitar a dessecação da base da estaca e, uma vez saturado, tem espaço poroso adequado para facilitar o enraizamento e evitar o desenvolvimento de doenças. O substrato tem papel fundamental no desenvolvimento das raízes das estacas, devendo apresentar baixa densidade, boa capacidade de absorção e retenção de água, boa aeração e drenagem, para evitar o acúmulo de umidade, além de estar isento de pragas, doenças e substâncias tóxicas (KÄMPF, 2000; WEDLING; GATTO; PAIVA, 2002), bem como disponibilidade e viabilidade econômica. Segundo Oliveira (2000), uma excelente alternativa é o uso de areia ou vermiculita.

Estudos antigos mostram resultados positivos em relação ao enraizamento de estacas de seringueira (BAPTIST, 1939; MENDES, 1959). No entanto, em estudos mais recentes não tem sido obtido sucesso em relação ao enraizamento de brotações caulinares. Esses autores recomendam a avaliação de pesquisas que investiguem as características anatômicas e bioquímicas da própria espécie, como a presença de inibidores químicos e barreira anatômica, que podem estar impedindo o desenvolvimento de raízes e, conseqüentemente, a produção de mudas por esse método de propagação.

Em algumas espécies de difícil enraizamento, como a seringueira, tem sido mencionado que barreiras anatômicas específicas, como a presença de fibras e esclerêdeos no floema primário do caule, formando um anel contínuo nesta região, podem bloquear mecanicamente os primórdios de raiz (BEAKBANE, 1961; MEDRADO; APPEZZATO-DA-GLÓRIA; COSTA, 1995). Em caules mais velhos, a presença de uma bainha de esclerênquima perivascular pode constituir um obstáculo no desenvolvimento das raízes (LOVELL; WHITE, 1986). A literatura sugere que a quebra da barreira de esclerênquima, se não é o principal fator para o enraizamento, deve facilitar o

desenvolvimento de primórdios (MEDRADO; APPEZZATO-DA-GLÓRIA; COSTA, 1995).

Medrado, Appezzato-da-Glória e Costa (1995) verificaram, em seu trabalho, a presença de uma bainha contínua de fibras perivasculares na base da estaca do clone de seringueira RRIM 600, o que poderia dificultar a passagem de primórdios radiculares. Esta barreira, apesar de não ser o único fator de impedimento ao enraizamento (GOODIN, 1965; HARTMANN et al., 2002; SACHS; LORETI; BIE, 1964), pode se somar às barreiras químicas que porventura estejam interferindo na capacidade de enraizamento da seringueira. No entanto, não se sabe quando se inicia a formação dessa barreira nessa espécie e se realmente esse impedimento é o único fator que pode estar impedindo a formação de raízes adventícias em brotações de seringueira.

A presença do látex nas brotações pode ser um impedimento químico à iniciação radicular, visto que o látex é constituído por uma complexa mistura de diferentes componentes. Um dos componentes majoritários do látex é o *cis* e o *trans* poli-isopreno. Outros constituintes presentes no látex e relatados em estudos fitoquímicos são polissacarídeos, flavanoides, lipídeos, fosfolipídios e proteínas, ficando comprovada também a existência de alcanos, cetonas triterpênicas, triterpenoides, açúcares e ácidos graxos (UZABAKILIH; LARGEAU; CASADEVALL, 1987).

O látex de *Hevea brasiliensis* é um sistema polidisperso no qual partículas negativamente carregadas de vários tipos estão suspensas em um soro. Três tipos de partículas predominam: partículas de borracha, que constituem de 30% a 45% (em massa) do látex; os lutoídeos, que constituem de 10% a 20% e os chamados complexos de Frey-Wyssling (FW) (RIPPEL, 2005). O soro no qual as partículas estão dispersas é chamado de soro C.

As partículas de borracha natural contêm centenas de moléculas de hidrocarboneto e são envolvidas por um filme de proteínas e fosfolipídios, que

lhes confere carga negativa, promovendo estabilidade coloidal das partículas. Aproximadamente 27% do conteúdo total de proteínas no látex recém-coletado estão adsorvidos na superfície das partículas de borracha e acredita-se que parte das proteínas esteja no interior das partículas (RIPPEL, 2005).

Os lutoídes formam o segundo componente principal do látex de *Hevea brasiliensis*. Eles são constituídos de proteínas (solúveis e insolúveis), fosfolípidios e sais minerais (AUZAC; JACOB; CHRESTIN, 1989), ligados ou circundados por membranas. O conteúdo dos lutoídes é chamado soro B e contém vários cátions, principalmente cálcio, magnésio, potássio e cobre e proteínas catiônicas (RIPPEL, 2005). Os complexos de Frey-Wyssling são constituídos de carotenoides e lípidios, conferindo à borracha sua coloração mais ou menos amarela (SETHURAJ; MATHEW, 1992).

O soro do látex natural contém diferentes espécies químicas, como carboidratos, eletrólitos e proteínas, e bases nitrogenadas, como colina, além de aminoácidos, ânions inorgânicos (fosfatos e carbonatos), sais minerais encontrados no soro B e mais outros de rubídio, manganês, sódio, potássio, cobre, magnésio, ferro e zinco (AGOSTINI, 2009). O principal carboidrato encontrado é o quebrachitol (ou 1-metil inositol) e, até o momento, não se sabe qual a sua função biológica no látex. A principal implicação dos carboidratos no látex é que estes são oxidados microbiologicamente a ácidos voláteis (fórmico, acético e propiônico) (AGOSTINI, 2009; BLACKLEY, 1997).

REFERÊNCIAS

AGOSTINI, D. L. S. **Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese**. 2009. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2009.

ALCÂNTARA, V. B. G.; ABRAMIDES, P. L. G.; ALCÂNTARA, P. B. Aplicação de auxinas e estimulantes no enraizamento de estacas de leucena, jureminha, guandu e amoreira. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 40, n. 2, p. 279-285, 1983.

ALVARENGA, L. R.; CARVALHO, V. D. Uso de substâncias promotoras de enraizamento de frutíferas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 9, n. 101, p. 47-55, 1983.

AUZAC, J.; JACOB, J. L.; CHRESTIN, H. **Physiology of rubber tree latex**. Boca Raton: CRC, 1989. 60 p.

BAPTIST, E. D. C. Plant hormones. **Journal of the Rubber Research Institute of Malasia**, Kuala Lumpur, v. 9, p. 17-39, 1939.

BEAKBANE, A. B. Structure of the plant stem in relation to adventitious rooting. **Nature**, London, v. 192, p. 954-955, 1961.

BENINCASA, M. M. P.; LEITE, I. C. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2004. 168 p.

BERNARDES, M. S.; VEIGA, A. S.; FONSECA FILHO, I. I. Mercado brasileiro de borracha natural. In: BERNARDES, M. S. (Ed.). **Sangria da seringueira**. Piracicaba: ESALQ, 2000. p. 365-388.

BLACKLEY, D. C. **Polymers latices**. Glasgow: Chapman & Hall, 1997. v. 2, 655 p.

BONOME, L. T. S. et al. Influência do tratamento fungicida e da temperatura sobre a qualidade fisiológica de sementes de seringueira durante o armazenamento. **Agrarian**, Dourados, v. 2, n. 5, p. 97-112, 2009.

BOYER, C. D. Synthesis and breakdown of starch. In: NEYRA, C. A. (Ed.). **The biochemical basis of plant breeding**. Boca Ration: CRC, 1985. p. 133-153.

CAIRO, P. A. R. **Variação sazonal da atividade da rubisco e das enzimas de síntese e hidrólise da sacarose em plantas de seringueira [Hevea brasiliensis (Willd ex. ADR. DE JUSS.) MÜELL.-ARG], em Lavras, MG**. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

CAIRO, P. A. R. et al. Atividade da rubisco e das enzimas de síntese e hidrólise de sacarose, associada à produtividade de látex, em clones de seringueira [Hevea brasiliensis (Willd ex. ADR. DE JUSS.) MÜELL.-ARG] cultivados em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 369-376, mar./abr. 2009.

CAMARGO, A. P.; MARIN, F. R.; CAMARGO, M. B. P. **Zoneamento climático da Heveicultura no Brasil**. Campinas: EMBRAPA Monitoramento por Satélite, 2003. 19 p. (Documentos, 24).

CARDINI, C. E.; LELOIR, L. F.; CHIRIBOGA, J. The biosynthesis of sucrose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 214, p. 149-155, 1955.

CAVALCANTE, J. R.; CONFORTO, E. C. Fotossíntese e relações hídricas de duas cultivares jovens de seringueira. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 701-708, out./dez. 2006.

CHIN, H. F. et al. The effect of moisture and temperature on the ultrastructure and viability of seeds of *Hevea brasiliensis*. **Seed Science and Tecnology**, Zurich, v. 9, n. 2, p. 411-422, 1981.

COCK, J. et al. **Sistema rápido de propagación de yuca**. Cali: CIAT, 1976. 13 p.

COSTA, L. C. et al. Mudanças climáticas e seus impactos na cultura da seringueira em Minas Gerais. In: ALVARENGA, A. de P.; CARMO, C. A. F. S. do (Org.). **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008. p. 53-81.

COSTA JÚNIOR, W. H. **Enraizamento de estacas de goiabeiras**: influência de fatores disiológicos e mesológicos. 2000. 66 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2000.

COUVILLON, G. A. Rooting responses to different treatments. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 227, n. 1, p. 187-196, 1998.

DAMON, S. et al. Sink metabolism in tomato fruit: II., phloem unloading and sugar uptake. **Plant Physiology**, Washington, v. 87, n. 1, p. 731-736, Jan. 1988.

FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPel, 1994. 179 p.

FERREIRA, B. G. A. et al. Metodologias de aplicação de AIB no enraizamento de estacas semilenhosas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 2, p. 196-201, 2009.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.

GAHRTZ, M.; STOLZ, J.; SAUER, N. A phloem specific sucrose-H⁺ symporter from *Plantago major* L. supports the model of apoplastic phloem loading. **Plant Journal**, Michigan, v. 6, n. 5, p. 697-706, Nov. 1994.

GAMEIRO, A. H.; GAMEIRO, M. B. P. Perspectivas para o mercado internacional de borracha natural. In: ALVARENGA, A. de P.; CARMO, C. A. F. S. do (Org.). **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008. p. 855-878.

GEIGENBERGER, P.; STITT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, Berlin, v. 189, n. 3, p. 329-339, Aug. 1993.

GEROMEL, C. L. P. et al. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 12, p. 3243-3258, Aug. 2006.

GOMES, A. L. **Propagação clonal**: princípios e particularidades. Vila Real: Universidade de Trás-dos-Montes e Alto Douro, 1986. 67 p. (Série Didática. Ciências Aplicadas, 1).

GOODIN, J. R. Anatomical changes associated with juvenile-to-mature growth phase transition in *Hedera*. **Nature**, London, v. 208, n. 5009, p. 504-505, 1965.

GRAÇA, M. E. C. et al. **Estaquia de erva-mate**. Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1988. 24 p. (Circular Técnica, 18).

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation**: principles and practices. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880 p.

HAWKER, J. S. Sucrose. In: DEY, P. M.; DIXEN, R. A. (Ed.). **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. London: Academic, 1985. p. 1-48.

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

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Production and consumption of natural rubber**: rubber industry report: statistics. Disponível em: <<http://www.rubberstudy.com/statistics-quarstat.aspx>>. Acesso em: 10 nov. 2009.

JACOVINE, L. A. G. et al. A seringueira no contexto das negociações sobre mudanças climáticas globais. In: ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Ed.). **Seqüestro de carbono**: quantificação em seringais de cultivo e na vegetação natural. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 1-41.

JANICK, J. **A ciência de horticultura**. Rio de Janeiro: USAID, 1966. 485 p.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 254 p.

KERSTEN, E.; LUCCHESI, A. A.; GUTIERREZ, L. E. Efeitos do boro e zinco no teor de carboidratos solúveis, aminoácidos totais e no enraizamento de estacas de ramos de ameixeira (*Prunus salicina* Lindl.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 1, p. 13-18, fev./maio 1993.

KRUGER, N. J. Carbohydrate synthesis and degradation. In: DENNIS, D. T.; TURPIN, D. H. **Plant physiology, biochemistry and molecular biology**. London: Longman Scientific & Technological, 1993. p. 59-76.

KÜHN, C. et al. Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 1115-1123, Oct. 1996.

LOVELL, J.; WHITE, P. H. Anatomical changes during adventitious root formation. In: JACKSON, M. B. **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht: M. Nijhoff, 1986. p. 111-140.

MATSUKURA, C. et al. Sugar uptake and transport in rice embryo: expression of companion cell-specific sucrose transporters (OsSUT1) induced by sugar and light. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 3, p. 85-94, Sept. 2000.

MEDRADO, M. J. S.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; COSTA, J. D. Alterações anatômicas em estacas de seringueira (*Hevea brasiliensis* clone RRIM 600) em resposta a diferentes técnicas de indução ao enraizamento. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 89-95, 1995.

MENDES, L. O. T. Sobre o enraizamento de estacas de seringueira. **Bragantia**, Campinas, v. 18, p. 47-49, 1959.

MESÉM, F. **Enraizamiento de estacas juveniles de espécies forestales**: uso de propagadores de sub-irrigación. Turrialba: CATIE, 1997. 34 p.

MESQUITA, A. C. et al. Anatomical characteristics and enzymes of the sucrose metabolism and their relationship with latex yield in the rubber tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 18, n. 2, p. 1-8, Apr./June 2006a.

_____. Comportamento produtivo de clones de seringueira [*Hevea brasiliensis* (WILD. EX. ADR. DE JUSS) MUELL ARG.] em Lavras, MG. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 4, p. 633-639, 2006b.

MIGUEL, A. A. et al. Photosynthetic behaviour during the leaf ontogeny of rubber tree clones [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex. ADR. de Juss.) Muell. Arg.], in Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 91-97, jan./fev. 2007.

MONTALBETTI, R. T.; HORMAZABAL, M. K. Efecto sinérgico del boro en el enraizamiento de acodos en *Pinus caribaea* VAR. *hondurensis*. **Acta Científica Venezolana**, Caracas, v. 43, n. 1, p. 45-51, 1992.

MORAES, V. H. F. et al. Teores de sacarose no látex de seringueiras nativas estimuladas com Ethrel. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 27-34, mar. 1978.

NGUYEN-QUOC, B.; FOYER, C. H. A role for futile cycles involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 358, p. 881-889, Nov. 2001.

NISHI, M. et al. Influência dos créditos de carbono na viabilidade financeira de três projetos florestais. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 2, p. 263-270, abr./jun. 2005.

OLIVEIRA, D. P.; OLIVEIRA, L. E. M.; DELU FILHO, N. Optimization of invertase assay conditions in rubber tree plants (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 5, p. 687-692, set./out. 2006.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito dos substratos artificiais no enraizamento e no desenvolvimento de maracujazeiro-azedo e doce por estaquia**. 2000. 71 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2000.

ONO, E. O. et al. Enraizamento de estacas de *Platanus acerifolia*, tratadas com auxinas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 9, p. 1373-1380, set. 1994.

PEDRAS, J. F.; SILVA, C. P. Produção de raízes em estacas de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), nas diferentes épocas do ano, em função dos tratamentos com auxinas sintéticas e ácido bórico. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 48., 1997, Crato. **Resumos...** Crato: SBB, 1997. p. 378.

PFEIFFER, I.; KUTSCHERA, U. Sucrose metabolism and cell elongation in developing sunflower hypocotyls. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 287, n. 6, p. 631-638, Feb. 1995.

POGGIANI, F.; SUITER FILHO, W. Importância da nebulização intermitente e efeito do tratamento hormonal na formação de raízes em estacas de eucalipto. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, n. 9, p. 119-129, 1974.

PUJADE-RENAUD, V. et al. Ethylene-induced increase in glutamine synthetase activity and mRNA levels in *Hevea brasiliensis* latex cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, n. 1, p. 127-132, 1994.

RALLO, L.; DEL-RIO, C. Effect of a CO₂ enriched environment on the rooting ability and carbohydrate level of olive cuttings. **Advances in Horticultural Science**, New York, v. 4, n. 2, p. 129-130, June 1990.

RIESMEIER, J. W.; WILLMITZER, L.; FROMMER, W. B. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. **EMBO Journal**, Heidelberg, v. 13, n. 1, p. 1-7, Jan. 1994.

_____. Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. **EMBO Journal**, Heidelberg, v. 11, n. 13, p. 4705-4713, Dec. 1992.

RIPPEL, M. M. **Caracterização microestrutural de filmes e partículas de látex de borracha natural**. 2005. 319 p. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

ROBINSON, N. L.; HEWITT, J. D.; BENNETT, A. B. Sink metabolism in tomato fruit: I., developmental changes in carbohydrate metabolizing enzymes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 87, n. 1, p. 727-730, Jan. 1988.

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, n. 9, p. 815-825, Aug. 2000.

ROITSCH, T.; GONZALEZ, M. C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 12, p. 606-613, Dec. 2004.

SACHS, R. M.; LORETI, F.; BIE, J. Plant rooting studies indicate sclerenchyma tissue is not restricting factor. **California Agriculture**, Oakland, v. 18, n. 9, p. 4-5, 1964.

SAUER, N.; STOLZ, J. SUC1 and SUC2: two sucrose transporters from *Arabidopsis thaliana*, expression and characterization in baker's yeast and identification of the histidine tagged protein. **Plant Journal**, Michigan, v. 6, n. 1, p. 67-77, July 1994.

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

SETHURAJ, M. R.; MATHEW, N. M. **Natural rubber: biology, cultivation and thechnology**. Netherlands: Elsevier Science, 1992. 610 p.

STURM, A. Invertases: primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partioning. **Physiology**, Washington, v. 121, n. 1, p. 1-7, June 1999.

TANGPAKDEE, J. et al. Rubber formation by fresh bottom fraction of *Hevea* latex. **Phytochemistry**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 275-281, May 1997.

TUPY, J. Some aspects of sucrose transport and utilization in latex producing bark of *Hevea brasiliensis* Muell.Arg. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 27, n. 1, p. 51-64, Aug. 1985.

TYMOWSKA-LALANNE, Z.; KREIS, M. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. **Advances in Botanical Research**, London, v. 28, p. 71-117, 1998.

UZABAKILIHU, B.; LARGEAU, C.; CASADEVALL, E. Latex constituents of *Euphorbia candelabrum*, *E. grantii*, *E. tirucalli* and *Synadenium grantii*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 26, n. 11, p. 3041-3045, Nov. 1987.

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

WALDLAW, I. F. The control of carbon partitioning in plants. **The New Phytologist**, Oak Ridge, v. 166, n. 27, p. 341-381, July 1990.

WEAVER, R. J. **Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura**. Barcelona: Trillas, 1982. 540 p.

WEDLING, I.; GATTO, A.; PAIVA, H. N. **Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2002. 166 p.

WELHAM, T. et al. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 12, p. 3353-3365, Dec. 2009.

WILLIAMS, L. E.; LEMOINE, R.; SAUER, N. Sugar transporters in higher plants: a diversity of roles and complex regulation. **Trends in Plant Science**, London, v. 5, n. 7, p. 283-290, July 2000.

ZANETTE, F. **Propagação da pereira *Pirus comunis* Var. Garber por estaquia lenhosa**. 1995. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia e Fitossanitarismo) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

ZRENNER, R. et al. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). **The Plant Journal**, Michigan, v. 7, n. 1, p. 97-107, Jan. 1995.

CAPÍTULO 2

**ENZIMAS ENVOLVIDAS NA HIDRÓLISE DE SACAROSE EM CASCA
E FOLHA DE SERINGUEIRA [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex. Adr. de Juss.)
Muell. Arg.]**

RESUMO

As rotas relacionadas com a hidrólise da sacarose são consideradas ponto de partida para a biossíntese do látex e as principais enzimas que atuam nesse processo são a sacarose sintase (SuSy) e as diferentes isoformas das invertases. No entanto, não se sabe a contribuição relativa de cada uma dessas enzimas na disponibilização de hexoses para o metabolismo. Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar as condições apropriadas, pelos ensaios *in vitro* e *in vivo*, das atividades das enzimas envolvidas na hidrólise de sacarose (invertases e suas isoformas e sacarose sintase) em folha e em casca. O material vegetal utilizado para avaliação da atividade das enzimas invertases (e suas isoformas) e sacarose sintase (SuSy) foi coletado em 5 plantas adultas de seringueira do clone RRIM 600, com 22 anos. Os resultados permitiram concluir que, em tecidos de folha e casca de seringueira, a hidrólise da sacarose foi exercida, predominantemente, pelas invertases ácidas. Para os ensaios enzimáticos no tecido de folha, as condições apropriadas foram: ensaio *in vivo*: pH 3,5 para invertase ácida e 7,5 invertase neutra, à concentração de sacarose 200 mM e temperatura de 37°C; ensaio *in vitro*: pH 3,5 para invertase ácida e 6,0 invertase neutra, à concentração de sacarose 200 mM e temperatura de 37°C. Para os ensaios enzimáticos no tecido de casca, as condições apropriadas foram: ensaio *in vivo*: pH 3,5 para invertase ácida e 6,5 invertase neutra, à concentração de sacarose 200 mM; ensaio *in vitro*: pH 4,0 para invertase ácida e 6,5 invertase neutra, à concentração de sacarose 200 mM e temperatura de 37°C. Ocorreu hidrólise não enzimática da sacarose na faixa de pH 2,0-3,5.

Palavras chave: *Hevea brasiliensis*. Atividade enzimática. Isoformas de invertases. Sacarose sintase.

ABSTRACT

The pathways related to the sucrose hydrolysis are considered the starting point for the biosynthesis of latex and the key enzymes involved in this process are the sucrose synthase (SuSy) and different isoforms of invertases, however, the relative contribution of each of these enzymes to produce hexoses for the metabolism is not known. Thus, this study aimed to characterize the appropriate conditions for *in vitro* and *in vivo* tests on the activities of the enzymes involved in the hydrolysis of sucrose (invertases and their isoforms and sucrose synthase) in the leaf and bark. The plant material used for evaluating the activity of the invertase enzymes (and its isoforms) and sucrose synthase (SuSy) was collected from 5 adult plants of rubber trees from clone RRIM 600 at 22 years of age. The results showed that in the leaf and bark tissues from rubber trees, the hydrolysis of sucrose was carried out predominantly by the acidic invertases. The appropriate conditions for the enzymatic assays in leaf tissues were: *in vivo* assay: pH 3.5 for the acidic invertase and 7.5 for the neutral invertase, 200 mM sucrose concentration and temperature of 37 °C; *in vitro* assay: pH 3.5 for the acidic invertase and 6.0 for the neutral invertase, 200 mM sucrose concentration and a temperature of 37 °C. The appropriate conditions for the enzymatic assays in the bark tissue were: *in vivo* assay: pH 3.5 for the acidic invertase and 6.5 for the neutral invertase, 200 mM sucrose concentration; *in vitro* assay: pH 4.0 for the acidic invertase and 6.5 for the neutral invertase, 200 mM sucrose concentration and a temperature of 37 °C. Non-enzymatic hydrolysis of sucrose occurred in the range of pH 2.0-3.5.

Keywords: *Hevea brasiliensis*. Enzyme Activity. invertase isoforms. Sucrose synthase.

1 INTRODUÇÃO

A borracha natural (cis-polisopreno) é um produto de grande importância econômica, extraído da seringueira, e utilizado em diversas áreas da indústria. A síntese do cis-polisopreno ocorre no citoplasma de células altamente especializadas, conhecidas como laticíferas, as quais têm alta demanda metabólica de energia. A sacarose é um dos precursores para a síntese de borracha, podendo ser um fator limitante na produção de látex (DUSOTOIT-COUCAUD et al., 2009).

Os estudos de processos metabólicos envolvidos na produção de látex são complexos, pois envolvem várias reações, sendo estas reguladas pela ação de algumas enzimas. Estudos realizados por Mesquita et al. (2006a) sugerem que a produtividade de alguns clones de seringueira pode ter relação com características fisiológicas e bioquímicas do sistema fonte-dreno, as quais podem estar associadas tanto aos processos de assimilação e transporte de carbono como à utilização de assimilados na biossíntese de borracha natural.

Miguel et al. (2007) relataram que os elevados valores de fotossíntese líquida em seringais cultivados em Lavras, MG, do clone RRIM 600, podem explicar as altas produções de borracha natural, conforme atestam os trabalhos sobre desempenho produtivo realizados por Lima et al. (2002), Mesquita et al. (2006b) e Oliveira (1999). Além disso, Cairo et al. (2009) sugerem uma possível associação entre a atividade da rubisco e das invertases em folhas e casca de seringueira, respectivamente, com o desempenho produtivo de plantas adultas e em franca produção.

Nas células laticíferas do caule, nas quais ocorre o descarregamento do floema, a hidrólise enzimática da sacarose é considerada o ponto de partida para a biossíntese do látex que ocorre por intermédio da ação catalisadora das enzimas invertase (e suas isoformas) e sacarose sintase (SuSy), produzindo hexoses para atender à demanda metabólica. A partição desses assimilados é

complexa, devido à competição entre o dreno artificial, imposto pela sangria e os drenos naturais da planta.

No catabolismo da sacarose, as invertases hidrolisam a sacarose em glicose e frutose, e a SuSy converte sacarose e UDP em frutose e UDP-glicose, sendo as enzimas responsáveis pela clivagem da sacarose em plantas. As invertases e SuSy apresentam papel chave na disponibilização de hexoses, no desenvolvimento, no crescimento e no particionamento de carbono (KOCH, 2004; STURM; TANG, 1999).

As plantas têm um grupo de invertases que são definidas como ácidas e neutras, baseadas no pH ótimo de reação (ROITSCH; GONZALEZ, 2004; STURM, 1999; TYMOWSKA-LALANNE; KREIS, 1998). As invertases ácidas estão localizadas no vacúolo (invertases ácidas solúveis) ou associadas à parede celular (invertases ácidas apoplástica), enquanto as neutras (invertase neutra solúvel) estão localizadas no citosol (STURM, 1999; TYMOWSKA-LALANNE; KREIS, 1998).

A enzima SuSy catalisa também uma reação livremente reversível para a síntese de sacarose (GEIGENBERGER; STITT, 1993), embora a sua principal função fisiológica seja à clivagem da sacarose nos órgãos drenos (HAWKER, 1985), sendo bastante facilitada pela elevada concentração de sacarose no floema nas regiões de descarregamento (KRUGER, 1990).

Vários relatos têm indicado que a biossíntese de borracha é fortemente regulada pela disponibilidade de sacarose, sendo considerada fator limitante nas regiões dreno (CHOW et al., 2007; MORAES et al., 1978; TANGPAKDEE et al., 1997). Estes mesmos autores sugerem que o fluxo de sacarose nas células lactíferas é regulado pela sua hidrólise, assim envolvendo as enzimas responsáveis pela sua síntese e degradação.

Cairo et al. (2009), avaliando a atividade das invertases e SuSy em diferentes métodos de ensaio *in vivo* e *in vitro*, observaram que, no método *in*

vivo, a atividade das enzimas foi até oito vezes superior ao observado no método *in vitro*. Os autores verificaram, ainda, que a hidrólise de sacarose na casca foi exercida predominantemente pela ação da invertase ácida total e, em proporções menores, essa atividade foi complementada pela SuSy e pela invertase neutra, que tiveram atividades equivalentes. No entanto, não foi possível concluir a real contribuição de cada isoforma da invertase e da SuSy no processo de hidrólise de sacarose.

Diante do exposto, formulou-se, aqui, a hipótese de que as enzimas sacarose sintase (SuSy) e as diferentes isoformas da invertase atuam na hidrólise de sacarose. No entanto, não se sabe qual é a contribuição relativa de cada uma dessas enzimas na disponibilização de hexoses para o metabolismo em casca e em folhas de seringueira.

No intuito de testar a viabilidade destas hipóteses, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar as condições apropriadas das enzimas envolvidas na hidrólise de sacarose (invertases e suas isoformas e sacarose sintase) em folha e casca no clone RRIM 600 de seringueira, pelos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado para a avaliação da atividade das enzimas invertases (e suas isoformas) e sacarose sintase (SuSy) foi coletado em cinco plantas adultas de seringueira do clone RRIM 600, com 22 anos de idade e cultivadas no espaçamento de 7x3m.

A área experimental é localizada no Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Este município está situado nas coordenadas 21°15' de latitude Sul e 45°00' de longitude Oeste de Greenwich, à altitude média de 918 m. O clima da região é do tipo CWA, segundo a classificação climática de Köppen, com médias anuais, para precipitação e temperatura, de 1.530 mm e 19,4°C, respectivamente (BRASIL, 1992).

O material vegetal utilizado foi constituído de amostras (discos) de folhas e cascas, coletadas entre 9 e 10 horas. As folhas coletadas encontravam-se completamente expandidas – “estádio D”, conforme descrição de Hallé, Oldeman e Tomlinson (1978) – e posicionadas na copa em exposição direta à radiação, no sentido nascente do sol e as cascas foram coletadas na altura do corte de sangria ($\pm 1,5$ m).

Os discos de folhas e de casca, logo depois de removidos das plantas, foram cortados em pequenos fragmentos, com tamanho médio aproximado de 2 mm e pesados, constituindo amostras de 0,2 g e 3 g, envoltos em papel alumínio. Posteriormente, adicionou-se nitrogênio líquido, para a interrupção das atividades metabólicas e preservação das condições fisiológicas dos tecidos no momento da coleta. Em seguida, o material vegetal foi conservado sob temperatura de -86°C, até que fosse utilizado para os ensaios enzimáticos.

2.1 Ensaio *in vivo*

Amostras de 0,2 g de casca e folha foram adicionadas a meios de reação (2 mL), constituídos de reagentes para a realização do ensaio específico de cada enzima a ser avaliada. Foram determinadas as condições apropriadas de ensaio das invertases e da SuSy, tais como pH do meio de reação (2,0-8,0), à concentração de sacarose (0-300 mM) e temperatura do meio de incubação (17-57°C).

Para determinar o efeito do pH sobre a atividade das invertases, utilizou-se tampão específico nos diferentes pH, tampão glicina-HCl (pH 2,0; 2,5; 3,0), tampão acetato de sódio (pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0) e tampão fosfato de sódio (pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0). O meio de reação (2mL) para as invertases foi constituído de: tampão 0,1M específico do pH; MgCl₂ 5mM e sacarose 200mM e 0,2 g de amostra de casca ou de folha. A temperatura de incubação foi de 37°C e alíquotas de 100µl e 50 µl para casca e folhas, respectivamente, foram coletadas, ao final de 10 e 70 minutos, para a quantificação da atividade enzimática.

Para determinar o efeito do pH sobre a atividade da sacarose sintase, utilizou-se tampão específico nos diferentes pHs, tampão glicina-HCl (pH 2,0; 2,5; 3,0), tampão acetato de sódio (pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5) e tampão HEPES (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0).

O meio de reação (2ml) para sacarose sintase foi constituído de tampão 0,1M, específico do pH; MgCl₂ 5mM, sacarose 200mM, UDP 5 mM e 0,2 g de amostra de casca ou de folha. A temperatura de incubação foi de 25°C e alíquotas de 100µl e 50 µl para casca e folhas, respectivamente, foram coletadas ao final de 10 e 70 minutos, para a quantificação 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 μmol de açúcares redutores (AR) produzidos, por grama de matéria fresca, por hora.

2.2 Ensaio *in vitro*

Amostras de 3 g de casca ou folha foram homogeneizadas com microtritador Tecnal modelo TE 102, em 10 mL de meio extrator constituído de tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,5), PMSF (1 mM), MgCl_2 (5 mM) e DTT (1 mM). Posteriormente, o conjunto foi centrifugado a 18.000 g e 4°C, durante 20 minutos (CAIRO et al., 2009). O sobrenadante, extrato proteico de casca ou folha, foi utilizado como fonte bruta das enzimas para avaliação de suas atividades. O restante do material (restos vegetais) foi utilizado para extrair a invertase ácida da parede.

Foram determinadas as condições apropriadas de ensaio das invertases e sacarose sintase, como pH do meio de reação (2,0-8,0), à concentração de sacarose (0-300 mM) e temperatura do meio de incubação (17°-57°C).

Para determinar o efeito do pH sobre a atividade das invertases, utilizaram-se tampão específico nos diferentes pHs, tampão glicina-HCl (pH 2,0; 2,5; 3,0), tampão acetato de sódio (pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0) e tampão fosfato de sódio (pH 6,5; 7,0; 7,5; 8,0).

O meio de reação (2ml) para as invertases foi constituído de tampão 0,1M, específico no pH; MgCl_2 5mM, sacarose 200mM e 200 μl de alíquota do extrato proteico de casca ou folha. A temperatura de incubação foi de 37°C e alíquotas de 100 μl foram coletadas ao final de 10 e 70 minutos, para a dosagem da atividade enzimática.

Para determinar o efeito do pH sobre a atividade da sacarose sintase, utilizaram-se tampão específico nos diferentes pHs, tampão glicina-HCl (pH 2,0;

2,5; 3,0), tampão acetato de sódio (pH 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5) e tampão HEPES (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0).

O meio de reação (2ml) para sacarose sintase foi constituído de tampão 0,1M, específico no pH, $MgCl_2$ 5mM e sacarose 200mM, UDP 5 mM e 200 μ l de alíquota do extrato proteico de casca ou folha. A temperatura de incubação foi de 25°C e alíquotas de 100 μ l foram coletadas ao final de 10 e 70 minutos, para a dosagem da atividade enzimática.

Para verificar o efeito do pH no meio de reação na hidrólise química, foi efetuado um ensaio, concomitantemente às análises dos materiais vegetais, com os mesmos constituintes do meio de reação. No entanto, não foram adicionadas alíquotas do extrato de casca e folha.

Para a extração da invertase ácida da parede, a metodologia foi realizada de acordo com Fahrendorf e Beck (1990) com algumas modificações. Foi utilizado o mesmo tampão de extração para as invertases, no entanto, foram adicionados NaCl 1M e Triton-X (1%). O material vegetal foi mantido por 12 horas no meio de extração à temperatura de 4°C e, posteriormente, centrifugou-se, a 18.000 g e 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio enzimático. O meio de reação (2ml) para essa invertase apoplástica foi constituído de tampão acetato de sódio 0,1M pH 3,5, $MgCl_2$ 5 mM, sacarose 200 mM e 100 μ l de alíquota do extrato proteico da invertase ácida apoplástica de casca ou folha. A temperatura de incubação foi de 37°C e alíquotas de 100 μ l foram coletadas ao final de 10 e 70 minutos para a quantificação 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

Nos extratos de folha e casca, foram determinados os teores de açúcares solúveis totais pelo método da antrona (YEMM; WILLIS, 1954) e açúcares redutores pelo método do dinitrosalicilato (DNS) (MILLER, 1959). As concentrações de sacarose foram determinadas pela diferença entre os teores de açúcares solúveis totais e açúcares redutores, multiplicada pelo fator 0,95, segundo Martim (2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividades, *in vivo* e *in vitro*, das enzimas invertases e SuSy, em função do pH do meio de reação em folha

Observa-se, no Gráfico 1, que, pelo ensaio *in vivo*, houve uma grande variação na atividade das enzimas invertases e SuSy em função do pH, sugerindo a atuação de diferentes isoformas de invertase. Nota-se um “ombro” de atividade em pH 3,5-4,0 e outro no pH 7,5. Nesse ensaio, a atividade máxima das enzimas invertases e SuSy ocorreu no pH ácido, com valores de atividade próximos a 780 $\mu\text{mol de AR.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e 500 $\mu\text{mol de AR.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Vale ressaltar que as barras do erro padrão não aparecem nos gráficos, visto que todas as análises realizadas neste capítulo foram oriundas de uma amostra composta, não apresentando variação entre elas nas avaliações, ou seja, apresentando um erro padrão muito pequeno.

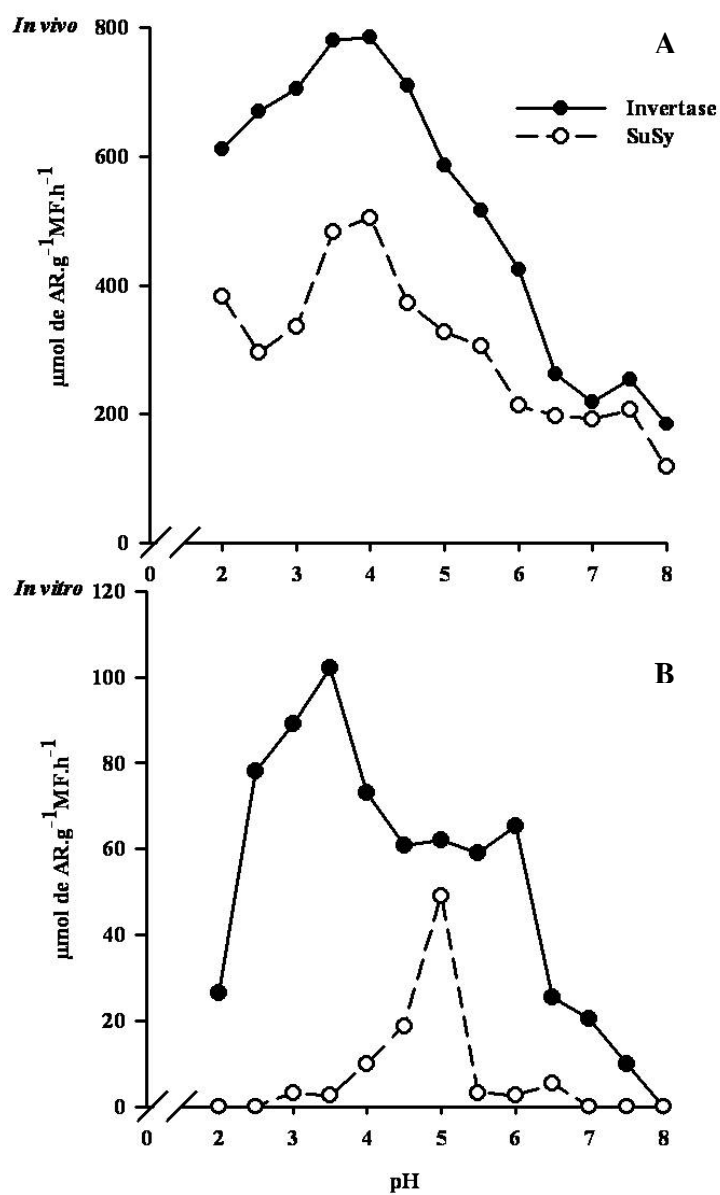


Gráfico 1 Atividade *in vivo* (A) e *in vitro* (B) das invertases e SuSy, em função do pH do meio de incubação em lâmina foliar completamente expandida de seringueira do clone RRIM. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições

Observa-se que, tanto no ensaio *in vivo* quanto pelo *in vitro*, a atividade da invertase e a da SuSy apresentaram valores maiores em pH ácidos. A alta atividade da invertase em pH ácido pode ser justificada pela presença de isoformas que atuam exclusivamente nesta faixa de pH. Por outro lado, a SuSy é conhecidamente uma enzima citosólica em que o pH atinge valores de 6,0 a 7,6 (KLOTZ; FINGER; SHELVER, 2003; KURKDJIAN; GUERN, 1989; TANASE; SHOHEI, 2000; ZENG et al., 1998). Dessa maneira, sugere-se que a atividade descrita como sendo da SuSy, em pH ácido, é, na realidade, a atividade da invertase ácida. Para o ensaio *in vivo* em pH neutro, as atividades da invertase neutra e da SuSy podem estar sendo avaliadas em conjunto, visto que a atividade das duas enzimas apresenta o mesmo comportamento.

As diferenças entre as metodologias para a determinação da atividade da invertase neutra e da Susy está no meio de reação da SuSy que tem UDP e tampão HEPES em uma temperatura inferior (25°C) à utilizada no ensaio da invertase (37°C). Essas diferenças, possivelmente, não impediram a ação das invertases. Elas apenas reduziram sua atividade devido à diminuição da temperatura para 25°C, utilizada no ensaio da SuSy. Entretanto, não deve ser desconsiderado que tampão HEPES e UDP também podem influenciar a atividade das invertases, aspecto que deve ser investigado. Assim, sugere-se que a metodologia utilizada para a avaliação da atividade da SuSy deva ser mais bem estudada.

Resultados semelhantes foram observados nos ensaios realizados para concentração de sacarose e temperatura (dados não mostrados). A atividade da SuSy apresentou equivalência com a atividade da invertase neutra, sugerindo que a metodologia de extração e quantificação das enzimas não foi eficiente, não permitindo a diferenciação na atividade das enzimas invertase neutra e SuSy.

Oliveira et al. (2006), trabalhando com o ensaio *in vitro*, encontraram atividade da invertase, em tecidos de folhas e casca de seringueira, numa ampla

faixa de pH (de 2,0 a 9,0), e atingiu o seu pico em pH próximo a 7,0, ao contrário do observado no presente trabalho, em que o pico de atividade da enzima invertase ocorreu no pH 3,5 e um outro no pH 6,0.

Lin e Sung (1993) observaram, em folhas de arroz, que a faixa de pH ótimo para as invertases ácidas era de 3,5-6,0. Segundo Sherson et al. (2003), a invertase ácida da parede atua entre pH 3,2 a 3,6 e a invertase ácida solúvel e neutra, nos pHs 4,5 e 7,3, respectivamente, em *arabidopsis*. De acordo com Hussain et al. (2009), as invertases ácidas solúveis da maioria dos vegetais atuam em uma faixa de pH 3,5 a 6,0.

A atividade enzimática foi superior quando se utilizou o ensaio *in vivo*, quando comparado ao ensaio *in vitro* (Gráfico 1). Resultado similar foi observado por Cairo et al. (2009) que obtiveram atividade enzimática no ensaio *in vivo* em casca de seringueira oito vezes superior à do ensaio *in vitro*.

Outros estudos realizados em diferentes espécies apresentaram valores muito baixos das invertases pelo ensaio *in vitro* (GEROMEL, 2001; OLIVEIRA, 1985; OLIVEIRA et al., 2006). A maior atividade enzimática observada pelo ensaio *in vivo* pode ter ocorrido em função da possibilidade de a sacarose ser hidrolisada pela invertase apoplástica, vacuolar e citosólica, já que as plantas apresentam diferentes tipos de transportadores de sacarose nos tecidos, apresentando um somatório das atividades dessas enzimas. Outra questão que deve ser levada em consideração e deve ser investigada é o fato de os transportadores de açúcares promoverem tanto a entrada de sacarose como também agilizar a saída de hexoses para o meio de reação. Já pelo ensaio *in vitro*, provavelmente, a contribuição na clivagem da sacarose é apenas das invertases solúveis (vacuolar e citosólica), visto que, por esse tipo de ensaio, apenas a fração solúvel esteja presente.

No presente experimento, tentou-se realizar a purificação das enzimas sacarolíticas em tecidos de casca e folhas de seringueira. No entanto, não foi

obtido sucesso, devido à presença de compostos químicos contidos nos tecidos vegetais que impediram o fluxo nas colunas. Com isso, sugere-se que sejam otimizadas as metodologias utilizadas para a extração dessas enzimas para a realização dos passos de purificação dessas enzimas.

Em relação à interferência do pH no meio de reação, foi observada uma alta concentração de açúcares redutores na faixa de pH 2,0-3,0, como mostrado no Gráfico 2, que pode ser atribuída a uma hidrólise não enzimática da sacarose, ou seja, ocorrência de uma hidrólise química em função do pH ácido, superestimando os dados nessa faixa de pH. Vale ressaltar que, nos valores de atividade enzimática apresentadas no Gráfico 1, na faixa de pH supracitada, já foram desconsiderados os valores oriundos da hidrólise não enzimática da sacarose. Deve ser ressaltado que não foi aplicado extrato enzimático para a realização dessa análise.

Estes resultados contrariam os resultados obtidos por Oliveira et al. (2006), os quais não observaram altas concentrações de açúcares redutores nessa faixa de pH, em folhas completamente expandidas e não citaram a influência do pH na hidrólise da sacarose.

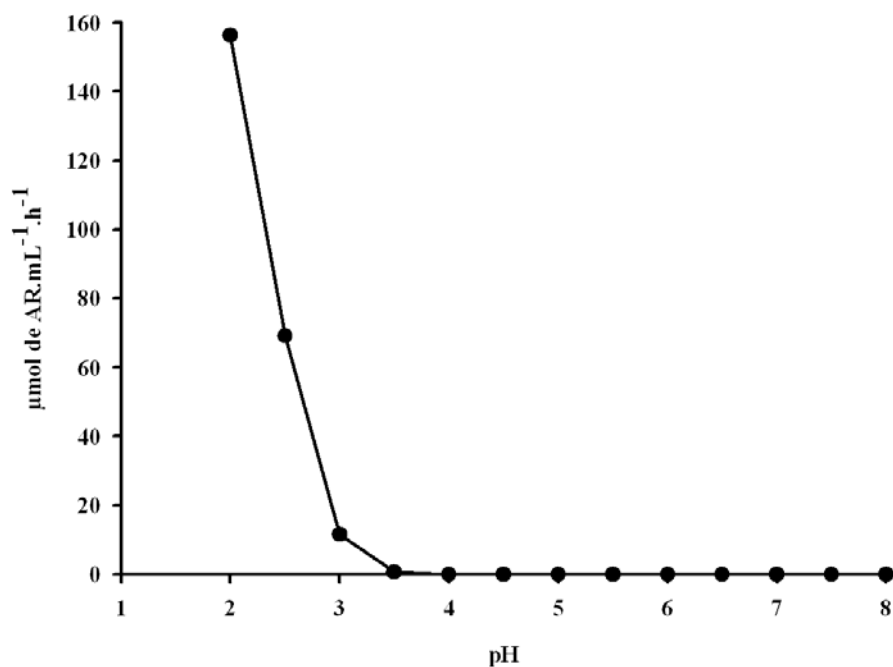


Gráfico 2 Concentração de açúcares redutores no meio de reação sem enzima em função do pH dos diferentes tampões utilizados no meio de reação. As barras representam o erro padrão da média de três repetições

3.2 Atividades, *in vivo* e *in vitro*, das enzimas invertases em função da concentração de sacarose no meio de reação em folha

O Gráfico 3 apresenta os resultados da atividade das invertases ácidas e neutra em diferentes concentrações de sacarose no ensaio *in vivo* e *in vitro*. No ensaio *in vivo*, a máxima atividade da invertase ácida ocorreu na concentração de 200 mM, reduzindo posteriormente. Para a invertase neutra, a máxima atividade ocorreu na concentração de 250 mM.

No ensaio *in vitro*, a invertase ácida, dentro das concentrações avaliadas, apresentou o máximo de atividade em 300 mM. No entanto, não ocorreu uma

saturação, sugerindo que, em concentrações superiores de sacarose, essa atividade pode ser incrementada. A invertase neutra apresentou sua máxima atividade na concentração de 200 mM (Gráfico 3).

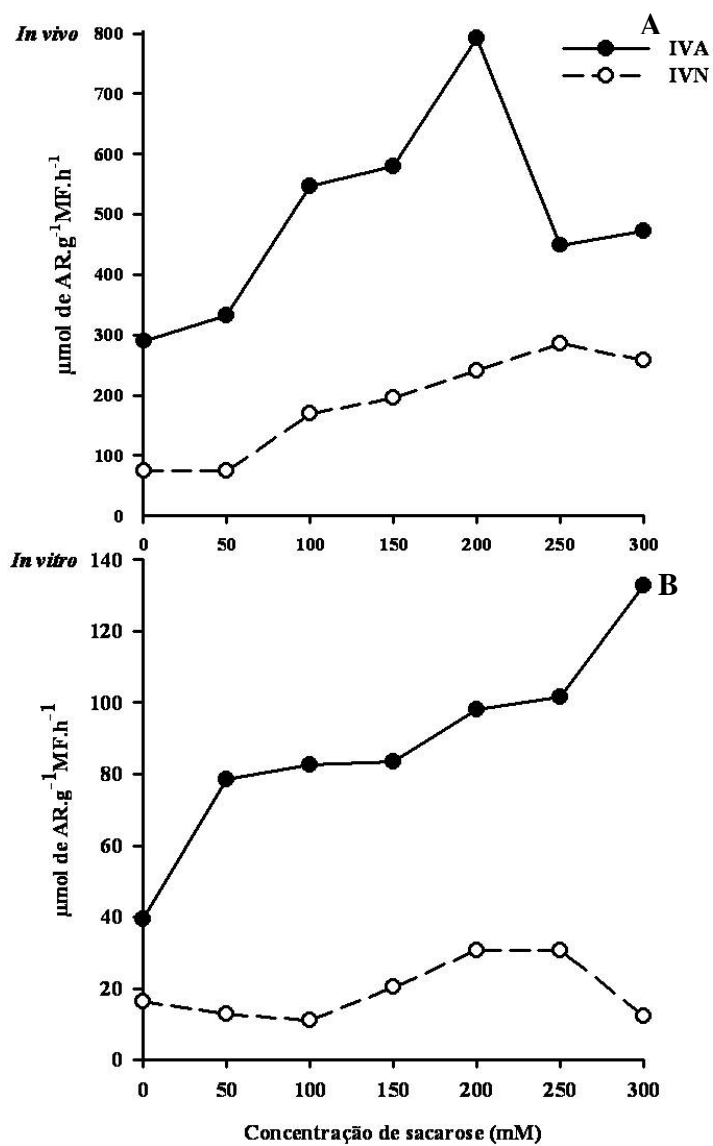


Gráfico 3 Atividade *in vivo* (A) e *in vitro* (B) das invertases ácida e neutra, em função da concentração de sacarose no meio de incubação em lâmina foliar completamente expandida de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições

Na ausência de sacarose no meio de reação, as atividades das enzimas, para ambos os métodos, não foram nulas. Isso, provavelmente, se deve à presença de sacarose endógena no tecido, como evidenciado no Gráfico 4.

De acordo com Oliveira et al. (2006), em folhas de seringueira completamente expandida, a concentração ótima de sacarose no meio de reação é de 50 a 100 mM. Em outras espécies, como cana-de-açúcar e cafeeiro, têm sido encontradas atividades ótimas em concentrações inferiores à encontrada no presente trabalho (CAVALARI, 2004; OLIVEIRA, 1985).

As concentrações de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose presentes nos tecidos foliares foram de 208 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MF}$, 93 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MF}$ e 109 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MF}$, respectivamente (Gráfico 4). A sacarose representa cerca de 52,4% dos açúcares presentes na folha no estágio D e isso se deve, certamente, à alta atividade fotossintética neste estágio.

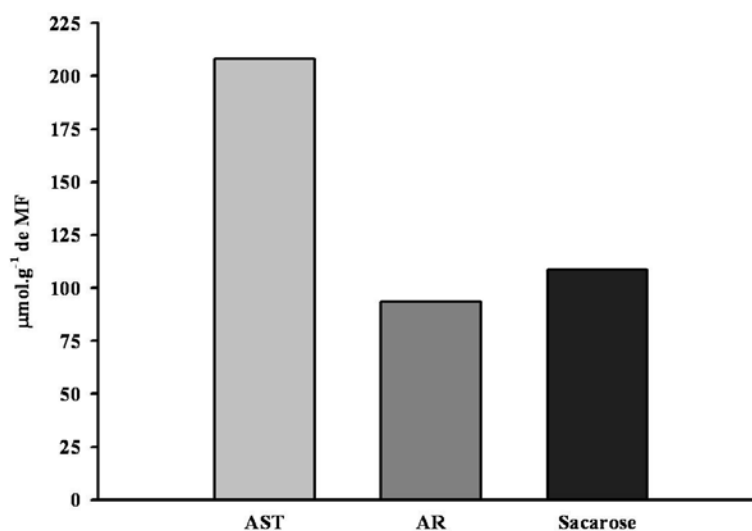


Gráfico 4 Teor de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose em lâmina foliar completamente expandida (estádio D) de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de três repetições

3.3 Atividades, *in vivo* e *in vitro*, das enzimas invertases em função da temperatura do meio de reação em folha

No Gráfico 5 são apresentados os dados da atividade de invertase ácida total e neutra em diferentes temperaturas. Observa-se que, nos dois ensaios, a temperatura ótima de reação das invertases foi de 37°C, resultados estes que corroboram os encontrados por Oliveira (1985) e Oliveira et al. (2006).

Pelo ensaio *in vivo* (Gráficos 5A e 5B), observa-se que a invertase ácida total (apoplástica e a vacuolar) é mais sensível à variação de temperatura, pois houve uma redução de cerca de 50% na atividade dessas enzimas quando a temperatura foi superior ou inferior a 37°C. A atividade da invertase neutra apresentou redução em temperaturas inferiores e superiores a 37°C, no entanto, a redução foi menos expressiva quando comparada com a atividade das invertases ácidas (Gráficos 5A e 5B).

As enzimas apresentam temperatura ótima de funcionamento, apresentando redução de atividade em temperaturas acima e abaixo da temperatura ótima. A queda na atividade em temperaturas superiores a 37°C pode ser interpretada como sendo devido a alterações na estrutura conformacional da enzima, ou seja, a proteína passa da sua estrutura terciária, forma ativa, para a estrutura secundária e primária, formas inativas. Em relação à queda em temperaturas inferiores a 37°C, a enzima pode apresentar uma sensibilidade de resposta, especialmente devido às condições de campo a que estava submetida e em função da redução da atividade metabólica.

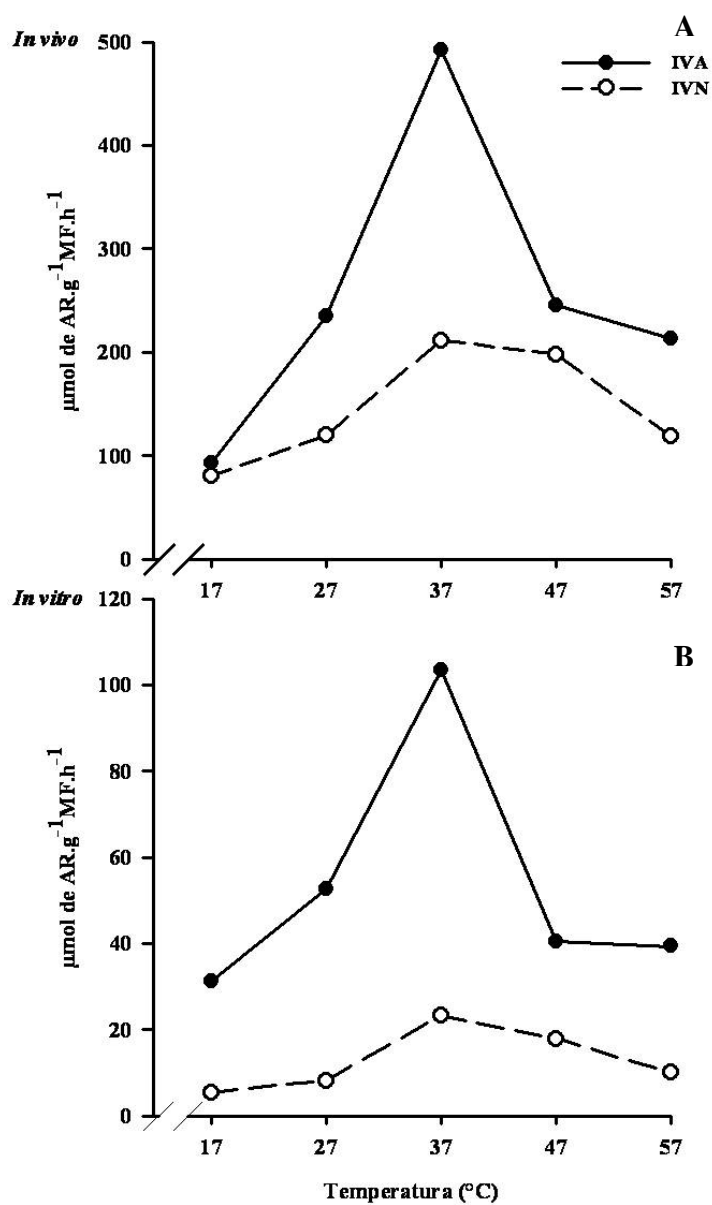


Gráfico 5 Atividade *in vivo* (A) e *in vitro* (B) das invertases ácida e neutra, em função da temperatura em lâmina foliar completamente expandida de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições

3.4 Atividades, *in vivo* e *in vitro*, das enzimas invertases e SuSy, em função do pH do meio de reação em casca

Observam-se, nos Gráficos 6 A e 6 B, os resultados das atividades das enzimas invertases e SuSy, em diferentes pH, pelos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Verifica-se, no ensaio *in vivo*, que houve grande variação na atividade das invertases em função do pH, sugerindo uma possível atuação de diferentes isoformas, o que precisa ser melhor investigado. A atividade máxima das invertases ocorreu em pH 3,5, com valores de atividade próximos a 150 μmol de AR. $\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

A atividade da SuSy na casca teve comportamento semelhante ao observado em tecidos foliares, sugerindo que a atividade enzimática avaliada pelo ensaio *in vivo*, em pH ácido, seja da invertase ácida e não da SuSy e em pH neutro, a atividade da invertase neutra e a da SuSy.

Observa-se que tanto pelo ensaio *in vivo* quanto pelo *in vitro*, a atividade das invertases apresentou valores maiores em pH mais ácido. Esses resultados corroboram os observados por Cairo (2007), que verificou maior atividade da invertase ácida na casca de plantas jovens de seringueira, em comparação à atividade da invertase neutra. Os valores encontrados por estes autores foram inferiores aos verificados no presente trabalho o qual foi realizado em plantas adultas. Resultados divergentes foram encontrados por Oliveira et al. (2006) que observaram maior atividade em pH 7,0 no ensaio *in vitro* em casca de seringueira de plantas adultas.

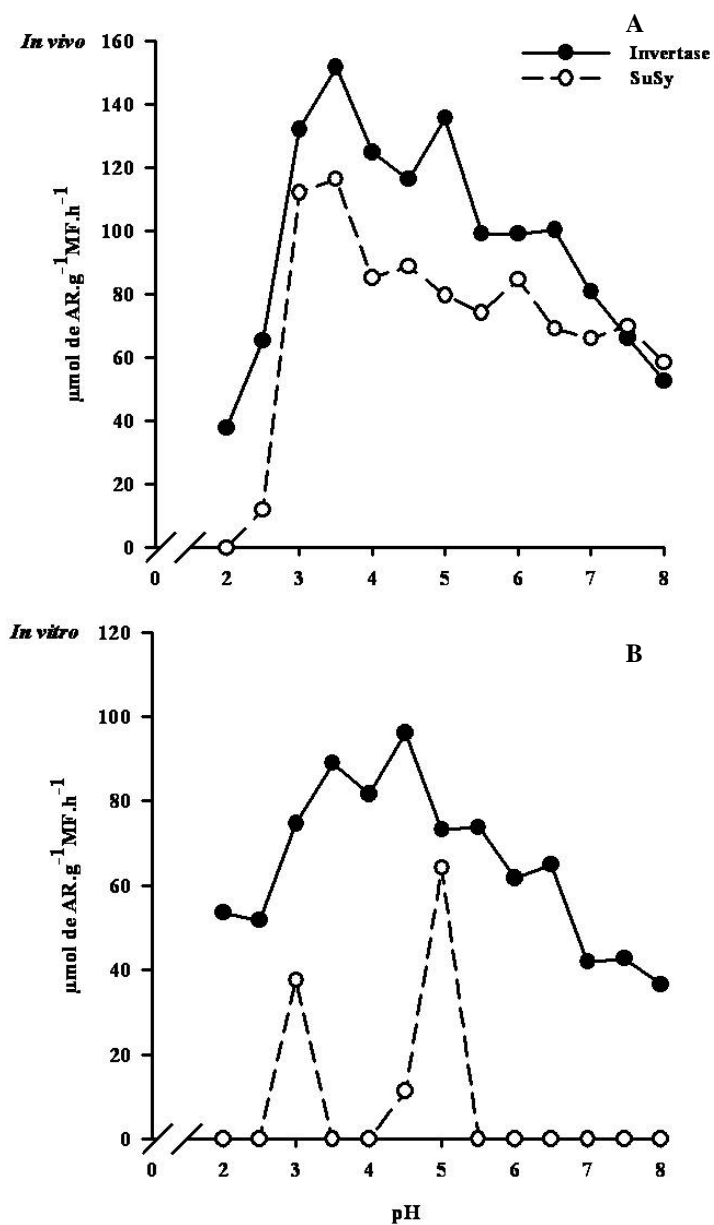


Gráfico 6 Atividade *in vivo* (A) e *in vitro* (B) das invertases e SuSy, em função do pH do meio de incubação em casca de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições

Na determinação da atividade da invertase ácida apoplástica no ensaio *in vitro*, foram observados valores em pH 3,5 próximos a 50 μmol de AR. $\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, evidenciando sua contribuição na hidrólise da sacarose em casca.

Mas, para a obtenção de dados “concretos” da “verdadeira” contribuição das diferentes isoformas de invertases na clivagem de sacarose na casca da seringueira, serão necessários estudos mais aprofundados envolvendo a caracterização e a purificação dessas enzimas, como citado anteriormente para folha.

3.5 Atividades, *in vivo* e *in vitro*, das enzimas invertases, em função da concentração de sacarose em casca.

Nos Gráficos 7A e 7B, estão representados os resultados da atividade das enzimas invertases em diferentes concentrações de sacarose. No ensaio *in vivo*, a invertase ácida teve maior atividade na concentração de 100 mM, mantendo-se quase que constante até a concentração de 200 mM e, posteriormente, diminuindo sua atividade drasticamente. A invertase neutra, dentro das concentrações avaliadas, apresentou o máximo de atividade em 300 mM, no entanto, não ocorreu saturação, indicando que essas enzimas podem ser responsivas a maiores concentração de sacarose. No ensaio *in vitro*, todas as enzimas apresentaram máxima atividade na concentração de 200 mM, reduzindo drasticamente sua atividade depois dela (Gráfico 7).

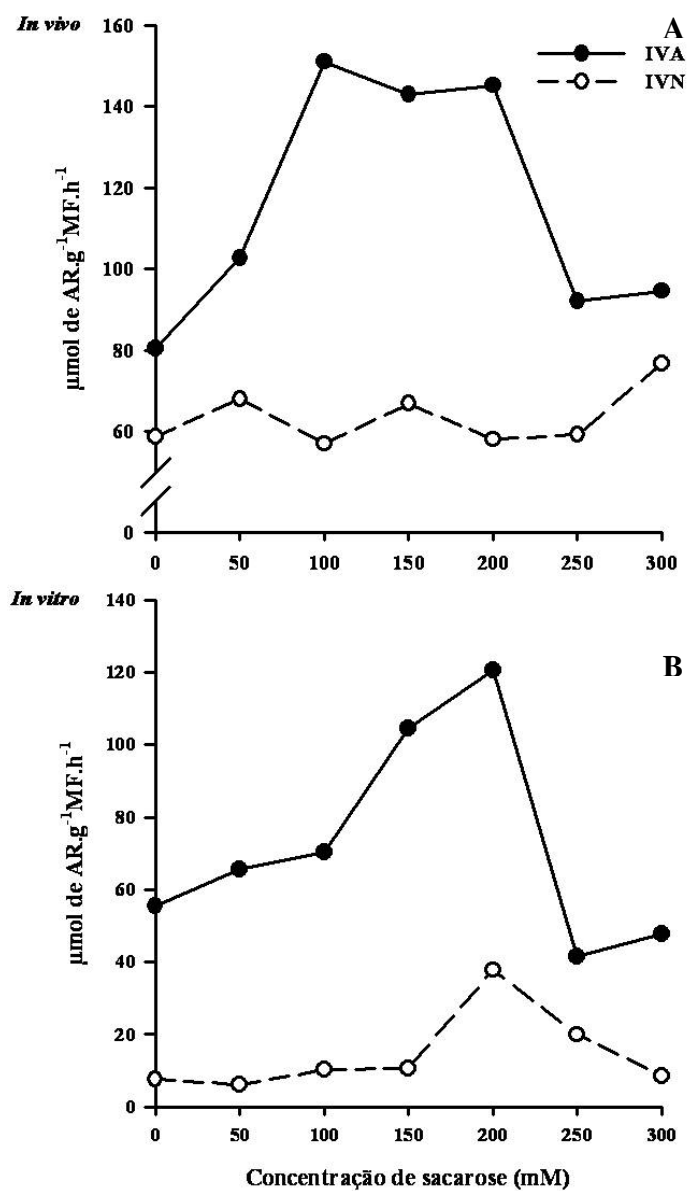


Gráfico 7 Atividade *in vivo* (A) e *in vitro* (B) das invertases ácida e neutra, em função da concentração de sacarose no meio de incubação em casca de seringueira do clone RRIM As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições

À semelhança do observado em tecidos foliares, na ausência de sacarose no meio de reação, as atividades das enzimas para ambos os métodos também não foram nulas. Isso, provavelmente, se deve à presença de sacarose no tecido avaliado, como evidenciado no Gráfico 8.

No Gráfico 8, estão demonstrados os valores de AST, AR e sacarose na casca, sendo, aproximadamente, de 109 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MF}$, 86 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MF}$ e 22 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{MF}$, respectivamente. Comparando-se as proporções de açúcares no tecido foliar e na casca, observa-se que a proporção de sacarose é menor na casca, já que este tecido faz parte de um órgão dreno, necessitando de hexoses para o seu metabolismo, ou seja, apresentando maior proporção de açúcares redutores.

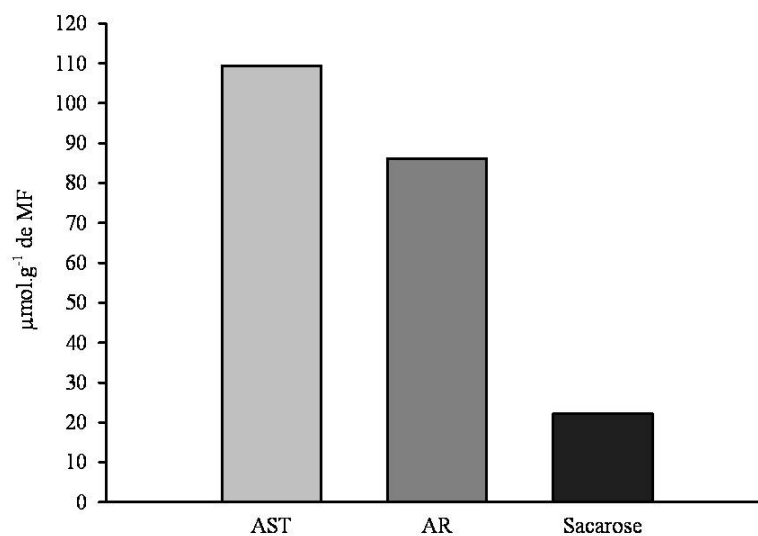


Gráfico 8 Teores de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose em casca de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições

3.6 Atividades, *in vivo* e *in vitro*, das enzimas invertases, em função da temperatura do meio de reação em casca.

No Gráfico 9, estão apresentados os resultados de atividade das invertases em diferentes temperaturas. No ensaio *in vitro*, a temperatura ótima de reação para a atividade enzimática foi de 37°C, dados estes que corroboram os resultados de Oliveira et al. (2006).

No ensaio *in vivo*, o aumento da temperatura promoveu um incremento na atividade das invertases. Em alguns trabalhos com plantas, há relatos de que a atividade máxima da invertase pode ser atingida em torno de 60°C (KRISHAN; PUEPPKE, 1990; RAHMAN et al., 2004) e em outros, cita-se que essa temperatura pode ser maior, chegando a 80°C (POMTAVEEWAT; TAKAYANAGI; YOOTSUKA, 1994).

Oliveira (1985) relata que a tolerância das invertases a temperaturas mais altas pode ser devido à proteção da molécula enzimática exercida pelo seu próprio substrato.

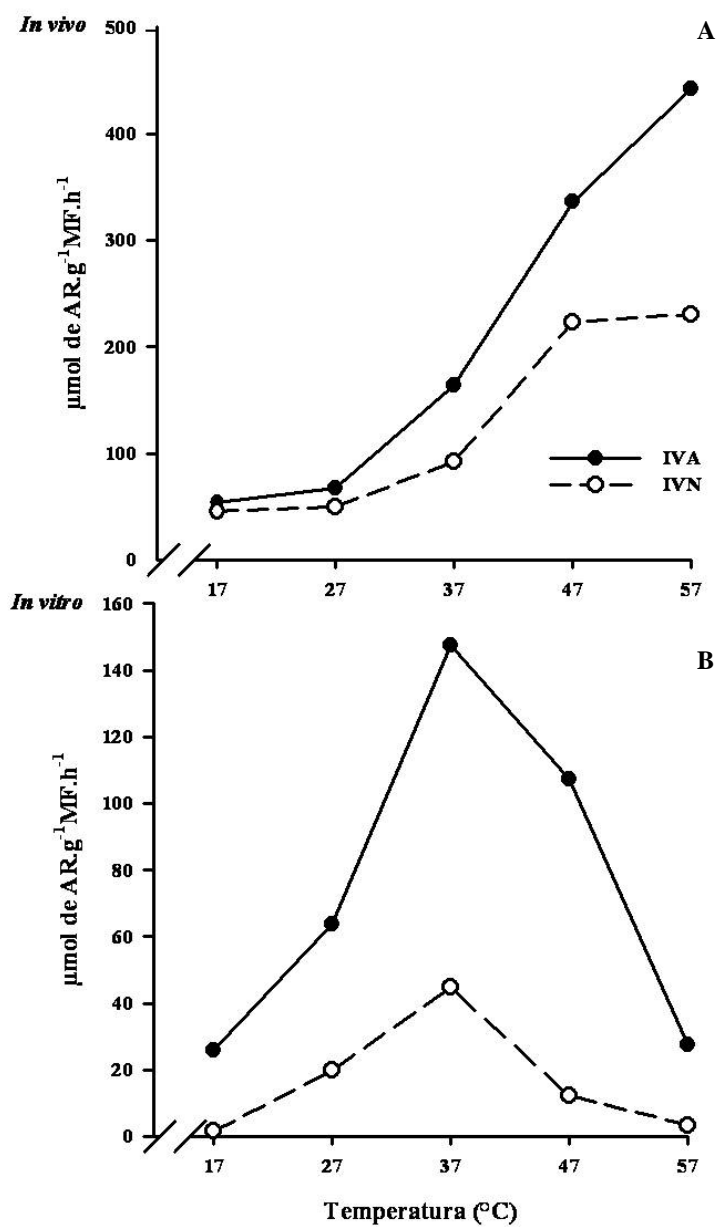


Gráfico 9 Atividade *in vivo* (A) e *in vitro* (B) das invertases ácida e neutra, em função da temperatura em casca de seringueira do clone RRIM 600. As barras representam o erro padrão da média de 3 repetições

4 CONCLUSÕES

Os resultados permitiram concluir que, em tecidos de folha e casca de seringueira, a hidrólise da sacarose foi exercida, predominantemente, pelas invertases ácidas.

Para os ensaios enzimáticos no tecido de folha, as condições apropriadas foram:

a) ensaio *in vivo*: pH 3,5 para invertase ácida e 7,5 invertase neutra, à concentração de sacarose 200 mM e temperatura de 37°C;

b) ensaio *in vitro*: pH 3,5 para invertase ácida e 6,0 invertase neutra, à concentração de sacarose 200 mM e temperatura de 37°C.

Para os ensaios enzimáticos no tecido de casca, as condições apropriadas foram:

a) ensaio *in vivo*: pH 3,5 para invertase ácida e 6,5 invertase neutra, à concentração de sacarose 200 mM;

b) ensaio *in vitro*: pH 4,0 para invertase ácida e 6,5 invertase neutra, à concentração de sacarose 200 mM e temperatura de 37°C.

Ocorreu hidrólise não enzimática da sacarose na faixa de pH 2,0-3,5.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Normas climatológicas**: 1960-1991. Brasília, 1992. 84 p.

CAIRO, P. A. R. **Variação sazonal da atividade da rubisco e das enzimas de síntese e hidrólise da sacarose em plantas de seringueira [Hevea brasiliensis (Willd ex. A. Juss.) Müell.-Arg], em Lavras, MG**. 2007. 64 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

CAIRO, P. A. R. et al. Atividade da rubisco e das enzimas de síntese e hidrólise de sacarose, associada à produtividade de látex, em clones de seringueira [Hevea brasiliensis (Willd ex. A. Juss.) Müell.-Arg] cultivados em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 369-376, mar./abr. 2009.

CAVALARI, A. A. **Invertase ácida, sacarose sintase e o metabolismo de açúcares no desenvolvimento da semente de café (Coffea arabica L.)**. 2004. 62 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CHOW, K. S. et al. Insights into rubber biosynthesis from transcriptome analysis of Hevea brasiliensis latex. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 10, p. 2429-2440, Apr. 2007.

DUSOTOIT-COUCAUD, A. et al. Sucrose importation into laticifers of Hevea brasiliensis, in relation to ethylene stimulation of latex production. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, n. 4, p. 635-647, Apr. 2009.

FAHRENDORF, T.; BECK, E. Cytosolic and cell-wall-bound acid invertases from leaves of *Urtica dioica* L.: a comparison. **Planta**, Berlin, v. 180, n. 2, p. 237-244, July 1990.

GEIGENBERGER, P.; STITT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in developing potato tubers and other plant tissues. **Planta**, Berlin, v. 189, n. 3, p. 329-339, Aug. 1993.

GEROMEL, C. **Atividade hidrolítica da sacarose associada ao desenvolvimento do fruto de cafeeiro**. 2001. 70 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

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

HAWKER, J. S. Sucrose. In: DEY, P. M.; DIXEN, R. A. (Ed.). **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**. London: Academic, 1985. p. 1-48.

HUSSAIN, A. et al. Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane (*Saccharum officinarum L.*). **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 47, n. 3, p. 188-194, Mar. 2009.

KLOTZ, K. L.; FINGER, F. L.; SHELVER, W. L. Characterization of two sucrose synthase isoforms in sugarbeet root. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, n. 2, p. 107-115, Feb. 2003.

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

KRISHAN, H. B.; PUEPPKE, S. G. Cherry fruit invertase: partial purification, characterization and activity during fruit development. **Journal Plant Physiology**, Amsterdam, v. 135, n. 6, p. 662-666, 1990.

KRUGER, N. J. Carbohydrate synthesis and degradation. In: DENNIS, D. T.; TURPIN, D. M. **Plant physiology, biochemistry and molecular biology**. Harlow: Longman Scientific & Technical, 1990. p. 56-76.

KURKDJIAN, A.; GUERN, J. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 271-303, Nov. 1989.

LIMA, D. U. et al. Avaliação sazonal da produção de borracha e da dinâmica de carboidratos solúveis em plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas em Lavras, Minas Gerais. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 36, n. 3, p. 377-383, maio/jun. 2002.

LIN, S. S.; SUNG, H. Y. Partial purification and characterization of soluble acid invertase from rice (*Oryza sativa*) leaves. **Biochemical Molecular Biology International**, London, v. 31, n. 5, p. 945-953, Dec. 1993.

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.

MESQUITA, A. C. et al. Anatomical characteristics and enzymes of the sucrose metabolism and their relationship with latex yield in the rubber tree. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 18, n. 2, p. 1-8, Apr./June 2006a.

_____. Comportamento produtivo de clones de seringueira [*Hevea brasiliensis* (WILD. EX. ADR. DE JUSS) MUELL ARG.] em Lavras, MG. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 4, p. 633-639, 2006b.

MIGUEL, A. A. et al. Photosynthetic behaviour during the leaf ontogeny of rubber tree clones [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex. ADR. de Juss.) Muell. Arg.], In Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 91-97, jan./fev. 2007.

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

MORAES, V. H. F. et al. Teores de sacarose no látex de seringueiras nativas estimuladas com Ethrel. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 27-34, mar. 1978.

OLIVEIRA, C. R. M. et al. Trocas gasosas de caféeiros (*Coffea arabica* L.) e seringueiras (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) em diferentes sistemas de cultivo na região de Lavras, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 2, p. 197-206, mar./abr. 2006.

OLIVEIRA, D. P. **Avaliação sazonal da produção de látex e atividade de invertase em dois clones de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), cultivados em Lavras, Minas Gerais**. 1999. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

OLIVEIRA, L. E. M. **Comportamento de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) sob condições de deficiência hídrica: alterações da assimilação de nitrato e mobilização de açúcares**. 1985. 126 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

POMTAVEEWAT, W. T.; TAKAYANAGI, T.; YOOTSUKA, K. Purification and properties of invertase from Muscat Bailey a Grapes. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 78, n. 4, p. 288-292, July 1994.

RAHMAN, M. S. M. M. et al. Purification and characterization of invertase enzyme from sugarcane. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Lahore, v. 7, n. 3, p. 340-345, Sept. 2004.

ROITSCH, T.; GONZALEZ, M. C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 12, p. 606-613, Dec. 2004.

SHERSON, S. M. et al. Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 382, p. 525-531, Sept. 2003.

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

STURM, A.; TANG, G. Q. The sucrose-cleaving enzyme development, growth and carbon partitioning. **Trends in Plant Science**, London, v. 4, n. 10, p. 401-407, Oct. 1999.

TANASE, K.; SHOHEI, Y. Purification and characterization of two sucrose synthase isoforms from Japanese pear fruit. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 41, n. 4, p. 408-414, Oct. 2000.

TANGPAKDEE, J. et al. Rubber formation by fresh bottom fraction of *Hevea* latex. **Phytochemistry**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 275-281, May 1997.

TYMOWSKA-LALANNE, Z.; KREIS, M. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. **Advances in Botanical Research**, San Diego, v. 28, p. 71-117, 1998.

YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plants extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, Colchester, v. 57, p. 508-514, 1954.

ZENG, Y. et al. Differential regulation of sugar-sensitive sucrose syntheses by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and post-transcriptional responses. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 6, p. 1573-1583, 1998.

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO DE MUDAS CLONAIS POR ESTAQUIA EM SERINGUEIRA

RESUMO

A produção de mudas dos clones melhorados e/ou selecionados, que não dependam unicamente do processo de enxertia, a exemplo do enraizamento de brotações caulinares, é um aspecto importante para a heveicultura. Entretanto, características químicas e ou anatômicas podem inviabilizar a utilização desse método. Diante do exposto, esse trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar se constituintes químicos e/ou características anatômicas das brotações constituem ou não limitações ao enraizamento de brotações em seringueira. O material vegetal (brotações caulinares) foi coletado no jardim clonal, o qual passou por um processo de poda para induzir novas brotações. Foram realizados estudos envolvendo a indução do enraizamento de brotações caulinares com auxinas, avaliação da ontogênese do anel esclerenquimático em brotações de seringueira e influência de diferentes concentrações de látex no enraizamento de brotações de mandioca. A propagação assexuada por estaquia em seringueira não se mostrou promissora. Foi observado que as auxinas não induziram o sistema radicial e que as brotações caulinares com sete semanas de desenvolvimento apresentaram uma bainha de esclerênquima perivascular contínua, possivelmente atuando como uma barreira anatômica a emergência do primórdio radicular. O látex da seringueira promoveu efeito inibitório no enraizamento de mandioca, quando esta foi submetida a diferentes tempos de imersão.

Palavras chave: *Hevea brasiliensis*. Propagação vegetativa. Anel esclerenquimático. Auxinas.

ABSTRACT

The production of plantlets from improved or selected, that do not depend exclusively of grafting, like rooting of shoot explants, is an important aspect of Hevea crop. However chemical and/or anatomical characteristics can derail the usage of this method. Based in these facts, this study aimed to evaluate whether chemical constituents and/or anatomical characteristics of sprouts constitute limitations to rooting the sprouts in rubber trees. The plant material (shoot cuttings) was collected in a clonal garden in which the plants went through a process of pruning to induce new shoots. The results led to the conclusion that the asexual propagation by stem cuttings in the rubber tree did not prove to be promising. It was observed that the auxins did not induce the rooting system and that the stem budding showed a continuous perivascular sheath of sclerenchyma after seven weeks of development, possibly acting as an anatomical barrier towards the emergence of the root primordium. The rubber tree latex promoted an inhibitory effect on the rooting process of cassava, when these were subjected to different immersion times.

Keywords: *Hevea brasiliensis*. Vegetative propagation. Auxin. Anatomic barrier.

1 INTRODUÇÃO

A expansão da heveicultura no país depende de alterações em alguns setores da cadeia produtiva, dentre os quais merece destaque o setor de produção de mudas. Isso porque o sucesso de um seringal se inicia na implantação de mudas com alta qualidade genética e sanitária.

Atualmente, a propagação da seringueira para cultivos comerciais é realizada quase que exclusivamente por processos vegetativos. Dentre os processos existentes de propagação vegetativa, destaca-se, para a seringueira, o método de enxertia por borbulhia em porta-enxertos oriundos de sementes.

Embora este seja o método de propagação mais utilizado, ele pode apresentar alguns inconvenientes que podem comprometer o êxito econômico da cultura, tais como heterogeneidade dos porta-enxertos e incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto, resultante da variabilidade das sementes utilizadas para a produção do porta-enxerto. Além disso, as sementes de seringueira apresentam caráter recalcitrante, ou seja, perdem rapidamente o poder germinativo quando o seu teor de água é reduzido a valores inferiores a 30% (BONOME, 2006; CHIN et al., 1981). Esta característica restringe a oferta de mudas em determinadas épocas do ano.

A produção de mudas clonais de seringueira por meio do enraizamento de brotações pode ser uma opção viável para a heveicultura, pois é uma técnica utilizada para reproduzir uma planta geneticamente idêntica à planta matriz. Isso só é possível porque as células contêm, em seus núcleos, a informação necessária para gerar uma nova planta, em um princípio denominado totipotência. Essas células reproduzidas são somáticas, não havendo a união de gametas, resultando em clones (GRAÇA; TAVARES, 2000).

Ainda são escassas as informações acerca da produção de mudas de seringueira por meio do enraizamento de brotações caulinares. Essa técnica de propagação pode ser agrônoma e comercialmente viável, permitindo a

obtenção de uma grande quantidade de plantas, com as mesmas características de sistema radicular e copa do clone matriz de origem.

Nesse contexto, este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a influência das diferentes concentrações de auxinas no enraizamento das brotações; caracterizar a presença e o desenvolvimento do anel esclerenquimático em brotações de seringueira e avaliar a influência de diferentes concentrações de látex e tempo de imersão, no enraizamento de brotações de mandioca.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Experimento 1: Avaliação de diferentes concentrações de AIB e ANA no enraizamento de brotações caulinares de seringueira

O material vegetal (brotações caulinares) foi coletado aleatoriamente em um banco de germoplasma instalado no Setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da UFLA, o qual passou por um processo de poda para induzir um número maior de brotações.

Foram realizados estudos envolvendo a indução do enraizamento de brotações caulinares com ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA) em diferentes concentrações (0, 500, 1000, 2000, 4000 ppm). As concentrações foram baseadas em estudos, os quais utilizaram concentrações de até 1000ppm.

As brotações, com aproximadamente 20-30 cm, coletadas no banco de germoplasma, tiveram suas bases imersas em soluções com diferentes concentrações de AIB e ANA, durante 15 segundos. Posteriormente, as brotações foram colocadas em bandejas contendo dois tipos de substratos (vermiculita e areia lavada, ambos esterilizados). Foram mantidas duas folhas nas brotações, ambas cortadas pela metade. Uma vez plantadas em bandejas de enraizamento, foram mantidas em câmara de propagação, no Departamento de Agricultura da UFLA, com sistema de nebulização em intervalos de 15 minutos, em que, a cada intervalo, a irrigação permanecia ligada por 10 segundos. A temperatura foi mantida ao redor de 25°C.

O experimento foi instalado seguindo um delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 2x5x2, sendo dois reguladores de crescimento, cinco concentrações e dois tipos de substratos, com cinco repetições contendo quatro brotações.

2.2 Experimento 2: avaliação da ontogênese do anel esclerenquimático em brotações de seringueira

O material vegetal (brotações caulinares) foi coletado aleatoriamente no banco de germoplasma instalado no Setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da UFLA, e passou por um processo de poda drástica, para induzir um número maior de brotações. Após três semanas, surgiram as primeiras brotações e estas foram marcadas para serem coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento. A primeira coleta foi realizada na quarta semana após a poda, quando as brotações se encontravam com uma semana de desenvolvimento. Neste trabalho, será considerada a semana de desenvolvimento da brotação.

Semanalmente, as brotações foram coletadas e fixadas, por 72 horas, em FAA (5 mL de formaldeído comercial, 5 mL de ácido acético e 90 mL de etanol 70%) e, posteriormente, conservadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). As coletas foram realizadas até a observação da formação do anel esclerenquimático pelos cortes anatômicos.

Os cortes transversais da base das brotações foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal, no Departamento de Biologia da UFLA, e efetuados com o auxílio de um micrótomo de mesa, sendo, em seguida, submetidos ao processo de coloração com safra-blau, uma mistura de safranina com azul de astra (KRAUS; ARDUIN, 1997). Após o processo de coloração, foi feita a montagem das lâminas semipermanentes, em água glicerinada 50%, sendo fotomicrografadas em fotomicroscópio Olympus BX-60, para verificar a formação das células que formam o anel esclerenquimático.

2.3 Experimento 3: avaliação de diferentes concentrações de AIB e ANA no enraizamento de brotações caulinares sem a presença da barreira anatômica

O material vegetal (brotações caulinares) foi coletado aleatoriamente em um banco de germoplasma instalado no Setor de Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da UFLA, o qual passou por um processo de poda drástica para induzir um número maior de brotações. No momento em que surgiram as primeiras brotações, fez-se a marcação para a coleta. As brotações foram coletadas com cinco semanas de desenvolvimento, estágio que antecede à formação do anel esclerenquimático, de acordo com os resultados obtidos no experimento 2.2.

Foram realizados estudos envolvendo a indução do enraizamento de brotações caulinares com ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftaleno acético (ANA), em diferentes concentrações (0, 500, 1000, 2000 e 4000 ppm).

A base das brotações coletadas foi imersa por 15 segundos, em diferentes concentrações de ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA), tendo sido utilizados três substratos: areia, vermiculita e água. No tratamento com o substrato água, as brotações caulinares foram colocadas em frascos contendo água destilada e com constante aeração dos mesmos. Uma vez plantadas, as brotações caulinares foram mantidas em câmara de propagação, no Setor Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da UFLA, com sistema de nebulização em intervalos de 15 minutos. A cada intervalo, a irrigação permanecia ligada por 10 segundos, com temperatura ao redor de 25°C.

O experimento foi instalado seguindo um delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2x5x3, sendo dois reguladores de crescimento, cinco concentrações e três tipos de substratos, com cinco repetições contendo quatro brotações.

2.4 Experimento 4: avaliação da influência de diferentes concentrações de látex no enraizamento de brotações de mandioca

As brotações caulinares de mandioca (também uma euforbiácea, de fácil enraizamento) foram obtidas segundo o método de propagação rápida da mandioca, desenvolvido pelo CIAT (COCK et al., 1976). Estas foram coletadas com um tamanho de 15-20 cm e suas partes basais submersas em diferentes concentrações de látex, visando verificar o seu possível efeito inibitório sobre a formação de raízes adventícias. Foram mantidas duas folhas nas brotações, ambas cortadas pela metade.

O experimento foi conduzido em uma sala de crescimento com nebulização manual, temperatura em torno de 25°C e fotoperíodo de 12 horas, no Setor Fisiologia Vegetal, no Departamento de Biologia da UFLA. Os tratamentos foram constituídos de quatro concentrações de látex diluídos em água destilada (0%, 50%, 75% e 100% de látex) e três tempos de imersão (2, 12, 24 horas), as quais foram colocadas para enraizarem em frascos contendo água destilada e com constante aeração dos mesmos. Após quatro três semanas, foram avaliados: número de raízes, comprimento da maior raiz, porcentagem de enraizamento e porcentagem de sobrevivência.

3 RESULTADOS

3.1 Experimento 1: avaliação de diferentes concentrações de AIB e ANA no enraizamento de brotações caulinares de seringueira

No experimento 1, as brotações caulinares de seringueira apresentaram 100% de mortalidade, à semelhança de outros estudos já realizados. As brotações apresentaram uma necrose na parte basal da estaca, em todos os tratamentos, com aproximadamente três semanas e também queda das folhas. Em cinco semanas, havia ocorrido 100% de mortalidade das estacas.

Possivelmente, o insucesso destes trabalhos seja decorrente de um provável efeito inibitório do látex presente nas brotações e ou da barreira anatômica, anel esclerenquimático, os quais foram avaliados nos experimentos 2 e 3.

3.2 Experimento 2 e 3: ontogênese do anel esclerenquimático em brotações de seringueira e avaliação de diferentes concentrações de AIB e ANA no enraizamento de brotações caulinares de clones de seringueira antes da formação do anel esclerenquimático

Na Figura 1 estão representadas as seções transversais de brotações de seringueira durante o desenvolvimento. Não houve diferença entre os clones coletados quanto ao desenvolvimento do anel esclerenquimático (dados não apresentados). As brotações com três semanas de desenvolvimento não apresentavam os feixes vasculares e nem a diferenciação dos tecidos (Figura 1 A). Provavelmente, nesse estágio, as estacas não estavam aptas a enraizar, visto que a formação das raízes adventícias ocorre a partir dos tecidos do parênquima do floema ou do câmbio e estes ainda não estavam desenvolvidos. A formação

do anel iniciou-se em brotações coletadas na quarta semana após o surgimento da brotação (Figura 1B). Na quinta e na sexta semana, as brotações apresentavam um anel esclerenquimático descontínuo (Figura 1C).

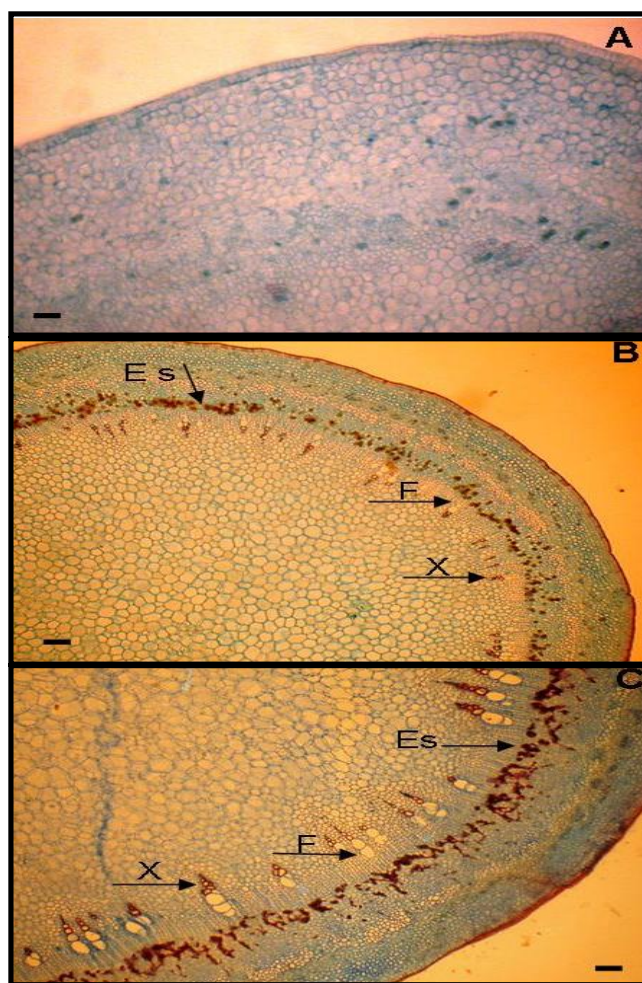


Figura 1 Seções transversais de brotações de plantas de seringueira em diferentes idades ontológicas, após o surgimento das brotações. A) 3 semanas, B) 4 semanas, C) 5 semanas. X, Es e F indicam xilema, esclerenquima e floema, respectivamente. Barra= 100 μ m

Por outro lado, em brotações com seis semanas de desenvolvimento (Figuras 2 A e B), notam-se a completa formação dos tecidos vasculares e a presença de células do tecido esclerenquimático de forma quase contínua, podendo, neste caso, constituir um obstáculo ao crescimento das raízes. Pois, embora haja pequenas fendas para a passagem das raízes em crescimento, o número de fendas pode ser reduzido, afetando o enraizamento das brotações. Maynard e Bassuk (1996), trabalhando com estacas de *Carpinus betulus*, verificaram associação entre o número de fendas no anel esclerenquimático e o número de raízes formadas.

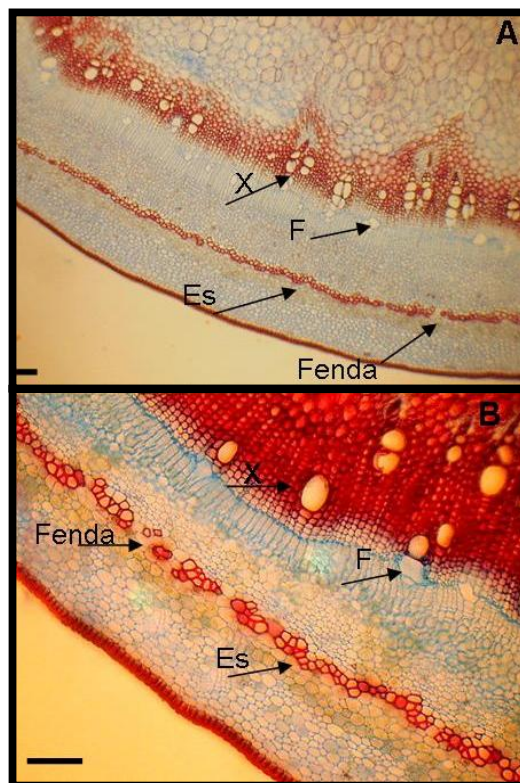


Figura 2 Seções transversais de brotações de plantas de seringueira com seis semanas de desenvolvimento. A) visão distanciada; B) visão aproximada. X, Es e F indicam xilema, esclerênquima e floema, respectivamente. Barra= 100 μ m

Em brotações com sete semanas de desenvolvimento (Figura 3), verifica-se a formação de um anel esclerenquimático contínuo ao redor do tecido vascular, o qual pode atuar como uma barreira anatômica à emergência do primórdio radicular.

A bainha de esclerênquima perivascular, quando se apresenta contínua, pode oferecer um obstáculo ao crescimento das raízes, desviando-as de seu curso normalmente radial (LOPES, 1995). Em estudos com estacas obtidas de ramos

maduros de *Hedera helix* de difícil enraizamento, de *Olea europea* L. e de *Ficus pumila*, Lopes (1995) verificou que a presença do anel esclerenquimático estava sempre associada com as estacas de difícil enraizamento, enquanto aquelas de fácil enraizamento foram caracterizadas pela descontinuidade ou por poucas camadas de células no anel de esclerênquima.

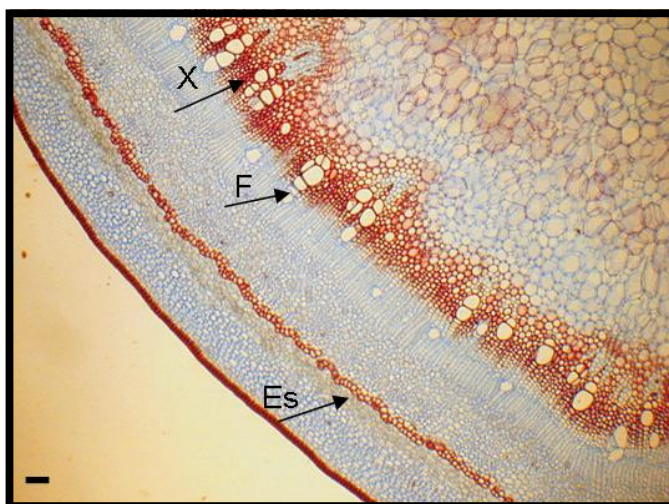


Figura 3 Seção transversal de brotações de plantas de seringueira com sete semanas de desenvolvimento. X, Es e F indicam xilema, esclerênquima e floema, respectivamente. Barra= 100 μ m

A dificuldade de enraizamento de brotações de seringueira não deve ser atribuída apenas à presença de uma barreira anatômica, pois existem espécies de plantas de difícil enraizamento, como *Pfitosporum*, que não apresentam um anel esclerenquimático (BEAKBANE, 1961). Além da presença da barreira física, outros fatores, como impedimento químico (GOODIN, 1965), adequado balanço hormonal (CHALFUN; PASQUAL; HOFFMANN, 1997) e idade das estacas, podem afetar o enraizamento.

Dessa maneira, novos estudos devem ser realizados, visando identificar outras causas, além da barreira anatômica, que podem afetar o enraizamento de estacas de seringueira.

No experimento 3, as brotações caulinares de seringueira apresentaram 100% de mortalidade, independentemente das concentrações de AIB e ANA e dos tipos de substratos utilizados, à semelhança de outros estudos já realizados.

3.3 Experimento 4: influência de diferentes concentrações de látex no enraizamento de mandioca

Pelos dados da Tabela 1, observa-se que houve diferença estatística entre os tempos de imersão das brotações em diferentes concentrações de látex. No tempo de duas horas, houve diferença entre as concentrações de látex. Para os tempos de imersão de 12 e 24 horas, nenhuma estaca enraizou, com exceção do controle. Na quarta semana em que o experimento foi avaliado, observou-se que as brotações que foram submetidas aos tempos de imersão de 12 e 24 horas, em todas as concentrações, apresentaram morte celular da parte basal da brotação (Figura 4).



Figura 4 Morte celular da parte basal da brotação de mandioca, quatro semanas após a aplicação do látex

A morte celular da base das brotações de mandioca pode ter ocorrido devido a substâncias presentes no látex, como citado por Agostini (2009) e Blackley (1997), que cita que os carboidratos do látex podem ser transformados em ácidos voláteis, os quais podem inibir o enraizamento das brotações de mandioca, bem como o enraizamento da própria seringueira. A presença de tais substâncias pode justificar o insucesso dos experimentos anteriores em que, mesmo adicionando reguladores de crescimento, houve 100% de mortalidade das brotações.

Tabela 1 Médias das estacas enraizadas, vivas e mortas, sob diferentes concentrações de látex em três tempos de imersão

Tratamentos		Brotações caulinares		
Tempo de imersão (horas)	Concentração de látex (%)	Enraizadas (%)	Vivas (%)	Mortas (%)
2	0	100,0 aA	100,0	0,0
	50	91,7 abA	91,6	8,4
	75	90,0 bA	90,0	10,0
	100	53,3 cA	53,3	46,7
12	0	100,0 aA	100,0	0,0
	50	0,0 bB	27,3	72,7
	75	0,0 bB	36,7	63,3
	100	0,0 bB	14,0	86,0
24	0	100,0 aA	100,0	0,0
	50	0,0 bB	0,0	100,0
	75	0,0 bB	14,0	86,0
	100	0,0 bB	25,0	75,0

As médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si, para as concentrações em diferentes tempos e a mesma letra maiúscula não difere entre si, para os tempos em diferentes concentrações, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No tempo de imersão de 2 horas, nota-se que as concentrações de látex afetaram o enraizamento das brotações; à medida que aumentou a concentração de látex, diminuiu a porcentagem de estacas enraizadas e vivas. Nos tempos de 12 e 24 horas, as brotações apresentaram o escurecimento do local que ficou em contato com o látex, após alguns dias de permanência no substrato, evidenciando o efeito fitotóxico das substâncias advindas do látex sobre as brotações. Para o tratamento de 2 horas de imersão, avaliaram-se o número de raízes e o comprimento da maior raiz (Gráfico 1) nas estacas enraizadas

Observa-se que, para as diferentes concentrações de látex, não houve diferença significativa para o número de raízes, no tempo de imersão de duas horas (Gráfico 1). O comprimento da maior raiz foi superior no controle e, para as concentrações de 50% e 75%, não houve diferenças significativas entre si. A

concentração de 100% não diferiu estatisticamente da concentração de 75%, apresentando-se inferior ao controle.

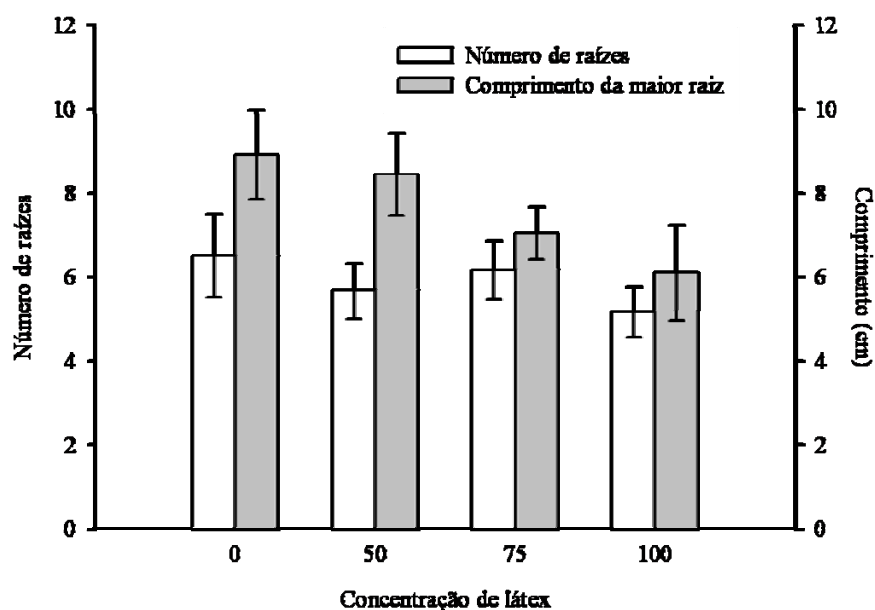


Gráfico 1 Número de raízes e comprimento da maior raiz em brotações de mandioca, em diferentes concentrações de látex, no tempo de 2 horas de imersão

Estes resultados sugerem que o látex contém substâncias que inibem o enraizamento da seringueira, contradizendo os resultados encontrados por Baptist (1939) e Mendes (1959), os quais obtiveram alta porcentagem de enraizamento de estacas de seringueira. No entanto, estes autores citam que não conseguiram enraizar estacas de plantas enxertadas apenas de plantas pé-franco. Sugere-se que se faça uma análise química do látex, para se conhecer as substâncias existentes neste que possam estar inibindo o enraizamento.

4 CONCLUSÕES

A utilização de auxinas não é eficiente para induzir o sistema radicial em seringueira.

A bainha de esclerênquima perivascular nas brotações caulinares estudadas é contínua com sete semanas de desenvolvimento, possivelmente atuando como uma barreira anatômica á emergência do primórdio radicular.

O látex da seringueira promove um efeito inibitório no enraizamento de mandioca.

REFERÊNCIAS

AGOSTINI, D. L. S. **Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese**. 2009. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2009.

BAPTIST, E. D. C. Plant hormones. **Journal of the Rubber Research Institute of Malasia**, Kuala Lumpur, v. 9, p. 17-39, 1939.

BEAKBANE, A. B. Structure of the plant stem in relation to adventitious rooting. **Nature**, London, v. 192, n. 4806, p. 954-955, 1961.

BLACKLEY, D. C. **Polymers latices**. Glasgow: Chapman & Hall, 1997. v. 2, 655 p.

BONOME, L. T. da S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex. ADR. de Juss.) Müell Arg.] durante o armazenamento**. 2006. 124 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

CHALFUN, N. N. J.; PASQUAL, M.; HOFFMANN, A. **Fruticultura comercial: frutíferas de clima temperado**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. 304 p.

CHIN, H. F. et al. The effect of moisture and temperature on the ultrastructure and viability of seeds of *Hevea brasiliensis*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 9, n. 2, p. 411-422, June 1981.

COCK, J. et al. **Sistema rápido de propagación de yuca**. Cali: CIAT, 1976. 13 p.

GOODIN, J. R. Anatomical changes associated with juvenile-to-mature growth phase transition in *Hedera*. **Nature**, London, v. 208, n. 5009, p. 504-505, 1965.

GRAÇA, M. E. C.; TAVARES, F. R. Propagação vegetativa de espécies florestais. In: GALVÃO, A. P. M. (Org.). **Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais**: um guia para ações municipais e regionais. Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia; Colombo: EMBRAPA Florestas, 2000. p. 175-197.

JOHANSEN, B. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Edeir, 1997. 198 p.

LOPES, M. C. **Propagação vegetativa da mangueira (*Mangifera indica* L.) por estaquia**. 1995. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1995.

MAYNARD, B. K.; BASSUK, N. L. Effects of stock plant etiolation, shading, banding, and shoot development on histology and cutting propagation of *Carpinus betulus* L. *fastigiata*. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Madison, v. 121, n. 5, p. 853-860, Nov. 1996.

MENDES, L. O. T. Sobre o enraizamento de estacas de seringueira. **Bragantia**, Campinas, v. 18, p. 47-49, 1959.