

PAULO ARAQUÉM RAMOS CAIRO

**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.)
Muell.-Arg], EM LAVRAS, MG**

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

Orientador

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

Cairo, Paulo Araquém Ramos

Varição 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.) Muell.-Arg], em Lavras-MG. / Paulo Araquém Ramos Cairo.

. – Lavras : UFLA, 2007.

64 p. : il.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Seringueira. 2. Rubisco. 3. Sacarose fosfato sintase. 4. Invertase. 5. Sacarose sintase. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.8952

PAULO ARAQUÉM RAMOS CAIRO

**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.)
Muell.-Arg], EM LAVRAS, MG**

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

APROVADA em 15 de fevereiro de 2007

Dr. Alessandro Carlos Mesquita

FAPEMIG

Profa. Dra. Ângela Maria Soares

UFLA

Prof. Dr. Nelson Delú Filho

UNINCOR

Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro

IAC

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICATÓRIA

À memória de meus pais,

GILDÁSIO CAIRO DOS SANTOS e REGINA RAMOS CAIRO,

que, apesar das inúmeras adversidades que enfrentaram em suas vidas, conseguiram criar com dignidade e alegria os cinco filhos, ensinando-nos os melhores princípios de ética, solidariedade, amor e respeito ao próximo. Apesar de não terem tido a oportunidade de ir muito além da alfabetização, não mediram esforços para investir na formação educacional de todos nós, proporcionando-nos o acesso completo à educação superior. A sua ausência física entre nós será sempre muito sentida, mas sabemos que um dia estaremos juntos, para celebrarmos o sentido da vida e a certeza de uma missão cumprida.

À minha filha,

MARIANA BRITO CAIRO,

o maior presente que a vida me deu, uma bênção de Deus, cuja existência me faz acreditar, todos os dias, que a vida realmente vale a pena. Espero sempre ser digno do seu amor, carinho, respeito, e retribuir-lhe a imensa felicidade que o seu sorriso me proporciona. Saiba que sempre a amarei, mais que tudo em minha vida.

AGRADECIMENTOS

- Aos meus irmãos Ubirajara, Jurema e Luís, pelas mais diversas formas de carinho, apoio, solidariedade e incentivo, aos quais sempre tentarei corresponder à altura.
- Ao Prof. Luiz Edson, não apenas pela orientação e apoio à realização do curso, mas, sobretudo, pela inabalável confiança que sempre me dispensou, e pela amizade incondicional que pude desfrutar, em muitos dos principais momentos que marcaram minha vida, nos últimos anos.
- Ao “auxílio luxuoso” de Roberto Lisboa Cunha e Alessandro Carlos Mesquita, que além de serem amigos de enorme consideração, tornaram-se os principais colaboradores deste trabalho, cujo apoio terá sempre a minha mais sincera gratidão.
- Aos queridos e inesquecíveis amigos que conquistei durante o curso, com os quais tive o privilégio de desfrutar da convivência mais próxima: Marco Antônio Araújo Alencar, Aurélio Antas Miguel, Hilton Morbeck de Oliveira (e a esposa, Lia), Lisandro Tomas da Silva Bonome, Raírys Cravo Nogueira, Sidnei Deuner, Rodrigo Kelson Silva Rezende, João Peterson Pereira Gardin (e a esposa, Josy), Marco Antônio Menezes Neto (e a esposa, Rejane), Girlene Santos Souza, Antônio Augusto Moreira Viana, Cristiano Martinotto, Andréa Yu Kwan Villar Shan, Lenaldo Muniz de Oliveira (e a esposa, Mayara), Franciane Tavares Braga, Marcus José Conceição Lopes, Fúlvia Santos e Vanessa Stein.
- Aos muitos outros colegas e amigos, mesmo aqueles cuja convivência foi mais eventual, mas que ainda assim contribuíram para tornar ainda mais agradável a minha permanência em Lavras, durante a realização do curso.

- Ao colega e amigo, Prof. Ramon Correia de Vasconcelos, da UESB, pelo apoio e companheirismo de sempre, no início do curso.
- À colega Profa. Sylvana Naomi Matsumoto, por ter me substituído nas minhas funções de docente na UESB, durante todo o período de realização do curso.
- À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por intermédio do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, por ter me proporcionado a oportunidade de me qualificar em um curso de excelente qualidade.
- À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), por acreditar e investir na qualificação dos seus docentes, autorizando a minha licença integral daquela instituição, durante todo o período de realização do curso.
- À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao coordenador do Laboratório de Metabolismo Vegetal, Prof. Dr. Fábio Murilo da Matta, pelo apoio na realização de parte das atividades laboratoriais deste trabalho.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de estudos para a realização do curso.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento integral do projeto de tese.

BIOGRAFIA

PAULO ARAQUÉM RAMOS CAIRO, filho de Gildásio Cairo dos Santos e Regina Ramos Cairo, nasceu em 29 de janeiro de 1963, em Vitória da Conquista, BA. cursou o 1º grau em sua cidade natal e o 2º grau em Salvador, BA. Em 1980, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), em Cruz das Almas, BA, concluindo-o em janeiro de 1984. Nos primeiros anos como profissional, trabalhou com assistência técnica a fazendas de café e olericultura. Naquele período, presidiu o núcleo regional da Associação dos Engenheiros Agrônomos da Bahia (AEABA). Em 1987, foi admitido, por concurso, como professor da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), no “campus” de Vitória da Conquista, BA, onde, até hoje, é um dos responsáveis pelas disciplinas de Fisiologia Vegetal. Em 1990, ingressou no mestrado em Fisiologia Vegetal, da então Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL) – atual UFLA –, concluindo-o em agosto de 1992, quando defendeu a dissertação intitulada “Aspectos bioquímicos e metabólicos de plantas jovens de espécies florestais submetidas à baixa disponibilidade de água”, sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira. Em seu retorno à UESB, exerceu diversas funções administrativas na UESB, onde foi coordenador do Colegiado de Agronomia, diretor do Departamento de Fitotecnia e Zootecnia e Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação. Em 1995, foi escolhido vice-presidente Nordeste, na diretoria da Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal. A partir de 2003, retornou à UFLA, quando ingressou no doutorado em Fisiologia Vegetal, novamente sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira, concluindo-o em fevereiro de 2007.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	8
2.1 Rubisco e a assimilação de CO ₂	9
2.2 SPS e a síntese de sacarose	12
2.3 Hidrólise enzimática de sacarose	14
2.4 Efeitos da variação ambiental sobre a atividade enzimática	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Variação sazonal da atividade enzimática	22
3.1.1 Obtenção de material vegetal para as análises enzimáticas	23
3.1.2 Avaliação da atividade “in vitro” da Rubisco e da SPS em tecidos foliares	24
3.1.2.1 Extração das enzimas	24
3.1.2.2 Meios de reação para a Rubisco	24
3.1.2.3 Meios de reação para a SPS	25
3.1.3 Avaliação da atividade das invertases (ácida total e neutra) e SuSy em tecidos da casca	26
3.1.3.1 Estudo dos métodos “in vitro” e “in vivo”	27
3.1.3.2 Avaliação da atividade “in vivo” das invertases ácida e neutra e da SuSy em tecidos da casca	28
3.2 Atividade enzimática e sua interação com o desempenho produtivo em diferentes clones	29
3.3 Dados referentes à produção de látex	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Condições experimentais durante o período experimental	31
4.2 Variação sazonal da atividade enzimática	32
4.2.1 Atividade da Rubisco	32
4.2.2 Atividade da SPS	35
4.2.3 Atividade das invertases e da SuSy	37
4.2.3.1 Estudo dos métodos “in vitro” e “in vivo”	37
4.2.3.2 Avaliação da atividade “in vivo” das invertases ácida e neutra e da SuSy em tecidos da casca	40
4.3 Atividade enzimática e sua interação com o desempenho produtivo de diferentes clones	42
4.3.1 Produção de borracha natural dos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, cultivados em Lavras-MG	42
4.3.2 Atividade da Rubisco	44

4.3.3 Atividade da SPS	45
4.3.4 Atividade das invertases e da SuSy	46
5 CONCLUSÕES	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Temperatura média mensal (mínima, média e máxima) e precipitação total, registradas durante o período experimental. Dados fornecidos pela Estação Meteorológica de Lavras, MG.	31
TABELA 2. Dados de produção (g borracha seca / sangria / planta) dos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, cultivados em Lavras, MG, nos anos de 2002 a 2005. Os valores correspondem à produção média, por planta (média de cinco plantas), a cada sangria. Fonte: Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA.	43

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Atividade da Rubisco em $V_{INICIAL}$ (colunas claras) e V_{TOTAL} (colunas escuras), nos clones RRIM 600 e GT 1 (média dos clones), nos dois períodos avaliados. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 10 repetições. Letras minúsculas comparam médias de $V_{INICIAL}$, enquanto letras maiúsculas comparam médias de V_{TOTAL} , com base no teste de Tukey, a 5 % de probabilidade 34
- FIGURA 2. Atividade da SPS em V_{SEL} (colunas claras) e V_{MAX} (colunas escuras), nos clones RRIM 600 e GT 1 (média dos clones), nos dois períodos avaliados. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 10 repetições. Letras minúsculas comparam médias de V_{SEL} , enquanto letras maiúsculas comparam médias de V_{MAX} , com base no teste de Tukey, a 5 % de probabilidade 37
- FIGURA 3. Atividade das enzimas invertase ácida (IA), invertase neutra (IN) e SuSy, avaliadas pelos métodos “in vitro” e “in vivo” na casca de plantas adultas (18 anos) do clone RRIM 600 38
- FIGURA 4. Atividade conjunta das invertases e da SuSy, representada pela produção de açúcares redutores nos clones RRIM 600 e GT 1 (média dos clones), nos dois períodos. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 10 repetições. As letras comparam médias com base no teste de Tukey, a 5 % de probabilidade 41
- FIGURA 5. Atividade da Rubisco em $V_{INICIAL}$ (colunas claras) e V_{TOTAL} (colunas escuras), nos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, no período quente e chuvoso. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de cinco repetições. Letras minúsculas comparam médias de $V_{INICIAL}$, enquanto letras maiúsculas comparam médias de V_{TOTAL} , com base no teste de Tukey, a 5 % de probabilidade 44
- FIGURA 6. Atividade da SPS em V_{SEL} (colunas claras) e V_{MAX} (colunas escuras), nos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, no período quente e chuvoso. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de cinco repetições. Letras minúsculas comparam médias de V_{SEL} , enquanto letras maiúsculas comparam médias de V_{MAX} , com base no teste de Tukey, a 5 % de probabilidade 46
- FIGURA 7. Atividade conjunta das invertases e da SuSy, representada pela produção de açúcares redutores nos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, durante o período quente e chuvoso. As barras em cada coluna

indicam o erro padrão da média de cinco repetições. As letras comparam médias com base no teste de Tukey, a 5 % de probabilidade 47

FIGURA 8. Participação relativa das enzimas invertase ácida (IA), invertase neutra (IN) e SuSy na hidrólise de sacarose e produção de açúcares redutores, na casca de plantas dos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, no período quente e chuvoso. Em cada coluna horizontal, os números indicam valores absolutos (média de cinco repetições) da produção de açúcares redutores ($\mu\text{mol AR.g MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$), resultantes da ação de cada enzima, isoladamente. Letras maiúsculas na vertical, e letras minúsculas na horizontal, comparam médias pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade 48

RESUMO

CAIRO, Paulo Araquém Ramos. **Varição 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.) Muell.-Arg], em Lavras, MG.** Lavras: UFLA, 2007. 62 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O crescimento da heveicultura no Brasil se deu em função da demanda crescente do mercado de borracha natural. A fim de escapar dos prejuízos causados pelo “mal das folhas” – doença comum na região de origem da seringueira –, a expansão da heveicultura privilegiou regiões não tradicionais de cultivo no país. Em Minas Gerais, onde a heveicultura ainda é incipiente, estudos mais direcionados à fisiologia da seringueira podem fortalecer sua expansão. Estudos sobre clones cultivados em Lavras, MG, já investigaram uma possível associação entre a variabilidade fotossintética e o desempenho produtivo. Contudo, ainda são desconhecidas as informações sobre alguns aspectos metabólicos envolvidos com a biossíntese de látex, tais como os processos de assimilação de CO₂, o transporte de carbono a partir dos tecidos fonte e o atendimento à demanda por carboidratos nos drenos, onde a produção de látex é maior. Em todos esses processos, as reações metabólicas são reguladas diretamente pela ação decisiva de algumas enzimas chave. O presente trabalho teve o propósito de avaliar, em plantas de um jardim clonal de seringueira, identificadas como clones RRIM 600 e GT 1, a variação sazonal das condições ambientais e seus possíveis efeitos sobre a atividade da Rubisco e das principais enzimas que atuam no metabolismo de síntese e hidrólise de sacarose. Propôs-se também a averiguar, no período quente e chuvoso, a possibilidade de que essa atividade enzimática, incluindo a do clone FX 2261, tenha associação com o desempenho produtivo de plantas adultas e em franca produção, pertencentes a esses mesmos clones. Os resultados revelaram que a variação sazonal das condições ambientais pode provocar oscilações na atividade das enzimas Rubisco, SPS, invertases e SuSy, em seringueiras cultivadas em Lavras, MG. A atividade dessas enzimas nos clones avaliados (RRIM 600 e GT 1) foi mais elevada no período quente e chuvoso do que no período frio e seco. Nas condições em que o experimento se desenvolveu, a temperatura parece ter sido o fator ambiental que exerceu maior influência sobre a variação da atividade

¹Comitê Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira – UFLA (Orientador), Ângela Maria Soares – UFLA e Nelson Delú Filho – UNINCOR (Co-Orientadores).

enzimática. Em relação à maioria das enzimas avaliadas em plantas do jardim clonal, os resultados sugeriram uma possível associação entre a atividade da Rubisco, invertases e SuSy e o desempenho produtivo de plantas adultas e em franca produção. É pouco provável que este tipo de associação se aplique à atividade da SPS, cuja atividade foi semelhante, em todos os clones avaliados. A hidrólise de sacarose na casca foi exercida predominantemente pela ação da invertase ácida. Em proporções menores e equivalentes, essa atividade foi complementada pela ação da SuSy e da invertase neutra.

ABSTRACT

CAIRO, Paulo Araquém Ramos. **Seasonal variation of Rubisco and sucrose synthesis and hydrolisys enzymes activities in rubber trees [*Hevea brasiliensis* (Willd ex. ADR. de Juss.) Muell.-Arg], in Lavras, MG.** Lavras: UFLA, 2007. 62 p. Thesis (Doctorate in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.¹

The growth of rubber tree cultivation in Brazil has happened because of growing of natural rubber market. With aim to escape of “South American leaf blight” – a common disease in amazonian region – the rubber tree expansion has privileged no traditional regions in Brazil. In Minas Gerais, where rubber tree cultivation is still incipient, new researches about some physiological aspects can promote expansion of the cultivation. Late researches about rubber tree clones in Lavras – MG have investigated a possible association between photosynthetic variability and rubber productivity. Nevertheless, there is still no information about some metabolic aspects that are involved with latex biosynthesis, like CO₂ assimilation, carbon translocation from source tissues to attend carbohydrate requirement of sinks, where the latex production is highest. In all of these processes, the metabolic reactions are directly regulated by some key enzymes. The aim of this work was to evaluate, in rubber tree plants from a clonal garden, identified as RRIM 600 and GT 1 clones, the seasonal changes of environmental factors and their possible effects on the Rubisco activity and the most important enzymes of sucrose synthesis and hydrolisys metabolism. The work had still aim to observe, during the hot and raining season, if it is possible this enzymatic activity, including in FX 2261 clone, have association with the rubber productivity of adult plants, identified as the same clones from clonal garden. The results showed that the seasonal changes in environment can induce oscillations in Rubisco, SPS, invertases and SuSy enzyme activities, in rubber trees cultivated in Lavras-MG. The enzyme activities, in general, in the RRIM 600 and GT 1 clones, were higher in the hot and raining season than in the cold and drought season. Based on the experimental conditions, one can conclude that the temperature seems have been the most influent environmental factor on the enzymatic activity. In relation to the majority of enzymes evaluated in plants from clonal garden, the results suggested a possible association between Rubisco, invertases and SuSy activities and the latex productivity of adult plants.

¹Guidance Committee: Luiz Edson Mota de Oliveira – UFLA (Adviser), Ângela Maria Soares – UFLA and Nelson Delú Filho – UNINCOR (Co-Advisers).

This association, in relation to SPS, seems to be unlikely. The sucrose hydrolysis in bark tissues was conducted, predominantly, by the acid invertase activity. In less and equivalent proportions, the sucrose hydrolysis was complemented by the SuSy and neutral invertase activity.

1 INTRODUÇÃO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd ex. Adr. de Juss.) Muell.-Arg.] é uma espécie nativa da região amazônica, de origem mais específica no vale do Rio Amazonas. O cultivo da seringueira é justificado, principalmente, por ser esta uma planta produtora de borracha natural, produto largamente utilizado na fabricação de pneumáticos e de um grande número de manufaturados imprescindíveis à vida moderna.

Ao longo dos anos, a produção de borracha natural tem sofrido flutuações, enquanto o consumo interno tem crescido linearmente. Em 2005, a produção mundial de borracha natural foi de 8.682 mil toneladas, para um consumo de 8.742 mil toneladas (IRSG, 2006). No ano anterior, a produção, em mil toneladas, foi de 2.900 na Tailândia, 1.851 na Indonésia e 1.000 na Malásia, enquanto o Brasil produziu apenas 100, correspondendo a cerca de 1% da produção mundial (Rossman, 2006). A solução para minimizar os volumes de importação do produto na busca da auto-suficiência ou, até mesmo ocupar novamente uma posição de relevância na produção mundial, tem sido a expansão da heveicultura com base em seringais com produtividade elevada e látex de boa qualidade (Alvarenga et al., 2003).

As áreas de cultivo comercial da seringueira, definidas como de maior produtividade, situavam-se, inicialmente, entre as latitudes 6°N e 6°S (Pushparajah, 1983). Entretanto, o seu cultivo encontra-se atualmente distribuído entre as latitudes 22°N (China) e 23°S (São Paulo), o que evidencia a sua adaptabilidade a uma ampla variação climática. No Brasil, as regiões tradicionais de cultivo da seringueira são a Amazônia Tropical Úmida, Mato Grosso e Bahia.

O aumento da demanda por borracha natural, associado ao fato de a região de cultivo tradicional de seringueira ser um hábitat do fungo *Microcyclus ulei* P. Henn V. Arx. – causador do “mal sul-americano das folhas” e principal entrave para o desenvolvimento da heveicultura nas regiões tradicionais de cultivo (Albuquerque, 1978; Rocha Neto, 1979) –, induziu à expansão da heveicultura nos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Maranhão, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, que são regiões cujas condições climáticas são desfavoráveis ao desenvolvimento do fungo. A exploração da heveicultura nesses estados – áreas não tradicionais – revelou-se uma atividade economicamente viável, devido ao desenvolvimento de clones agronomicamente produtivos, mais tolerantes a doenças e com alta adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas.

Segundo informações divulgadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC, 2006), o estado de São Paulo, que registrou produção de 51.450 toneladas de borracha natural em 2005, é o maior produtor nacional, respondendo por 51 % da produção brasileira. Em seguida, estão os estados de Mato Grosso (22%), Bahia (9%) e Espírito Santo (7%), sendo que a produção dos demais estados corresponde a 12% da produção nacional.

No estado de Minas Gerais, a heveicultura encontra-se modestamente instalada em algumas regiões, tais como o Sul de Minas, Triângulo Mineiro, Zona da Mata, Alto do São Francisco e Vale do Rio Doce, constituindo uma área pouco superior a 4.000 ha, dos quais apenas 2.818 hectares estão em fase de produção (IBGE, 2003; Eboli, 2006). Segundo Mesquita (2006a), a produtividade máxima anual dos seringais mineiros é de 1.500 kg/ha, sendo superior às médias anuais de tradicionais países produtores, tais como Tailândia (1.100 kg/ha), Indonésia (750 kg/ha) e Malásia (1.000 kg/ha).

Existem muitos clones de *Hevea* que foram gerados com a finalidade de se obter melhor adaptação a diferentes condições ambientais. Produção de

borracha, produção de biomassa e tolerância a doenças e pragas foram algumas das características mais exploradas na geração desses clones. Além dessas, a caracterização de alguns aspectos fisiológicos também deve ser considerada importante para direcionar estratégias futuras de melhoramento. Para que a expansão e o fortalecimento da heveicultura em Minas Gerais sejam bem sucedidos, é necessário, entre outras iniciativas, o aprofundamento de estudos sobre aspectos fisiológicos da seringueira, associados à produção de látex, com o propósito de contribuir para uma melhor compreensão do potencial adaptativo dos clones à variabilidade ambiental de diversas regiões do estado.

A seringueira pode ser considerada como um sistema produtivo composto por folhas, que são responsáveis pela produção de fotoassimilados, e por outros órgãos (folhas, raízes, caule e ramos, flores, frutos), que são consumidores desses assimilados, pelo menos em uma parte de sua vida. A biossíntese de látex é o resultado de uma complexa cadeia de eventos biofísicos, nutricionais e metabólicos que estão relacionados com a variação das condições climáticas, produção e transporte de fotoassimilados, disponibilidade de carboidratos de reserva e demanda por outros tecidos drenos das árvores.

A utilização do látex como principal objetivo de exploração econômica da seringueira induz à formação de drenos não convencionais na região do caule, onde são feitas as sangrias. A partir da abertura do painel da seringueira, com as sangrias frequentes, o sistema de assimilação e transporte de carbono passa a ser estimulado, devido à necessidade de atender à demanda de carboidratos para a biossíntese renovada de látex nos locais onde se processa a sua remoção periódica. Se não houvesse a exploração do látex, pelo homem, provavelmente a região do caule somente se caracterizaria como dreno – natural, e não induzido – quando os tecidos estivessem em fase de expansão.

Na maioria das plantas de importância agrícola, há uma hierarquia natural de órgãos que atuam como drenos na utilização dos assimilados

provenientes da fotossíntese, realizada nos órgãos fonte. Entretanto, nas plantas lenhosas, a natureza sazonal do seu desenvolvimento ocasiona, em maior ou menor intensidade, uma superposição de utilização desses assimilados, por diversos órgãos em crescimento (Wardlaw, 1990). No caso da seringueira, essa partição de assimilados é ainda mais complexa, pela competição entre o dreno artificial, imposto pela sangria, e os drenos naturais da planta (Tupy, 1988).

Os estudos desenvolvidos por Mesquita (2004), em seringueira, estão entre os primeiros realizados com o propósito de estabelecer associações entre o comportamento produtivo e alguns caracteres fisiológicos e anatômicos de plantas dos principais clones cultivados na cidade de Lavras, no Sul de Minas Gerais. Seus resultados sugerem que as diferenças de produtividade entre os clones podem ter relação com características fisiológicas e bioquímicas do sistema fonte-dreno, associadas tanto aos processos de assimilação e transporte de carbono, como à utilização de assimilados na biossíntese de borracha natural.

Algumas características morfológicas das folhas que compõem o sistema fotossintético, tais como a disposição arquitetônica da parte aérea, o tamanho das folhas, a área foliar total, etc., são muito importantes para se determinar a força da fonte em relação à sua capacidade de assimilação de carbono. Além disso, é importante observar que a força da fonte também é influenciada pela eficiência de carboxilação do sistema fotossintético. Pesquisas desenvolvidas por Miguel (2005) e Miguel et al. (2007) sugeriram que, em seringueiras cultivadas na cidade de Lavras, MG, os elevados valores de fotossíntese líquida ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) do clone RRIM 600 podem estar associados, provavelmente, às altas produções de borracha natural deste clone, de acordo com os trabalhos sobre comportamento produtivo realizados por Oliveira (1999), Lima et al. (2002) e Mesquita (2004). Entretanto, os estudos de Miguel (2005), realizados no clone RRIM 600 e em outros clones, dentre os quais, o GT 1 e o FX 2261, abordaram as variações sazonais de fotossíntese líquida apenas nos aspectos

relacionados às trocas gasosas e à eficiência fotoquímica dos fotossistemas. Assim, permanecem escassas as informações acerca dos aspectos bioquímicos que envolvem não apenas a assimilação de CO₂, como também o transporte de carbono a partir dos locais de síntese primária de carboidratos simples (fontes) e o consumo dos assimilados nos órgãos que os utilizam como precursores da biossíntese de látex (drenos).

Após a absorção de CO₂ pelas plantas, a sua assimilação se dá por meio de uma seqüência metabólica, em que a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (Rubisco) se destaca como enzima responsável pela reação de carboxilação, com participação decisiva no processo de assimilação de CO₂. Em seringueira, a ação da Rubisco ainda é muito pouco estudada. Ainda não se sabe, por exemplo, em que medida a sua atividade pode ser influenciada pela variação das condições ambientais, em diferentes estações do ano. Pela mesma razão, são escassas as informações acerca da possibilidade de que a atividade da Rubisco tenha associação com o desempenho produtivo de diferentes clones, tendo em vista o seu papel na eficiência de carboxilação e, conseqüentemente, na variabilidade fotossintética entre clones.

Depois de ocorrer, nas folhas, a síntese primária de carboidratos simples, é necessário que estes sejam transportados para os drenos. Devido a limitações de natureza química para o transporte no floema, os carboidratos simples, que têm caráter redutor, devem ser convertidos a sacarose. Por esta razão, a síntese de sacarose é uma reação que precede o carregamento do floema. A sacarose-P sintase (SPS) é a principal enzima envolvida nessa síntese de sacarose nas folhas. Na literatura, não há qualquer registro de informações sobre a atividade da SPS em seringueira. Existe, portanto, uma ampla demanda de estudos que abordem a atividade desta enzima e sua possível associação com as variações ambientais e o desempenho produtivo dos clones.

Nas células laticíferas do caule, onde ocorre o descarregamento do floema, a sacarose é hidrolisada, por intermédio da ação catalisadora das enzimas invertase (e suas diferentes isoformas) e sacarose sintase (SuSy), produzindo glicose e frutose. A hidrólise enzimática da sacarose é considerada o ponto de partida para a biossíntese do látex. As enzimas sacarolíticas assumem papel importante como reguladores metabólicos desse processo, uma vez que a sua ação produz hexoses para atender à demanda metabólica de biossíntese de látex. Apesar disso, abordagens sobre a variação ambiental nas diferentes épocas do ano e seus possíveis efeitos sobre a atividade das invertases e da SuSy, em seringueira, ainda são escassas na literatura. Estudos anteriores (Mesquita, 2004; Mesquita et al., 2006b) buscaram estabelecer correlação entre a atividade dessas enzimas no látex e o desempenho produtivo de alguns clones cultivados em Lavras, MG. Em tecidos da casca, contudo, ainda se conhece muito pouco sobre alguma possível associação entre essas variáveis.

Em seringueira, os estudos sobre a atividade das invertases e SuSy – em geral, avaliada no látex – utilizam o método de ensaios “in vitro” (Oliveira, 1999; Mesquita, 2004; Mesquita et al., 2006b). Esse método, quando aplicado em tecidos vegetais, suscita dúvidas quanto à sua confiabilidade, devido aos valores muito baixos encontrados para a atividade enzimática. O ensaio “in vivo” pode constituir uma alternativa para se obter valores mais expressivos na avaliação da atividade das invertases e da SuSy em seringueira, uma vez que o material vegetal é adicionado diretamente ao meio de incubação.

Em face do exposto, formulou-se, aqui, a hipótese de que tanto o metabolismo de assimilação de CO₂ quanto os metabolismos de síntese e hidrólise de sacarose no sistema fonte-dreno, em seringueira, sofrem influência da variação sazonal das condições ambientais. Considera-se também a hipótese de que a intensidade com que esses metabolismos se processam em diferentes clones pode ter associação com os seus respectivos desempenhos produtivos.

Com o intuito de testar a viabilidade destas hipóteses, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, em plantas de seringueira oriundas de um jardim clonal localizado em Lavras, MG, pertencentes aos clones RRIM 600 e GT 1, a variação sazonal das condições ambientais dos períodos quente e chuvoso, e frio e seco, e seus possíveis efeitos sobre a atividade da Rubisco e das principais enzimas que atuam no metabolismo de síntese e hidrólise de sacarose. Propôs-se também a averiguar, no período quente e chuvoso, a possibilidade de que essa atividade enzimática, incluindo a do clone FX 2261, tenha associação com o desempenho produtivo de plantas adultas e em franca produção, pertencentes a esses mesmos clones.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A produtividade das plantas pode depender tanto da quantidade de carbono fixado na fonte, como da intensidade com que ele pode ser exportado e utilizado pelos drenos. A produção vegetal pode, portanto, ser limitada pela fonte ou pelo dreno – ou por ambos. Durante muitos anos, admitiu-se que sacarose e glicose agiam como inibidores da fotossíntese, mas pensava-se que isso era devido mais ao estresse osmótico do que a um efeito direto dos açúcares. Mais tarde, demonstrou-se que os açúcares também reprimem a expressão de genes fotossintéticos (Rolland et al., 2002).

Em seringueira, têm-se empreendido consideráveis esforços, por meio de melhoramento e seleção de clones, no intuito de aumentar a produtividade da borracha natural, e assim atender à demanda crescente do mercado. É comum haver variabilidade fotossintética em clones de seringueira (Samsuddin et al., 1987; Dey et al., 1995; Nugawela et al., 1995; Nataraja & Jacob, 1999; Miguel, 2005; Miguel et al., 2007). Estudos realizados por Miguel (2005), com enfoque nas respostas fotossintéticas das plantas de um jardim clonal de seringueira, nas condições ambientais de Lavras (MG), mostraram que os valores de fotossíntese líquida ($\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) dos clones RRIM 600 e GT 1 foram superiores aos valores encontrados para o clone FX 2261. Os valores obtidos para a transpiração foram semelhantes nesses três clones na estação quente e chuvosa, mas na estação fria e seca foram maiores nos clones RRIM 600 e GT 1 e inferiores no clone FX 2261. Não foram registradas diferenças significativas entre os valores de condutância estomática dos três clones, em todas as estações. Estes resultados obtidos por Miguel (2005) sugerem que as causas da variabilidade fotossintética entre os clones podem não ter origem no fator estomático ou trocas gasosas.

Em geral, os pesquisadores têm encontrado uma correlação positiva entre a fotossíntese e o potencial para a produtividade de borracha natural, embora Samsuddin et al. (1987) tenham registrado valores modestos para esse tipo de correlação. Dentre os clones estudados por Miguel (2005), RRIM 600 e GT 1 estão entre os que apresentaram os maiores valores de fotossíntese líquida. Entretanto, seus estudos não abordaram a possibilidade de ocorrência de uma correlação entre a fotossíntese das plantas do jardim clonal e o comportamento produtivo de plantas adultas desses mesmos clones.

Estudos mais direcionados aos aspectos bioquímicos dos processos de assimilação de CO₂ e transporte de carbono poderiam esclarecer melhor a relação entre fotossíntese e produtividade. Em espécies como trigo e milho, estudos comparativos entre genótipos revelaram que a variabilidade genética no comportamento das enzimas envolvidas nos processos de assimilação de CO₂ e transporte de carbono da fonte para os drenos podem ter relação com o crescimento e a produtividade vegetal (Austin et al., 1982; Rocher et al., 1989). Entretanto, estudos com esta abordagem ainda não foram realizados com seringueira.

2.1 Rubisco e a assimilação de CO₂

A variabilidade de respostas fotossintéticas entre espécies e cultivares pode ter origem nas reações bioquímicas de assimilação de CO₂. Entretanto, os aspectos bioquímicos da assimilação de CO₂, especialmente no que diz respeito ao comportamento da Rubisco, e sua influência sobre as respostas fotossintéticas em seringueira – e em seus diversos clones – são temas dos quais ainda se conhece muito pouco.

A Rubisco (EC 4.1.1.39) catalisa a fixação de CO₂ no ciclo de Calvin. Pelo seu envolvimento no processo de carboxilação, admite-se que ela controla a fotossíntese. Entretanto, tem uma baixa taxa de catálise e uma taxa líquida de

carboxilação *in vivo* reduzida, devido à sua baixa afinidade por CO₂ (em comparação com a PEP carboxilase). Além disso, devido à dupla função da enzima, a reação de carboxilação compete com a ação oxigenase da Rubisco. Assim, as plantas chegam a alocar até 50% de todo o nitrogênio foliar em favor da síntese de Rubisco, fazendo com que esta enzima se constitua na proteína mais abundante em todo o mundo (Ellis, 1979). Para compensar a sua baixa eficiência no processo de carboxilação, altas concentrações de ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP) são mantidas na folha durante a fotossíntese (Spreitzer & Salvucci, 2002). Apesar de sua reputação como uma enzima de ação lenta e de baixa eficiência, estima-se que, globalmente, existem cerca de 5 a 10 kg de Rubisco para cada pessoa, e que a cada ano esta enzima reage com 15% de todo o “pool” de CO₂ existente na atmosfera (Griffiths, 2006).

A Rubisco tem sido objeto de muitos estudos, por causa do controle que ela exerce sobre a fotossíntese, sob várias condições de estresse ambiental. A intensidade de carboxilação pode ser alterada, tanto por mudanças na quantidade desta enzima como na modulação de sua atividade. A sua atividade carboxilase é modulada por carbamilação – presença de CA1P (2-carboxi-D-arabinitol-1-fosfato) – reversível de lisina 201 nas subunidades catalíticas da enzima. O CA1P é um importante regulador da atividade da Rubisco, que tem sido detectado em extratos de algumas espécies (Mizioroko & Lorimer, 1983). À noite, este composto se liga fortemente ao sítio ativado da Rubisco, inibindo a atividade da enzima, de maneira que a atividade da Rubisco, extraída dessas folhas, chega a ser de apenas 10% do valor normal. Quando a folha é iluminada, o nível de CA1P é reduzido ao seu valor normal, que depende da intensidade de iluminação (Mizioroko & Lorimer, 1983; Woodrow & Berry, 1988; Parry et al., 2003).

O significado da presença de CA1P ainda é motivo de controvérsias. Ele pode ser considerado um regulador da atividade enzimática sob baixa

luminosidade, mas pode ser mais importante como protetor da Rubisco contra a degradação por proteases (Khan et al., 1999), quando o substrato natural, a RuBP, está presente em baixas concentrações. A extensão da carbamilação depende das concentrações de CO₂ e Mg⁺², da presença ou não de certos compostos fosforilados (particularmente RuBP) e da atividade da enzima Rubisco ativase (Parry et al., 2003).

Alguns outros mecanismos de regulação podem ser efetivados, além desse mecanismo básico. Os mais importantes são: (1) ativação dependente de luz, pela Rubisco ativase; e (2) modulação por metabólitos do estroma, tais como açúcares fosfatados, fosfato inorgânico e amido (Sawada et al., 2003).

O efeito da carbamilação na atividade carboxilase da Rubisco é determinado pela extensão em que sua atividade, medida imediatamente em extratos preparados rapidamente no frio, é menor que a atividade medida em seguida à incubação, com concentrações saturadas de CO₂ e de íons Mg⁺² para lisina carbamilato, nos sítios catalíticos vagos. Essas medições são chamadas de “atividade inicial” (V_{INICIAL}) e “atividade total” (V_{TOTAL}), respectivamente. O termo “atividade total” pode ser avaliado como uma designação de alcance limitado, uma vez que ele não inclui sítios bloqueados por inibidores, a exemplo de CA1P, que não é removido por incubação com CO₂ e íons Mg⁺² (Parry et al., 1997). Por esta razão, admite-se que as medições de V_{TOTAL} podem subestimar a atividade potencial da Rubisco ativada, não inibida. Enquanto a diferença entre V_{INICIAL} e V_{TOTAL} da Rubisco expressa uma medida da regulação por carbamilação, as mudanças na sua atividade total podem ser atribuídas à regulação por CA1P ou inibidores similares (Sawada et al., 2003).

Pela sua ação reguladora na fotossíntese, a Rubisco pode ser reconhecida como um dos fatores passíveis de manipulação genética, com vistas ao aumento do rendimento da produção vegetal (Mann, 1999). Alguns trabalhos, inclusive, investigaram o comportamento da Rubisco como uma possível base

bioquímica, capaz de justificar diferenças em crescimento e produtividade (Nelson, 1988; Rocher et al., 1989). Os resultados demonstraram, contudo, que nem sempre ocorre correlação positiva entre a fotossíntese e a produção ou o crescimento. Mesmo quando tal correlação ocorre, nem sempre ela se aplica totalmente à atividade da Rubisco. A produção e o crescimento, para que ocorram, dependem de que os fotoassimilados sejam efetivamente investidos nesses processos (Stitt & Schulze, 1994).

2.2 SPS e a síntese de sacarose

A sacarose exerce um papel central nas plantas superiores, como transporte, armazenamento e sinalizador molecular. Sua síntese ocorre originalmente nas folhas, como um dos produtos finais primários da fotossíntese. Durante o dia, o substrato para a biossíntese de sacarose são as trioses-fosfato, que são liberadas do cloroplasto, em troca por fosfato inorgânico. À noite, a utilização de amido fornece o substrato para a biossíntese de sacarose, na forma de glicose, derivada da degradação amilolítica do amido (Schleucher et al., 1998).

A biossíntese de sacarose é catalisada predominantemente pela ação seqüencial das enzimas SPS e sacarose-6-P fosfatase (SPPase). A rápida remoção de sacarose-6-P por uma fosfatase específica e de alta afinidade – a SPPase – leva a SPS a exercer um controle mais efetivo sobre o fluxo que leva à formação de sacarose (Huber & Huber, 1996).

A biossíntese de sacarose também pode ocorrer por ação de outra enzima, a SuSy. Entretanto, alguns argumentos explicam as razões por que esta enzima, cuja ação é considerada bastante modesta nas reações de síntese de sacarose, atua de forma mais expressiva no sentido inverso, o da hidrólise de sacarose (ver item 2.3).

A SPS (EC 2.4.1.14) é uma enzima ativada alostericamente por glicose-6-P e inibida por fosfato inorgânico (Huber & Huber, 1996; Lun & MacRae, 2003). Por esta razão, a atividade da SPS é sempre medida sob duas diferentes condições: (1) o ensaio “seletivo”, que contém concentração limitante de substrato, acrescido de Pi, no qual se mede a atividade em velocidade seletiva (V_{SEL}); e (2) o ensaio “não seletivo”, que contém concentração de substrato próxima à saturação, na ausência do inibidor Pi, no qual se mede a atividade em velocidade máxima (V_{MAX}). O “estado de ativação” da enzima é definido como a atividade em V_{SEL} , que se expressa como uma porcentagem da atividade em V_{MAX} , refletindo o estado de fosforilação da enzima (Winter & Huber, 2000).

A SPS é uma proteína pouco abundante (<0,1% da proteína solúvel encontrada nas folhas), além de ser relativamente instável (Huber & Huber, 1996). A sua importância na biossíntese de sacarose tem sido confirmada por meio da genética molecular, em estudos voltados para a manipulação desta enzima. Aumentos moderados na expressão da SPS podem resultar em elevação das taxas de crescimento e da produção (Laporte et al., 2001).

A atividade da SPS tem sido bem correlacionada com a produção em algumas espécies, tais como milho (Sarquís et al., 1998), cana-de-açúcar (Grof et al., 1998) e beterraba (Pavlinova et al., 2002). Em tomate, a expressão de genes de SPS obtidos de milho resultou na superexpressão dessa enzima em folhas e acelerou a síntese e a exportação de sacarose. Tais resultados foram acompanhados de um estímulo ao crescimento e à formação de um número maior de frutos (Worrell et al., 1991; D’Aoust et al., 1999). A superexpressão de SPS em tomate resultou também em aumento da relação sacarose/amido em folhas e em maior capacidade fotossintética, indicando que a SPS é um importante ponto de controle da fotossíntese, particularmente sob condições de alta concentração de CO_2 e saturação de luz (Micallef et al., 1995; Laporte et al., 2001). Inversamente, reduções na expressão de SPS em folhas de batata

resultaram na inibição da síntese de sacarose e no aumento do fluxo de carbono a amido e aminoácidos (Winter & Huber, 2000). Em algumas espécies de plantas lenhosas, estudos têm demonstrado correlação positiva entre a atividade da SPS e o crescimento cambial e formação do cerne, no tronco (Hauch & Magel, 1998; Magel et al., 2001; Schrader & Sauter, 2002). Apesar dos avanços proporcionados por essas pesquisas, que correlacionam a atividade da SPS e a produção, ainda não há informações, na literatura, que demonstrem a existência de correlação entre a atividade da SPS e a produção de látex em seringueira.

Após ser sintetizada, a sacarose é exportada a partir das folhas, para suprir o restante da planta com carbono e energia, requeridos tanto para o crescimento como para o armazenamento de reservas (Lunn & Furbank, 1999), numa trajetória que tem início com o carregamento do floema. As propriedades físico-químicas da sacarose, incluindo a sua baixa viscosidade em soluções concentradas e a sua estabilidade química, na condição de um dissacarídeo não redutor, são propriedades-chaves que fazem da sacarose um composto ideal para o transporte a longa distância (Ward et al., 1998). O caráter não-redutor da molécula de sacarose é o principal motivo que explica a sua larga distribuição e utilização nas plantas superiores. Trehalose, o único outro dissacarídeo não-redutor encontrado na natureza, exerce um papel comparável ao da sacarose, mas em insetos e fungos (Huber & Huber, 1996).

2.3 Hidrólise enzimática de sacarose

Existem duas rotas alternativas para a degradação de sacarose em plantas. Uma dessas rotas envolve a hidrólise irreversível de sacarose a glicose e frutose, via invertase (EC 3.2.1.26), que é uma enzima que possui um baixo K_m para sacarose (7 a 15 mM) (Avigad, 1982). Após esta etapa, ocorre uma fosforilação de glicose e frutose, em reações catalisadas por várias hexoquinases

e frutoquinases (Renz & Stitt, 1993), usando ATP ou UDP como doadores de energia. A outra rota sacarolítica, exclusiva de plantas, é catalisada pela SuSy (EC 2.4.1.13) e envolve uma clivagem de sacarose dependente de UDP, produzindo UDP-glicose e frutose. O K_m da SuSy para a sacarose é relativamente alto (40 a 200 mM) e a atividade da enzima é limitada pelas concentrações de sacarose e UDP no citosol (Avigad, 1982; Loeff et al. 1999).

A primeira etapa para a utilização da sacarose é a sua clivagem, por meio das enzimas invertase ou SuSy, resultando na produção de hexoses – glicose ou UDP-glicose, respectivamente –, que são fonte de energia essencial, seja para o acúmulo de diferentes produtos a serem armazenados, seja para atender à demanda de crescimento de tecidos. Embora invertase e SuSy sejam envolvidas na clivagem de um mesmo substrato – sacarose –, a participação de cada uma dessas enzimas nos diversos processos que levam ao crescimento e desenvolvimento de plantas se dá de forma diferenciada.

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

envolvida na degradação de sacarose, quando as atividades da invertase ácida e da SuSy são baixas (Copeland, 1990).

Muito provavelmente, as invertases convertem sacarose a hexoses com o objetivo de fornecer substrato para a respiração celular. A invertase ácida vacuolar parece controlar a rota primária de degradação de sacarose em tecidos em expansão (Winter & Huber, 2000) e em tecidos maduros (Copeland, 1990). A clivagem de sacarose, formando glicose e frutose, pode diminuir significativamente o potencial osmótico das células, sugerindo uma possível função das invertases no alongamento celular e no crescimento de plantas (Sturm & Tang, 1999; Koch, 2004).

As invertases fornecem hexoses para o metabolismo celular (Hubbard et al., 1989; Yelle et al., 1991), mas também participam no controle do crescimento, na diferenciação celular, além do desenvolvimento de sementes e embrião. São enzimas com potencial para agir fortemente como controladores de uma ampla variedade de processos, tais como biossíntese e percepção de hormônios, a exemplo do ácido abscísico. Além disso, tanto os sensores de açúcares como os de hormônios podem afetar a própria expressão dos genes que codificam a invertase e a SuSy (Koch, 1996; Trouverie et al., 2003).

Desde a sua descoberta por Leloir e colaboradores, em 1955 (Cardini et al., 1955), a SuSy tem sido reconhecida como uma enzima 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). Além disso, sabe-se que a SuSy participa das reações que degradam a sacarose visando à produção de amido em numerosos tecidos (Pozueta-Romero et al., 1999), na síntese do precursor de celulose UDP-G (Chourey & Miller, 1995), na fixação biológica de nitrogênio em nódulos (Gordon et al., 1999) e é diretamente envolvida em alterações metabólicas

causadas por estresse de frio e anaerobiose. Sua plasticidade funcional é, provavelmente, devido à sua capacidade de utilizar vários nucleosídeos, à sua reversibilidade catalítica e à sua compartimentalização celular diversa (Etxeberria & Gonzalez, 2003).

As duas vias de degradação de sacarose a hexoses fosfatadas diferem em relação aos seus custos energéticos. Enquanto a clivagem de sacarose por ação da invertase requer duas moléculas de ATP, a clivagem via SuSy e UGPase (UDPglicose pirofosforilase) requer apenas uma molécula de PPi (pirofosfato inorgânico) (Geigenberger, 2003). O custo total de energia da via SuSy é ainda menor, se considerarmos que esta rota metabólica recicla PPi, que é produzido como um excedente em muitas reações biossintéticas (Bologa et al., 2003).

Em geral, admite-se que a atividade da SuSy é relacionada predominantemente com a síntese de parede celular e de amido (Winter & Huber, 2000), mas também pode estar associada com a síntese de sacarose. Apesar de a reação catalisada pela SuSy ser reversível, 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. Em segundo lugar, em alguns tecidos, a atividade da invertase 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, na fase de armazenamento de reservas, em que as invertases ácida e alcalina têm atividades tão baixas que a SuSy parece assumir quase integralmente a clivagem da sacarose, com vistas à formação de amido (Hajirezaei et al., 2000). Em milho, estudos realizados com sementes de

mutantes desta espécie revelaram que uma redução dos níveis de SuSy em endosperma em desenvolvimento restringe a capacidade desse tecido de metabolizar sacarose (Boyer, 1985).

As invertases mediam a iniciação e a expansão das estruturas da maioria dos novos drenos, sempre com a atividade vacuolar precedendo à da parede celular (Koch, 2004). Em seringueira, ainda são escassas as informações acerca da intensidade relativa de atuação das invertases ácida e neutra, seja nas células dos drenos que caracterizam os tecidos em expansão, seja nas células que constituem os anéis laticíferos. No látex, sabe-se que a atividade da invertase neutra é bastante superior à da ácida vacuolar, o que pode ser atribuído ao pH levemente alcalino do látex (Mesquita et al., 2006b).

A sacarose, juntamente com pequenas quantidades de rafinose, é o único açúcar contido no látex de seringueira (Moraes et al., 1978). De maneira geral, a sacarose é considerada a substância fundamental do metabolismo celular e mais especificamente do metabolismo de isoprenóides. A demonstração da importância da disponibilidade de sacarose nos laticíferos, como substrato para a síntese de borracha, tem sido evidenciada em vários trabalhos (Moraes et al., 1978; Ho, 1988; Tangpakdee et al., 1997). Após a hidrólise da sacarose, as hexoses produzidas atuam como moléculas precursoras da síntese de isoprenóides, sendo a borracha a principal substância de caráter isoprenóide do látex.

Existe a hipótese de que, ainda no citosol, as hexoses resultantes da clivagem da sacarose poderiam voltar a se unir, produzindo novas moléculas de sacarose-P (reação catalisada pela enzima SPS), seguidas de sua conversão a sacarose (reação catalisada pela SPP). De acordo com esta hipótese, a sacarose-P seria transferida, em seguida, para o vacúolo, podendo ser ali armazenada em sua forma original, ou clivada, produzindo glicose e frutose. Entretanto, Kruger (1993) considera essa hipótese pouco provável, por entender que as vias de

produção de sacarose são praticamente restritas aos tecidos fotossintéticos, sendo de pouca ocorrência em tecidos-drenos. Além disso, a própria sacarose pode ser transferida, sem clivagem, do apoplasto até o vacúolo.

2.4 Efeitos da variação ambiental sobre a atividade enzimática

Sob temperaturas reduzidas, o crescimento e a exportação de carbono a partir das folhas sempre declinam mais do que a fotossíntese (Martindale & Leegood, 1997), resultando no acúmulo de carboidratos, que pode inibir a síntese de sacarose (Hurry et al., 1995). Em curto prazo, a síntese de sacarose também é restrita sob baixa temperatura, por causa da alta sensibilidade da SPS a variações de temperatura (Pérez et al., 2001).

A inibição da síntese de sacarose, causada pela redução da temperatura, leva a uma restrição na reciclagem de fosfato e na fotofosforilação (Labate et al., 1990). Isso ocorre porque a capacidade máxima de utilização de trioses fosfato (triose-P) é dependente da temperatura (Sage & Sharkey, 1987) e a demanda do cloroplasto por fosfato aumenta sob baixa temperatura (Leegood & Walker, 1983). Restrições na utilização de triose-P podem desencadear mecanismos de “feedback”, que reduzem as taxas de transporte eletrônico fotossintético e limitam o suprimento de ATP, necessário à regeneração de RUBP (Pammenter et al., 1993). Tais desdobramentos limitam a ação da Rubisco, que passa a apresentar menor eficiência de carboxilação, reduzindo a taxa de assimilação de carbono fotossintético (Sundar & Reddy, 2000).

Savitch et al. (1997) submeteram cultivares de trigo a uma variação de temperatura ambiente de 20°C para 5°C. Os autores observaram, sob 5°C, limitações à fotossíntese por “feedback”, indicada por redução de 50 a 60% na taxa de assimilação de CO₂, razão ATP/ADP duas vezes menor e taxa de transporte eletrônico três vezes menor do que nas plantas mantidas sob 20°C. Entretanto, não encontraram evidências de limitações na ação da Rubisco.

O tempo de exposição à baixa temperatura pode produzir respostas diferenciadas na atividade da Rubisco e da SPS. Sundar & Reddy (2000) observaram o comportamento dessas enzimas em plantas de *Parthenium argentatum* Gray expostas à temperatura noturna de 15°C, durante 60 dias. Nos primeiros 30 dias, a baixa temperatura noturna reduziu a fotossíntese líquida, com o paralelo declínio da atividade da Rubisco e da SPS. No restante do período de observação, a fotossíntese líquida retornou às taxas normais, com o aumento da atividade das referidas enzimas.

Restrições à fotossíntese, em plantas sob deficiência hídrica, causadas por limitações metabólicas, são mais complexas do que quando causadas por limitações estomáticas. Alterações no metabolismo celular de carbono, provavelmente, antecedem o processo de desidratação (Reddy et al., 2004). A seca, geralmente, reduz a capacidade bioquímica para assimilação e utilização de carbono. A taxa de fotossíntese depende tanto da atividade da Rubisco quanto da síntese de RuBP (Parry et al., 2002). A quantidade de Rubisco limita a fotossíntese em muitos casos, embora, em alguns casos, a regeneração de RuBP seja mais limitante à capacidade fotossintética (Reddy et al., 2004). A quantidade de Rubisco nas folhas é controlada pela taxa de síntese e degradação da enzima, mesmo sob estresse ambiental. Perdas de atividade da Rubisco têm sido reportadas em algumas plantas sob deficiência hídrica, nas quais se verificam, também, um declínio na atividade da enzima Rubisco ativase (Chaves et al., 2002) e um aumento da ação inibitória do CA1P (Parry et al., 2002).

Sabe-se também que as limitações causadas às reações do ciclo de Calvin, sob deficiência hídrica, se devem a reduções parciais das atividades de outras enzimas envolvidas com esse ciclo (Reddy et al., 2004). A seca causa alterações na relação entre as concentrações de sacarose e amido nas folhas. Sob potenciais hídricos reduzidos, a atividade da SPS declina, indicando que a taxa de síntese de sacarose é fortemente influenciada pelo estresse hídrico (Haupt-

Herting & Fock, 2002). A inibição da atividade da SPS pode regular tanto a síntese de sacarose e amido quanto a sua participação, sob deficiência hídrica. A alteração na relação amido/sacarose, certamente, causa mudanças no fluxo de Pi através da membrana do cloroplasto. Reduzidos níveis de Pi nos cloroplastos inibem a síntese de ATP que, por sua vez, tem grande impacto sobre a fosforilação e as reações do ciclo de Calvin (Tezara et al., 1999).

A variação sazonal da atividade invertásica no látex foi verificada por Yeang et al. (1984) que observaram redução na atividade desta enzima nos meses de temperaturas mais baixas. Segundo Devakumar et al. (1988), o estresse causado por períodos frios e secos deve induzir mudanças bioquímicas que levam a uma menor estabilidade dos lútoídes, ocasionando maior obstrução ao fluxo de látex, reduzindo a produção de borracha natural. A atividade invertásica pode ser correlacionada negativamente com a facilidade de obstrução dos vasos laticíferos, contribuindo para uma produtividade menor em períodos frios (Tupy, 1973).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho constituiu-se da realização de um experimento com plantas de seringueira, cultivadas num jardim clonal da área experimental do Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A área experimental é localizada no município de Lavras, região Sul do estado de Minas Gerais, situado a 21°15' de latitude Sul e 45°00' de longitude Oeste de Greenwich, com 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).

Os dados referentes às temperaturas máxima, mínima e média do ar e à precipitação, registrados durante o período experimental, foram obtidos junto à Estação Meteorológica Principal de Lavras, a qual se localiza a cerca de 300 m da área experimental.

O experimento foi realizado no ano de 2006. Numa parte do trabalho, avaliaram-se a variação das condições ambientais do período quente e chuvoso (entre os meses de janeiro e março) e do período frio e seco (nos meses de junho e julho) e seus possíveis efeitos sobre a atividade das enzimas Rubisco, SPS, invertases e SuSy. Na outra parte do trabalho, avaliaram-se, no período quente e chuvoso, a possível associação entre a atividade enzimática das plantas do jardim clonal e o desempenho produtivo de plantas adultas e em franca produção, pertencentes aos mesmos clones avaliados no jardim clonal.

3.1 Variação sazonal da atividade enzimática

Para este estudo, foram avaliadas plantas dos clones RRIM 600 e GT 1. Em cada clone, cinco plantas foram selecionadas, com base na uniformidade de

tamanho e aspecto vegetativo. No início do experimento, as brotações das plantas do jardim clonal apresentavam altura média aproximada de 3 m, a partir do solo.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, em fatorial 2 x 2 (clones x épocas) e cinco repetições (plantas). Com o intuito de expressar uma ampla representatividade das características climáticas de cada período, os dados referentes à atividade de cada enzima, em cada repetição, foram obtidos a partir de uma média de seis datas de coletas no período quente e chuvoso, e de quatro datas de coletas no período frio e seco. Em cada período, as coletas de material vegetal foram realizadas em intervalos de duas semanas. A análise de variância foi feita com base na comparação de médias, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.1.1 Obtenção de material vegetal para as análises enzimáticas

O material vegetal utilizado foi constituído de amostras (discos) de folhas e casca, cujas coletas foram realizadas sempre no mesmo horário (entre 10 e 11 horas). Foram coletadas folhas completamente expandidas – “estádio D”, conforme descrição de Hallé et al. (1978) – e posicionadas na copa em exposição direta à radiação, no sentido nascente do sol.

Os discos de folhas e de casca, logo depois de removidos das plantas, foram imediatamente colocados em contato com nitrogênio líquido, para fins de interrupção das atividades metabólicas e preservação das condições fisiológicas do momento da coleta. Em seguida, o material vegetal foi conservado sob temperatura de -86°C , até que fosse utilizado posteriormente nos ensaios enzimáticos.

3.1.2 Avaliação da atividade “in vitro” da Rubisco e da SPS em tecidos foliares

Esta parte do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Metabolismo Vegetal, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a coordenação geral do Prof. Dr. Fábio Murilo da Matta.

3.1.2.1 Extração das enzimas

A extração das enzimas foi feita com base em metodologia descrita por Geigenberger & Stitt (1993). Em uma câmara sob temperatura média de 8°C, cada amostra de material vegetal, formada por quatro discos foliares, foi macerada em almofariz resfriado, juntamente com PVPP 100% (em quantidade equivalente ao peso de cada amostra) e 1,5 mL de solução extratora, constituída de tampão HEPES pH 7,4 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, BSA 0,1%, glicerol 10%, Triton X-100 0,1%, DTT 5 mM, benzamidina 2 mM, ácido aminocapróico 2 mM e PMSF 0,5 mM. Os extratos obtido foram depositados em eppendorffs e centrifugados a 4°C, durante 3 minutos, a 13.000 g. Em seguida, uma alíquota de 500 µL foi coletada do sobrenadante e adicionada a uma coluna de, aproximadamente, 5 mL, contendo Sephadex G-25 previamente diluído em água, na proporção de 1:1. O eluato foi utilizado nos ensaios para avaliação da atividade “in vitro” das enzimas Rubisco e SPS.

3.1.2.2 Meios de reação para a Rubisco

Para o preparo dos meios de reação para a avaliação da atividade “in vitro” da Rubisco, adotaram-se, como referência, os trabalhos desenvolvidos por Sharkey et al. (1991) e Geigenberger & Stitt (1993).

Foram preparados dois meios de reação. Num deles, avaliou-se a atividade inicial (velocidade limitante ou $V_{INICIAL}$), enquanto no outro se avaliou a atividade total (V_{TOTAL}).

Numa placa de Elisa, o meio de reação para avaliação da atividade em V_{INICIAL} foi preparado, inicialmente, com um volume de 125 μL , em solução constituída de bicina pH 8,0 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl_2 15 mM, DTT 10 mM, NaHCO_3 9,2 mM, β -NADH 0,5 mM, ATP 2 mM, BSA 0,1%, fosfocreatina 5 mM, fosfocreatina quinase (PCK) 2 U mL^{-1} , fosfoglicerato quinase (PGK) 40 U mL^{-1} e gliceraldeído-3-P desidrogenase (GAP-DH) 40 U mL^{-1} . Uma alíquota de 20 μL do extrato dessalinizado foi adicionada ao meio de reação, juntamente com 100 μL de água. Por último, foram adicionados 5 μL de RuBP 20,75 mM, completando-se o volume total do meio de reação para 250 μL .

A preparação do meio de reação para a avaliação da atividade em V_{TOTAL} seguiu os mesmos procedimentos adotados em relação à atividade em V_{INICIAL} , excetuando-se apenas as concentrações de MgCl_2 e NaHCO_3 , que passaram a ser, respectivamente, 20 mM e 25 mM.

Como a adição de RuBP promove o início da reação enzimática, após a sua adição os meios de reação foram transferidos imediatamente para o leitor de placas de Elisa, o qual verificou o grau de oxidação de β -NADH num intervalo de 30 minutos, em leitura efetuada a 340 nm. Os resultados foram expressos em $\text{nmol CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ matéria fresca} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.1.2.3 Meios de reação para a SPS

Para o preparo dos meios de reação para a avaliação da atividade “in vitro” da SPS, adotaram-se, como referência, os trabalhos desenvolvidos por Huber et al. (1989), Foyer et al. (1994) e Isopp et al. (2000), com adaptações.

À semelhança do que foi feito com a Rubisco, também foram preparados dois meios de reação para a SPS, para avaliação da atividade da enzima em V_{SEL} e em V_{MAX} .

Para avaliação da atividade em V_{MAX} , prepararam-se, numa placa de Elisa, meios de reação com volumes de 70 μL , com a seguinte composição: 14

μL de solução contendo HEPES-KOH pH 7,4 50 mM, MgCl_2 12 mM, DTT 1 mM e UDPG 12 mM; 2,8 μL de uma solução contendo frutose-6-P 12 mM e glicose-6-P 36 mM; 30 μL do extrato enzimático dessalinizado; e 23,2 μL de água. Devido à sua propriedade de promover o início da reação, frutose-6-P e glicose-6-P foram os últimos componentes adicionados ao meio de reação.

O preparo do meio de reação para a avaliação da atividade da SPS em V_{SEL} seguiu os mesmos procedimentos adotados em relação à atividade em V_{MAX} , exceto pela adição de inibidor Pi (KH_2PO_4) 10 mM e pela alteração nas concentrações de frutose-6-P e glicose-6-P, que passaram a ser, respectivamente, 2 mM e 6 mM.

Os meios de reação foram incubados em banho-maria, a 25°C, por 10 minutos. Após esse período, foram adicionados 70 μL de solução de KOH 30% a cada meio de reação, seguidos de fervura por 10 minutos – procedimentos destinados a paralisar a reação. Em seguida, foram adicionados 1.000 μL de solução de antrona a cada meio de reação, os quais permaneceram em banho-maria a 40°C, com agitação, durante 20 minutos (Yemm & Willis, 1954). Ao final, foi feita a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro, a 620 nm. Os resultados foram expressos em μmol de sacarose ($\text{g MF} \cdot \text{h}^{-1}$).

3.1.3 Avaliação da atividade das invertases (ácida total e neutra) e SuSy em tecidos da casca

Inicialmente, realizou-se uma análise dos métodos “in vitro” e “in vivo” para o ensaio enzimático, visando seu uso em avaliações de atividade das invertases (ácida e neutra) e da SuSy, em tecidos foliares e da casca de seringueira.

3.1.3.1 Estudo dos métodos “in vitro” e “in vivo”

O material vegetal utilizado no experimento foi selecionado a partir de plantas jovens do clone RRIM 600, pertencentes ao mesmo jardim clonal já citado anteriormente. Para os ensaios enzimáticos, utilizaram-se tecidos da casca, nos quais foram feitas avaliações de atividade da invertase ácida, invertase neutra e SuSy, a partir de métodos anteriormente adotados por Oliveira (1999) e Mesquita (2004), com adaptações.

Para os ensaios enzimáticos baseados no método “in vitro”, 3 g de casca foram homogeneizados com triturador, 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). Após filtragem, o conjunto foi centrifugado a 18.000 g e 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado como fonte bruta das enzimas para avaliação de suas atividades. Para a avaliação de atividade de cada uma das enzimas, adicionaram-se alíquotas do sobrenadante em meio de reação, em banho-maria, a 37°C. O meio de reação para a invertase ácida do vacúolo foi constituído de tampão acetato de sódio (100 mM pH 4,5), $MgCl_2$ (5 mM) e sacarose (200 mM). Para a invertase neutra do citosol, o tampão utilizado foi o fosfato de potássio (100 mM pH 7,5), mantendo-se os demais componentes presentes no ensaio da invertase ácida. Para a SuSy, foram utilizados tampão MES (100 mM pH 6,0), $MgCl_2$ (5 mM), sacarose (200 mM) e UDP (5 mM). No tempo inicial (1 minuto), e após 1 hora de reação, alíquotas foram extraídas de cada meio de incubação e adicionadas em solução de NaOH (100 mM), a fim de elevar o pH e paralisar a reação enzimática de clivagem de sacarose. As atividades enzimáticas foram avaliadas por meio da quantificação de açúcares redutores produzidos, em reação com DNS, conforme Miller (1959).

No método “in vivo”, foram adicionadas amostras fragmentadas de 1 g de casca a 5 mL de meios de reação, previamente preparados para a avaliação de cada uma das enzimas. A composição de cada meio, bem como os

procedimentos de reação com NaOH e, posteriormente, com DNS, foram idênticos aos adotados para o método “in vitro”. As quantificações de açúcares redutores foram realizadas conforme Miller (1959).

3.1.3.2 Avaliação da atividade “in vivo” das invertases ácida e neutra e da SuSy em tecidos da casca

Para se avaliar a atividade das enzimas invertase e SuSy em tecidos da casca, optou-se pelo emprego do método “in vivo”, pelo fato de este possibilitar a obtenção de respostas de atividade dessas enzimas mais expressivas que o método “in vitro”, conforme atestam estudos preliminares, descritos no item anterior (Cairo et al., 2005).

O material vegetal oriundo de tecidos da casca, após ser descongelado, foi cortado em pequenos fragmentos, com tamanho médio aproximado de 2 mm. Amostras de 200 mg foram adicionadas a meios de reação (2 mL), constituídos de reagentes específicos para a realização do ensaio específico de cada enzima a ser avaliada.

O meio de reação para a invertase ácida total (vacúolo e parede celular) foi constituído de 200 µL de tampão acetato de sódio pH 4,7 1,0 M, 100 µL de MgCl₂ 0,1 M e 400 µL de sacarose 1,0 M, sendo o restante do volume completado com água até totalizar 2.000 µL. O meio de reação para a invertase neutra foi semelhante ao da invertase ácida, exceto em relação ao tampão e ao pH, que foram substituídos por fosfato de potássio e pH 7,5. Ambos os ensaios foram mantidos em banho-maria, a 37°C, durante 60 minutos.

O meio de reação para a SuSy foi constituído de 200 µL de tampão HEPES-KOH pH 6,0 1,0 M, 100 µL de MgCl₂ 0,1 M, 100 µL de UDP 0,1 M e 400 µL de sacarose 1,0 M, sendo o restante do volume completado com água até totalizar 2.000 µL. O ensaio foi mantido em banho-maria, a 25°C, durante 60 minutos.

Para a determinação das concentrações de açúcares redutores produzidos a partir das reações enzimáticas, utilizou-se o método descrito por Miller (1959). Alíquotas de 100 µL de cada meio de reação foram coletadas aos 10 e 70 minutos de reação (intervalo de 1 hora), adicionadas em tubo de ensaio contendo 200 µL de reagente de ácido dinitrosalicílico (DNS) e 100 µL de água, o qual foi imediatamente submetido à fervura por 10 minutos. Após a fervura, adicionou-se mais água, completando o volume para 2.000 µL. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 540 nm e os resultados foram expressos em µmol de açúcares redutores (g MF . h⁻¹).

3.2 Atividade enzimática e sua interação com o desempenho produtivo em diferentes clones

Este estudo foi desenvolvido com base nas mesmas plantas e análises enzimáticas realizadas pelo estudo anterior, mas com o propósito de investigar a possível associação entre a atividade das enzimas Rubisco, SPS, invertases e SuSy e o desempenho de clones cujos perfis produtivos sejam contrastantes. As avaliações foram realizadas no período quente e chuvoso (janeiro a março), por ser a época do ano em que a produção de látex é mais expressiva.

Para este estudo, foram utilizados os clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261. A opção por esses clones se deu com base nos contrastes observados nos registros históricos de seus respectivos comportamentos produtivos, nas condições edafoclimáticas da região onde o experimento foi conduzido.

O material vegetal, bem como os procedimentos de coleta e análises enzimáticas utilizados neste estudo, foram os mesmos descritos anteriormente (item 3.1).

As análises estatísticas foram feitas com base no delineamento inteiramente casualizado, sendo três tratamentos (clones) e cinco repetições

(plantas). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.3 Dados referentes à produção de látex

As informações sobre produção de látex foram obtidas junto ao Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA e correspondem à produção de borracha natural, por planta (média de cinco plantas por clone), a cada sangria, dos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, no período de 2002 a 2005. Os dados de produção são de plantas adultas, em fase de produção, cultivadas em área adjacente à do jardim clonal.

Segundo Mesquita (2004), o sistema de sangria adotado foi o de meia espiral ($\frac{1}{2}$ S), com duas sangrias por semana, espaçadas de 3 a 4 dias (sistema d/3 e d/4), realizadas a 1,20 m da superfície do solo, iniciadas sempre às 7 horas e os coágulos coletados no dia seguinte. O látex coagulado foi coletado e submetido à secagem em estufa, a 70°C, até atingir peso constante e, posteriormente, pesado.

Os dados de produção dos clones RRIM 600 e GT 1 foram obtidos a partir de uma média de 4 anos (2002 a 2005) para o período quente e chuvoso, e de 3 anos (2002 a 2004) para o período frio e seco. Todos os dados de produção do clone FX 2261 foram obtidos de uma média de 2 anos (2002 e 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições ambientais durante o período experimental

Os principais dados meteorológicos registrados durante o período experimental estão apresentados na Tabela 1. Os valores mais elevados de temperatura e precipitação são encontrados nos meses de janeiro a março.

A temperatura média começou a declinar em março, caindo de forma mais intensa a partir de abril. A queda da temperatura média foi causada, principalmente, pela temperatura mínima, que caiu mais que a temperatura máxima. A precipitação pluviométrica começou a declinar em abril e tornou-se quase inexistente em junho. Tais alterações permitem sugerir que os meses de janeiro a março compõem um período quente e chuvoso, e os de junho e julho um período frio e seco.

TABELA 1. Temperatura média mensal (mínima, média e máxima) e precipitação total, registradas durante o período experimental. Dados fornecidos pela Estação Meteorológica de Lavras, MG.

Mês (2006)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura média (°C)	Temperatura máxima (°C)	Precipitação (mm)
Janeiro	18,3	23,0	29,4	149,9
Fevereiro	18,6	23,1	30,0	284,9
Março	18,0	22,4	29,3	281,5
Abril	16,2	20,9	27,8	17,4
Mai	12,1	17,4	25,3	34,5
Junho	11,2	16,5	24,7	11,6
Julho	10,7	17,3	26,4	1,6

Estudos conduzidos por Zong Dao & Xueqin (1983), com plantas de seringueira cultivadas na China, mostraram que, sob temperatura ambiente superior a 40°C, a intensidade da respiração excede à da fotossíntese, resultando em diminuição do crescimento. Os limites térmicos mais favoráveis para a fotossíntese estão situados entre 27°C e 30°C. Para o fluxo de látex, o intervalo entre 18°C e 28°C é o mais indicado. A 18°C, as células se dividem normalmente e, a 10°C ou temperatura inferior, a fotossíntese torna-se descontínua ou nula. Os mesmos autores afirmaram ainda que a temperatura média inferior a 18°C é crítica para o crescimento e, quando esse valor médio é inferior a 15°C, já é considerado crítico para a diferenciação dos tecidos.

4.2 Variação sazonal da atividade enzimática

De acordo com a análise estatística, não houve interação significativa entre os clones e os dois períodos avaliados, em relação à atividade de todas as enzimas. Por esta razão, nas figuras que se seguem, os gráficos ilustram o desempenho de cada uma das enzimas, nos dois períodos avaliados; os valores representam uma média da atividade enzimática entre os clones RRIM 600 e GT 1.

4.2.1 Atividade da Rubisco

Os resultados mostram que as mudanças das condições ambientais do período quente e chuvoso para o frio e seco causaram um declínio na atividade da Rubisco, tanto em $V_{INICIAL}$ como em V_{TOTAL} (Figura 1). Estes resultados se assemelham ao comportamento da Rubisco observado em outras espécies, em resposta a baixas temperaturas (Savitch et al., 1997; Hendrickson et al., 2004; Cen & Sage, 2005).

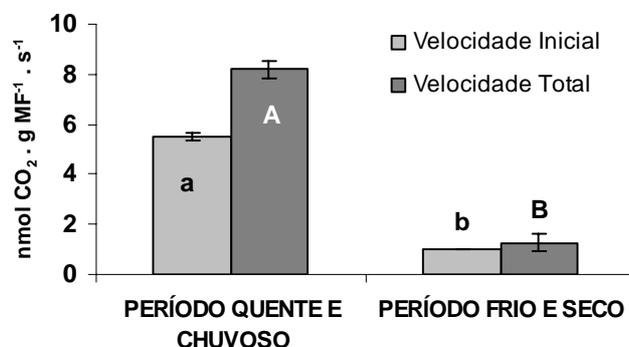


FIGURA 1. Atividade da Rubisco em V_{INICIAL} (colunas claras) e V_{TOTAL} (colunas escuras), nos clones RRIM 600 e GT 1 (média dos clones), nos dois períodos avaliados. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 10 repetições. Letras minúsculas comparam médias de V_{INICIAL} , enquanto letras maiúsculas comparam médias de V_{TOTAL} , com base no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A atividade em V_{INICIAL} é um parâmetro que tenta simular as condições limitantes que ocorrem na célula, enquanto a atividade em V_{TOTAL} oferece as condições ideais para o funcionamento da enzima. Uma comparação entre os dois parâmetros dá uma idéia da ativação da enzima. Quanto menor for a diferença entre eles, mais ativada estará a enzima, uma vez que ela se aproxima da ativação total nas condições ideais.

Na área experimental, a temperatura média começou a cair desde o mês de março, tendo a temperatura mínima sido a principal responsável por essa queda. Entre janeiro e julho, a temperatura mínima mensal sofreu uma redução de 18,3°C para 10,7°C.

Sob baixas temperaturas, a biossíntese de sacarose torna-se menos intensa, resultando em restrição na reciclagem de fosfato e na fotofosforilação (Labate et al., 1990). Como a capacidade máxima de utilização de trioses fosfato

(triose-P) é dependente da temperatura (Sage & Sharkey, 1987), a demanda do cloroplasto por fosfato tende a aumentar, em períodos frios (Leegood & Walker, 1983). Restrições na utilização de triose-P podem desencadear mecanismos de “feedback” que reduzem as taxas de transporte eletrônico fotossintético, limitam o suprimento de ATP e, assim, reduzem a taxa de assimilação de carbono fotossintético (Pammenter et al., 1993).

Com a diminuição da temperatura, a capacidade de regeneração da RuBP torna-se limitante para a fotossíntese, especialmente em relação ao componente de regeneração da RuBP associado à regeneração de fosfato inorgânico (Pi), durante a síntese de amido e sacarose (Hendrickson et al., 2004).

Trabalhando com as mesmas plantas e clones do jardim clonal utilizados no presente trabalho, Miguel (2005) já havia constatado, sob baixas temperaturas, que a variação sazonal na fotossíntese líquida é acompanhada de menor fluorescência da clorofila (F_v/F_m) e menor eficiência de carboxilação. De acordo com esse autor, os valores de condutância estomática dos três clones mantiveram-se inalterados nas diferentes estações avaliadas, sugerindo que o fator estomático pode não ter influenciado a variação sazonal da fotossíntese líquida. Por outro lado, os resultados obtidos no presente trabalho permitem sugerir que o declínio da atividade da Rubisco, no período frio e seco, pode ter contribuído para reduzir a eficiência de carboxilação, tornando-se, por extensão, uma das causas de variação sazonal da fotossíntese líquida.

É pouco provável que a atividade da Rubisco, no período frio e seco, tenha declinado como conseqüência de limitações na disponibilidade de água no solo. As brotações das plantas do jardim clonal se encontravam com dois anos de crescimento, desde a última poda. Entretanto, o plantio fora realizado havia 18 anos. Apesar de essas plantas apresentarem, no início do período experimental, altura média de cerca de 3 m, equivalente à parte aérea de plantas em estágio juvenil de crescimento, é razoável admitir que o sistema radicular

dessas plantas estivesse bem mais desenvolvido e profundo que o de uma planta com dois anos de idade. Por esta razão, é pouco provável que a diminuição da precipitação, ocorrida mais intensamente a partir do mês de abril, tenha causado um estresse às plantas a ponto de alterar, tão expressivamente, a atividade da Rubisco nas folhas.

O estado de ativação da Rubisco variou de 66%, no período quente e chuvoso, para 76% no período frio seco. Embora com ativação expressiva nos dois períodos, o estado de ativação da Rubisco foi significativamente menor no período quente e chuvoso. Segundo Spreitzer & Salvucci (2002), o estado de ativação da Rubisco, sob temperaturas de moderadas a elevadas, pode ser limitado por processos que reduzem a regeneração da RuBP. Como a capacidade de regeneração da RuBP torna-se menor, os níveis de ATP:ADP e o potencial redox dos cloroplastos declinam, causando uma perda de atividade ativase e, como consequência, uma redução no estado de ativação da Rubisco. Com base nesse entendimento, Cen & Sage (2005) explicam que o menor estado de ativação da Rubisco, sob temperaturas mais elevadas, pode estar mais relacionado a uma resposta regulada a limitações na capacidade de transporte de elétrons, do que ao efeito direto do calor na integridade da enzima Rubisco ativase.

4.2.2 Atividade da SPS

A atividade da SPS foi considerada expressiva no período quente e chuvoso, mas declinou significativamente no período frio e seco (Figura 2). Seguindo os mesmos argumentos mencionados anteriormente, em relação à atividade da Rubisco, é pouco provável que o declínio da atividade da SPS tenha sido consequência de limitações hídricas causadas por variações na precipitação. Assim, acredita-se que a temperatura pode ter sido o fator ambiental mais responsável por causar variação da atividade enzimática.

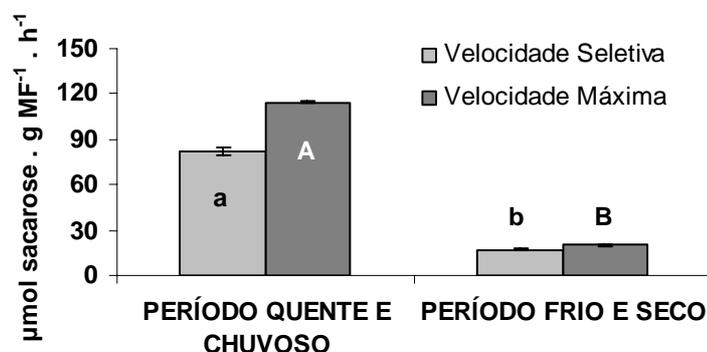


FIGURA 2. Atividade da SPS em V_{SEL} (colunas claras) e V_{MAX} (colunas escuras), nos clones RRIM 600 e GT 1 (média dos clones), nos dois períodos avaliados. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 10 repetições. Letras minúsculas comparam médias de V_{SEL} , enquanto letras maiúsculas comparam médias de V_{MAX} , com base no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na literatura, verifica-se que o efeito da temperatura sobre a atividade da SPS é bastante variável. Guy et al. (1992) e Holaday et al. (1992) registraram aumento da atividade da SPS em plantas de espinafre, quando transferidas de ambiente sob 24-25°C para temperaturas entre 5°C e 10°C. Por outro lado, folhas de soja tiveram menor atividade da SPS sob temperaturas entre 14°C e 18°C do que sob 22-26°C (Rufty et al., 1985). Em folhas de batata, a elevação da temperatura de 17-19°C para 29-31°C causou um aumento na atividade da SPS (Lafta & Lorenzen, 1995).

O presente trabalho não dispõe de elementos que permitam inferir sobre as causas da redução da atividade da SPS, à medida que a temperatura diminui. Entretanto, em consonância com as observações de Lafta & Lorenzen (1995), é pouco provável que o comportamento da enzima seja devido a alterações nas propriedades cinéticas de moléculas pré-existentes de SPS. A queda na atividade da SPS no período frio e seco parece ter relação mais estreita com a redução da

demanda por carboidratos nos tecidos dreno (casca), tendo em vista o declínio na produção de látex que tradicionalmente se verifica nesse período. Entretanto, tal afirmativa carece de confirmação, em investigações futuras.

O estado de ativação da SPS variou de 77% e 67% (RRIM 600 e GT 1, respectivamente), no período quente e chuvoso, para 86% e 87%, no período frio seco. Embora com ativação expressiva nos dois períodos, o estado de ativação da SPS foi significativamente maior no período frio e seco. É possível que as condições ambientais do período frio e seco tenham causado fortes restrições à atividade da SPS em V_{MAX} , tendo em vista que o seu declínio ocorreu de forma mais acentuada que o da V_{SEL} (Figura 2). Considerando que o estado de ativação representa a porcentagem de V_{SEL} em relação a V_{MAX} , é possível que as alterações registradas nesses dois parâmetros tenham sido a causa para o estado de ativação da SPS tornar-se mais elevado no período frio e seco. A elevação do estado de ativação da SPS, mesmo sob declínio da enzima em V_{SEL} e V_{MAX} , é um comportamento que se assemelha ao encontrado por Zrenner & Stitt (1991) e Castrillo (1992), em plantas de espinafre e feijão, respectivamente, quando submetidas a baixas temperaturas e limitações hídricas.

4.2.3 Atividade das invertases e da SuSy

Antes de dar início à avaliação da variação sazonal da atividade das invertases e da SuSy, são apresentados, a seguir, os resultados da análise dos métodos “in vitro” e “in vivo”, para a realização de ensaios com estas enzimas.

4.2.3.1 Estudo dos métodos “in vitro” e “in vivo”

Os valores obtidos para a atividade enzimática, de uma forma geral, representada pela produção de açúcares redutores, foram mais elevados quando avaliados pelo método “in vivo” do que pelo método “in vitro” (Figura 3). Os estudos realizados com avaliação de atividade das invertases pelo método “in

vitro”, em diferentes espécies, produzem resultados cujos valores são muito baixos (Oliveira, 1985; Oliveira, 1999; Geromel, 2001), quando comparados com a avaliação da atividade “in vivo” obtida no presente trabalho.

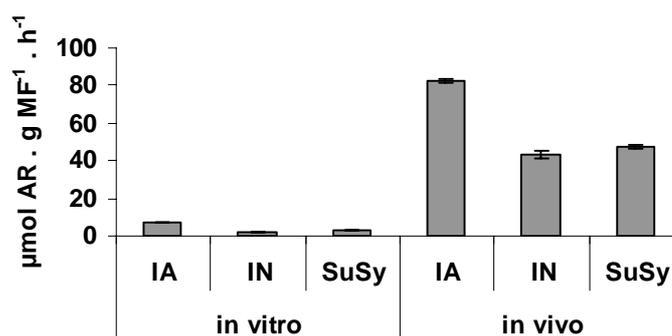


FIGURA 3. Atividade das enzimas invertase ácida (IA), invertase neutra (IN) e SuSy, avaliadas pelos métodos “in vitro” e “in vivo” na casca de plantas adultas (18 anos) do clone RRIM 600. As barras em cada coluna representam o erro padrão da média de cinco repetições.

É possível que a explicação para este resultado tenha origem nas características das enzimas presentes no material vegetal, especialmente as invertases. As invertases solúveis estão presentes no citosol (neutra) e no vacúolo (ácida), enquanto a invertase insolúvel é ácida e extra-celular, ligada à parede celular (Quick & Schaffer, 1996). A SuSy, de caráter solúvel, localiza-se predominantemente no citosol (Copeland, 1990).

No método “in vitro”, apenas as proteínas solúveis foram removidas do material vegetal, cujo extrato não continha a invertase ácida da parede celular. No método “in vivo”, a atividade da invertase ácida da parede celular pode ser quantificada mais facilmente, uma vez que o material vegetal é adicionado diretamente ao meio de reação. Por outro lado, é mais difícil, em princípio,

quantificar a atividade das invertases solúveis e da SuSy, pelo método “in vivo”. Para ser hidrolisada por ação da invertase neutra e da SuSy, a sacarose presente no meio extra-celular precisa ser transportada, através da membrana plasmática, para o citosol. E, para ser hidrolisada pela invertase ácida vacuolar, a sacarose ainda requer mais um transporte, através do tonoplasto, para chegar ao vacúolo. Cabe ressaltar, ainda, que os açúcares redutores produzidos pela hidrólise dessas enzimas solúveis têm que percorrer o trajeto inverso, ou seja, necessitam ser transportados do interior da célula para o meio extra-celular, a fim de possibilitar a sua quantificação no meio de reação.

Devido às limitações naturais para o influxo de sacarose nos tecidos, pode-se cogitar, também, a possibilidade de que, nos meios de reação que possuem pH equivalentes a 6,0 e 7,5 (utilizados para se avaliar a atividade da invertase neutra e da SuSy, respectivamente), os açúcares redutores quantificados tenham resultado, em grande parte, da ação da invertase ácida da parede celular, mesmo quando o pH não foi o mais adequado à sua ação. Devido à flexibilidade de sua ação catalítica em diferentes níveis de pH, a avaliação da atividade das invertases revela a existência de um pico, correspondente ao pH mais adequado a cada isoforma desta enzima, mas isso não elimina totalmente a sua ação, quando o pH do meio de reação se distancia desse pico. Oliveira (1999), trabalhando com o método “in vitro”, encontrou atividade da invertase em tecidos da casca de seringueira numa ampla faixa de pH (de 2,0 a 9,0), a despeito de tal atividade ter atingido o seu pico em pH próximo a 7,0.

Assim, parece razoável deduzir que o método “in vitro”, na forma como foi conduzido no presente experimento, tende a quantificar, predominantemente, os açúcares redutores produzidos pela ação das enzimas solúveis, enquanto o método “in vivo” tende a quantificar, predominantemente, o produto da ação da invertase ácida insolúvel, ligada à parede celular.

Uma outra explicação para a expressiva diferença entre os valores obtidos nos dois métodos pode ser atribuída ao procedimento de extração das enzimas, requerido no método “in vitro”. Este método, por definição, pressupõe a extração das proteínas solúveis do material vegetal, cujo extrato deverá ser adicionado posteriormente a um meio de reação. Oliveira (1999), depois de centrifugar o extrato obtido da maceração dos tecidos da casca de seringueira, adicionou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ao sobrenadante para, em seguida, obter um precipitado com maior concentração de proteínas. No presente experimento, tentou-se reproduzir esse procedimento, o qual foi testado várias vezes, com diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, mas não foi possível reproduzir os resultados obtidos por Oliveira (1999). Assim, optou-se por não adicionar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ao extrato, uma vez que os testes anteriores não foram satisfatórios.

Tendo em vista a similaridade de composição dos meios de reação, nos métodos “in vitro” e “in vivo”, é possível que a reduzida quantidade de açúcares redutores produzidos no método “in vitro” seja explicada pela baixa concentração de proteínas presentes no extrato utilizado. Nesse contexto, diante das possibilidades múltiplas de otimização das metodologias para avaliação da atividade da invertase em tecidos da casca de seringueira, acreditamos que este tema deverá ser objeto de investigações futuras, mais aprofundadas.

4.2.3.2 Avaliação da atividade “in vivo” das invertases ácida e neutra e da SuSy em tecidos da casca

Tendo em vista os resultados obtidos preliminarmente na análise dos métodos “in vitro” e “in vivo” (item anterior), optou-se pelo emprego do método “in vivo” para a realização dos ensaios das enzimas sacarolíticas. Para avaliar os efeitos das características climáticas sobre a atividade das invertases ácida e neutra e da SuSy, optou-se por representar a atividade sacarolítica nos tecidos dreno (casca), como resultante do somatório da quantidade de açúcares redutores

produzidos pela ação conjunta das enzimas invertase ácida, invertase neutra e SuSy (Figura 4). Essa forma de apresentação se justifica pelo fato de privilegiar a utilização da sacarose no dreno como um todo, independentemente da contribuição relativa de cada enzima neste processo.

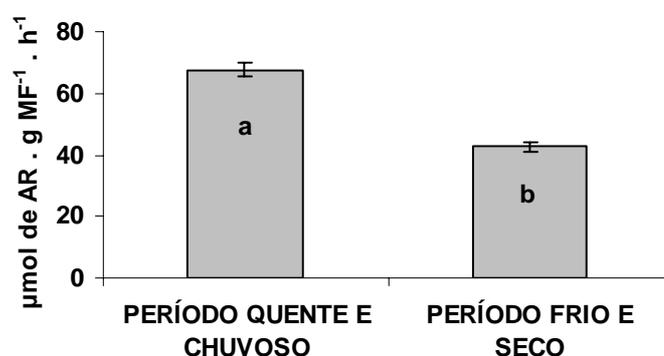


FIGURA 4. Atividade conjunta das invertases e da SuSy, representada pela produção de açúcares redutores nos clones RRIM 600 e GT 1 (média dos clones), nos dois períodos. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 10 repetições. As letras comparam médias com base no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A produção de açúcares redutores foi maior no período quente e chuvoso do que no período frio e seco. Yeang et al. (1984) já haviam observado uma queda na atividade da invertase no componente “soro C” do látex, em meses de temperaturas mais baixas. É provável que a menor produção de açúcares redutores nas plantas avaliadas neste experimento, no período frio e seco, tenha sido causada mais pela redução da temperatura do que por restrições à disponibilidade de água no solo, conforme tem se argumentado em relação às demais enzimas avaliadas anteriormente.

Variações ambientais podem interferir na atividade das enzimas que atuam na hidrólise de sacarose, resultando em alterações nos níveis de produção de açúcares redutores. Segundo Devakumar et al. (1988), o estresse causado por períodos frios e secos deve induzir mudanças bioquímicas que levam a uma menor estabilidade dos lutóides, ocasionando maior obstrução ao fluxo de látex, reduzindo a produção de borracha natural. A atividade invertásica pode ser correlacionada negativamente com a facilidade de obstrução dos vasos laticíferos, contribuindo para uma produtividade menor em períodos frios (Tupy, 1973).

4.3 Atividade enzimática e sua interação com o desempenho produtivo em diferentes clones

Nesta parte do experimento, a atividade das enzimas Rubisco, SPS, invertases ácida e neutra e SuSy foi avaliada em três clones de produtividades contrastantes: RRIM 600, GT 1 e FX 2261. As avaliações foram feitas com o propósito de investigar a possível associação entre a atividade das enzimas e o desempenho produtivo dos clones no período quente e chuvoso, quando a produção de borracha natural é mais intensa.

4.3.1 Produção de borracha natural dos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, cultivados em Lavras, MG

Na Tabela 2, podem ser observadas as informações obtidas junto ao Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, referentes à produção de borracha natural de plantas adultas e em franca produção, dos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, nos anos de 2002 a 2005. Os valores correspondem à produção, em g de borracha natural por planta (média de cinco plantas), a cada sangria, discriminadas por período (quente e chuvoso, e frio e seco).

TABELA 2. Dados de produção (g borracha seca/sangria/planta) dos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, cultivados em Lavras, MG, nos anos de 2002 a 2005. Os valores correspondem à produção média, por planta (média de cinco plantas), a cada sangria. Os números entre parênteses correspondem ao erro padrão entre as médias. Fonte: Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA.

Clone	Período quente e chuvoso	Período frio e seco
	(janeiro a março)	(junho a julho)
RRIM 600	58,13 * (\pm 8,64)	41,46 ** (\pm 6,18)
GT 1	30,09 * (\pm 5,33)	25,42 ** (\pm 3,92)
FX 2261	5,16 *** (\pm 2,07)	4,51 *** (\pm 1,86)

* Produção média de 4 anos (2002 a 2005)

** Produção média de 3 anos (2002 a 2004)

*** Produção média de 2 anos (2002 a 2003)

De acordo com a Tabela 2, a produção de borracha natural dos três clones é mais intensa de janeiro a março do que de junho a julho. Os dados evidenciam também que a produção de borracha natural do clone RRIM 600 é a maior, entre os clones avaliados, seguida da produção intermediária do clone GT 1 que, por sua vez, é maior que a do FX 2261.

Sá (1991) atribuiu a maior produção de borracha em seringueiras, durante o verão, à atividade fotossintética mais intensa, favorecida pela maior disponibilidade de energia solar e água, além de maior quantidade de folhas no dossel.

Lima (2002) constatou que a maior produção de borracha do clone RRIM 600 ocorre em períodos de maior precipitação e temperaturas médias mais elevadas (verão), quando o aumento da umidade relativa do ar e a disponibilidade de água no solo contribuem para uma melhor condição hídrica da planta, proporcionando um aumento no potencial de turgescência das células

do tecido laticífero, permitindo maior fluxo de látex e contribuindo para o aumento da produção de borracha.

4.3.2 Atividade da Rubisco

A atividade da Rubisco não diferiu entre os clones RRIM 600 e GT 1, tanto em V_{INICIAL} como em V_{TOTAL} . Em relação a estes dois clones, a atividade enzimática no clone FX 2261 foi menor (Figura 5). O estado de ativação da Rubisco foi praticamente o mesmo nos três clones, variando entre 66% e 68%.

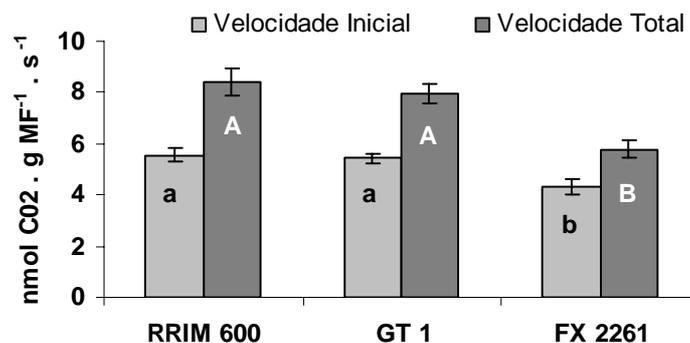


FIGURA 5. Atividade da Rubisco em V_{INICIAL} (colunas claras) e V_{TOTAL} (colunas escuras), nos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, no período quente e chuvoso. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de cinco repetições. Letras minúsculas comparam médias de V_{INICIAL} , enquanto letras maiúsculas comparam médias de V_{TOTAL} , com base no teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Por se constituir em etapa limitante para a fotossíntese, é comum que a atividade da Rubisco seja investigada como uma das possíveis causas de variabilidade fotossintética entre espécies e clones. Como se sabe, esta enzima, que participa das reações de assimilação de CO_2 na fotossíntese, através da carboxilação da RuBP, está envolvida intensamente com os mecanismos

fisiológicos e bioquímicos constituintes do sistema fonte-dreno (Stitt & Schulze, 1994).

Estes resultados sugerem que a atividade da Rubisco pode ser considerada como um dos fatores que se associam ao desempenho produtivo dos clones (Tabela 2), especialmente quando se observa a relação entre clones de produtividades mais contrastantes, como RRIM 600 e FX 2261.

4.3.3 Atividade da SPS

Não houve diferença estatística entre os clones, em relação à atividade da SPS, tanto em V_{SEL} como em V_{MAX} (Figura 6). A atividade da SPS tem sido bem correlacionada com a produção, em outras espécies (Sarquís et al., 1998; Grof et al., 1998; Pavlinova et al., 2002). Em algumas espécies de plantas lenhosas, estudos têm demonstrado correlação positiva entre a atividade da SPS e o crescimento cambial e a formação do cerne no tronco (Hauch & Magel, 1998; Magel et al., 2001; Schrader & Sauter, 2002). Contudo, de acordo com os resultados obtidos no presente experimento, é pouco provável que a atividade da SPS seja considerada um dos fatores associados às diferenças de produtividade entre os clones avaliados.

O estado de ativação da SPS foi de 77% no clone RRIM 600, 67% no clone GT 1 e 64% no clone FX 2261. Apesar da diferença de valores, o estado de ativação é considerado elevado nos três clones, reforçando ainda mais a possibilidade de que a atividade desta enzima não seja associada ao desempenho produtivo.

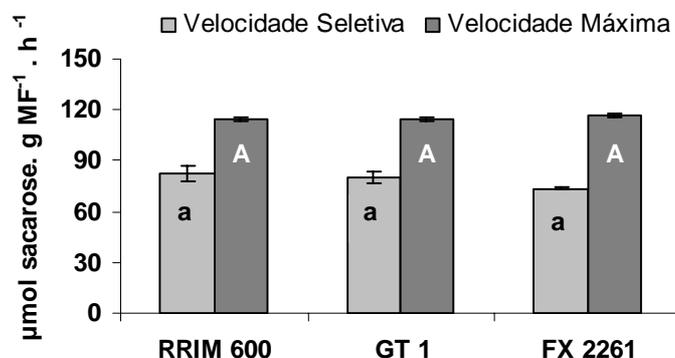


FIGURA 6. Atividade da SPS em V_{SEL} (colunas claras) e V_{MAX} (colunas escuras), nos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, no período quente e chuvoso. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de cinco repetições. Letras minúsculas comparam médias de V_{SEL} , enquanto letras maiúsculas comparam médias de V_{MAX} , com base no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.3.4 Atividade das invertases e da SuSy

A produção de açúcares redutores, resultante da ação conjunta das invertases ácida e neutra e da SuSy sobre a sacarose, foi semelhante nos clones RRIM 600 e GT 1 (Figura 7). Em ambos, a atividade sacarolítica foi superior à do clone FX 2261.

Estudos têm demonstrado que alguns aspectos anatômicos da casca podem ter influência decisiva sobre a relação entre a intensidade de hidrólise de sacarose e a produção de látex. Segundo Azzini et al. (1988), a casca é o principal componente do tronco da seringueira responsável pela produção de látex, transporte e armazenamento de assimilados produzidos na folha. Além dos vasos laticíferos, estão presentes na casca, próximo ao câmbio, os elementos de tubos crivados, as células parenquimatosas e os raios medulares.

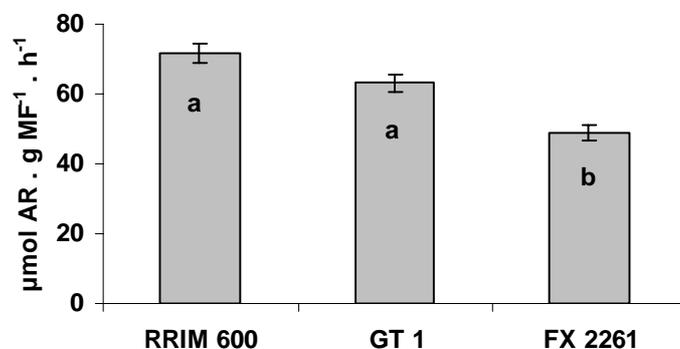


FIGURA 7. Atividade conjunta das invertases e da SuSy, representada pela produção de açúcares redutores nos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, durante o período quente e chuvoso. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de cinco repetições. As letras comparam médias com base no teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O número médio de anéis laticíferos é o fator inerente ao clone mais importante do sistema laticífero (Webster & Paardkooper, 1989), ao passo que o número de vasos laticíferos é um caráter determinante da produção em seringueiras (Ho et al., 1973). Mesquita et al. (2006b) verificaram que os números de células e anéis laticíferos são maiores no clone RRIM 600 e menores no clone FX 2261. Estas características podem explicar a variação da atividade sacarolítica entre os clones, observada no presente trabalho.

A partir da hidrólise de sacarose, as hexoses produzidas atuam como moléculas precursoras da síntese de isoprenóides, sendo a borracha a principal substância de caráter isoprenóide do látex. Tendo em vista o desempenho produtivo dos clones (Tabela 2), os resultados referentes à atividade conjunta das enzimas invertases e SuSy sugerem que este parâmetro pode ser associado à variação de produção entre os clones.

A hidrólise de sacarose nos três clones ocorreu, predominantemente, por intermédio da invertase ácida total (Figura 8). A atividade da invertase neutra mostrou-se superior à da SuSy apenas nas plantas do clone RRIM 600. Nos demais clones, não houve diferença estatística entre as atividades dessas duas enzimas.

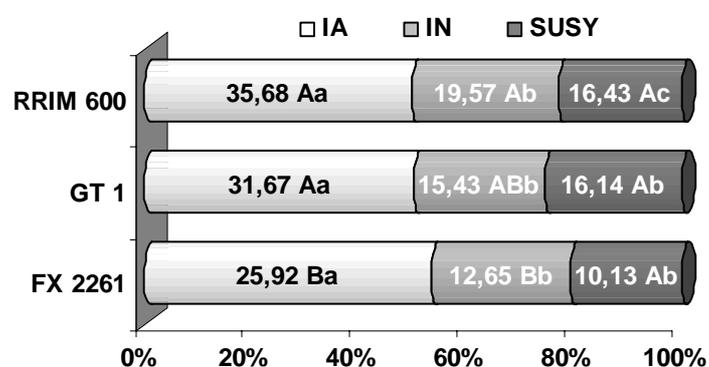


FIGURA 8. Participação relativa das enzimas invertase ácida (IA), invertase neutra (IN) e SuSy na hidrólise de sacarose e produção de açúcares redutores, na casca de plantas dos clones RRIM 600, GT 1 e FX 2261, no período quente e chuvoso. Em cada coluna horizontal, os números indicam valores absolutos (média de cinco repetições) da produção de açúcares redutores ($\mu\text{mol AR.g MF}^{-1}.\text{h}^{-1}$), resultantes da ação de cada enzima, isoladamente. Letras maiúsculas na vertical e letras minúsculas na horizontal comparam médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Conforme argumentado anteriormente, o emprego do método “in vivo” favorece a quantificação de açúcares redutores produzidos pela ação da invertase ácida da parede celular. Acreditamos, contudo, que esta seja, de fato, a via preferencial de hidrólise da sacarose nos tecidos da casca, em seringueira. Depois de ocorrer a hidrólise de sacarose na parede celular, as hexoses

produzidas podem ser transportadas mais facilmente pela membrana plasmática, devido ao tamanho dessas moléculas, que é menor que o da sacarose.

5 CONCLUSÕES

Os resultados permitiram concluir que a variação sazonal das condições ambientais pode provocar oscilações na atividade das enzimas Rubisco, SPS, invertases e SuSy, em seringueiras cultivadas em Lavras, MG. A atividade dessas enzimas nos clones avaliados (RRIM 600 e GT 1) foi mais elevada no período quente e chuvoso do que no período frio e seco. Nas condições em que o experimento se desenvolveu, a temperatura parece ter sido o fator ambiental que exerceu maior influência sobre a variação da atividade enzimática.

Em relação à maioria das enzimas avaliadas em plantas do jardim clonal, os resultados sugeriram uma possível associação entre a atividade da Rubisco, invertases e SuSy e o desempenho produtivo de plantas adultas e em franca produção. É pouco provável que este tipo de associação se aplique à atividade da SPS, cuja atividade foi semelhante, em todos os clones avaliados. A hidrólise de sacarose na casca foi exercida, predominantemente, pela ação da invertase ácida. Em proporções menores e equivalentes, esta atividade foi complementada pela ação da SuSy e da invertase neutra.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, F. C. Doenças de Seringueira. In: **II Curso de especialização em heveicultura**. Belém: convênio SUDHEVEA/FEAP, 1978. 11 p. (Mimeografado).
- ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F.; MENEGUELLI, N. A.; LIMA, J. A. S.; MOTTA, P. E. F. Determinação do carbono orgânico na biomassa da seringueira em solos de Minas Gerais. **Borracha Natural**. [Online]. Disponível em: <www.borrachanatural.agr.br/artigos/pdf/CBCS20032.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2003.
- AUSTIN, R. B.; MORGAN, C. L.; FORD, M. A.; BHAGWAT, S. G. Flag leaf photosynthesis of *Triticum aestivum* and related diploid and tetraploid species. **Annals of Botany**, London, v. 49, n.2, p. 177-189, Mar. 1982.
- AVIGAD, G. Sucrose and other disaccharides. In: LOEWUS, T. A.; TANNER, W., eds. **Encyclopedia of Plant Physiology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1982. p. 217-347.
- AZZINI, A.; GONÇALVES, P. S.; GONDIM-TOMAZ, R. M. A. O diâmetro dos tubos crivados e a produção de borracha em clones de seringueira. **Bragantia**, Campinas, v. 57, n. 1, p.57-60, 1998.
- BOLOGA, K. L.; FERNIE, A. R.; LEISSE, A.; LOUREIRO, M. E.; GEIGENBERGER, P. A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 4, p. 2058-2072, Aug. 2003.
- BOYER, C. D. Synthesis and breakdown of starch. In: NEYRA, C. A. **Biochemical basis of plant breeding**. Boca Raton: CRC Press, 1985. v. 1, p. 133-153.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Irrigação. Departamento Nacional de Meteorologia. **Normas climatológicas – 1960-1991**. Brasília, 1992. 84 p.
- CAIRO, P. A. R.; MESQUITA, A. C.; ASHAN, A. Y. K. V.; OLIVEIRA, L. E. M. Análise comparativa das metodologias “in vitro” e “in vivo” para avaliação de atividade das enzimas invertases e sacarose sintase em seringueira [*Hevea*

brasiliensis (Wild. ex. Adr. de Juss.) Muell. Arg.]. In: XXXV CONGRESO ANUAL DA SOCIEDAD COLOMBIANA DE CONTROL DE MALEZAS Y FISIOLÓGIA VEGETAL, 35., 2005, Medellín, Colombia. **Anais...** Medellín, Colombia, 2005. p. 24.

CARDINI, C. E.; LELOIR, L. F.; CHIRIBOGA, J. The biosynthesis of sucrose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 214, n. 1 p. 149-155, May 1955.

CASTRILLO, M. Sucrose metabolism in bean plants under water deficit. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 257, p. 1557-1561, Dec. 1992.

CEN, Y-P; SAGE, R. F. The regulation of Rubisco activity in response to variation in temperature and atmospheric CO₂ partial pressure in sweet potato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 139, n. 2, p. 979-990, Oct. 2005.

CHAVES, M. M.; PEREIRA, J. S.; MAROCO, J.; RODRIGUES, M. L.; RICARDO, C. P. P.; OSÓRIO, M. L.; CARVALHO, I.; FARIA, T. PINHEIRO, C. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 907-916, June 2002. Supplement.

CHOUREY, P. S.; MILLER, M. E. On the role of sucrose synthase in cellulose and callose biosynthesis in plants. In: PONTIS, H. G.; SALERNO, G. L.; ECHEVERRIA, E. **Sucrose metabolism, biochemistry, physiology and molecular biology**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1995. v. 14, p. 80-87.

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

D'AOUST, M.-A.; YELLE, S.; NGUYEN-QUOC, B. Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and sucrose unloading capacity of young fruit. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n.12, p. 2407-2418, Dec. 1999.

DEVAKUMAR, A. S.; GURURAJA RAO, G.; RAJAGOPAL, R.; SANJEEVA RAO, P.; GEORGE, M. J.; VIJAYAKUMAR, K. R.; SETHURAJ, M. R. Studies on soil-plant-atmosphere system in *Hevea*: II. Seasonal effects on water relations and yield. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, Keerala, v. 1, n. 1, p. 45-60, 1988.

DEY, S. K.; SOBHANA, P.; SETHURAJ, M. R.; VIJAYAKUMAR, K. R. Photosynthetic rate and its relation with leaf characteristics in seedlings of *Hevea brasiliensis*. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, Kottayam, v. 8, n. 1, p. 66-69, 1995.

EBOLI, I. P. **Dados de produção**. [mensagem pessoal]. Mensagem enviada por Ivo Pero Eboli via geo@emater.mg.gov.br e recebida em 27 jul. 2006.

ELLIS, R. J. The most abundant protein in the world. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 4, n. 11, p. 241-244, Nov. 1979.

ETXE BERRIA, E.; GONZALEZ, P. Evidence for a tonoplast-associated form of sucrose synthase and its potential involvement in sucrose mobilization from the vacuole. **Journal of Experimental Botany**, Oxford v. 54, n. 386, p. 1407-1414, May 2003.

FOYER, C. H.; LESCURE, J. C.; LEFEBVRE, C.; MOROT-GAUDRY, J. F.; VINCENTZ, M.; VAUCHERET, H. Adaptations of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to changes in nitrate reductase activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, n. 1, 171-178, Jan. 1994.

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

GEIGENBERGER, P. Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 382, p. 457-465, Jan. 2003.

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, MG.

GORDON, A. J.; MINCHIN, F. R.; JAMES, C. L.; KOMINA, O. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, n. 3, p. 867-877, July 1999.

GRIFFITHS, H. Designs on Rubisco. **Nature**, London, v. 441, n. 7096, p. 940-941, July 2006.

GROF, C. P. L.; KNIGHT, D. P.; MCNEIL, S. D.; LUNN, J. E.; CAMPBELL, J. A. A modified assay method shows leaf sucrose-phosphate synthase activity is correlated with leaf sucrose content across a range of sugarcane varieties. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 25, n. 4, p. 499-502, 1998.

GUY, C. L.; HUBER, J. L. A.; HUBER, S. C. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, n. 1, p. 502-508, Sept. 1992.

HAJIREZAEI, M.-R.; TAKAHATA, Y.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 439-445, Feb. 2000. Supplement.

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

HAUCH, S.; MAGEL, E. Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are related to cambial wood production and heartwood formation. **Planta**, Berlin, v. 207, n. 2, p. 266-274, Dec. 1998.

HAUPT-HERTING, S.; FOCK, H. P. Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water stressed leaves during photosynthesis. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 851-859, 2002. Supplement.

HENDRICKSON, L.; CHOW, W. S.; FURBANK, R. T. Low temperature effects on grapevine photosynthesis: the role of inorganic phosphate. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 31, n. 8, p. 789-801, Aug. 2004.

HO, C. Y.; NARAYANAN, R.; CHEN, K. T. Clonal nursery studies in Hevea: I. Nursery yields and associated structural characteristics and their variations. **Journal of Rubber Research Institute of Malaysia**, Kuala Lumpur, v. 4, p. 305-316, 1973.

HOLADAY, A. S.; MARTINDALE, W.; ALRED, R.; BROOKS, A. L.; LEEGOOD, R. C. Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 3, p. 1105-1114, Mar. 1992.

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

HUBBARD, N.; HUBER, S.; PHARR, D. Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, n. 4, p. 1527-1534, Dec. 1989.

HUBER, J. L.; HUBER, S. C.; NIELSEN, T. H. Protein phosphorylation as a mechanism for regulation of spinach leaf sucrose-phosphate activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 270, n. 2, p. 681-690, May 1989.

HUBER, S. C.; HUBER, J. L. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 431-444, 1996.

HURRY, V. M.; STRAND, A.; TOBIAESON, M.; GARDESTRÖM, P.; ÖQUIST, G. Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 2, p. 697-706, Aug. 1995.

IAC. **Programa Seringueira**. [Online]. Disponível em: <www.iac.sp.gov.br>. Acesso em: 22 out. 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <www.ibge.org.br> . Acesso em: 25 ago. 2003.

IRSG: INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Production and consumption of natural rubber. Rubber Industry Report**. [Online]. Disponível em: <www.rubberstudy.com/statistics-quarstat.aspx>. Acesso em: 22 out. 2006.

ISOPP, H.; FRENHER, M.; LONG, S. P.; NÖSBERGER, J. Sucrose-phosphate synthase responds differently to source-sink relations and to photosynthetic rates: *Lolium perenne* L. growing at elevated p_{CO_2} in the field. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 597-607, June 2000.

KHAN, S.; ANDRALOJC, P. J.; LEA, P. J.; PARRY, M. A. J. 2'-carboxy-d-arabinitol 1-phosphate (CA1P) protects ribulose-1,5-bisphosphate

carboxylase/oxygenase against proteolytic breakdown. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 266, n. 3 p. 840-847, Dec. 1999.

KOCH, K. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 509-540, 1996.

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

KRUGER, N. J. Carbohydrate synthesis and degradation. In: DENNIS, D. T.; TURPIN, D. H. **Plant physiology, biochemistry and molecular biology**. 2. ed. London: Longman Scientific & Technological, 1993. p. 59-76.

LABATE, C. A.; ADCOCK, M. D.; LEEGOOD, R. C. Effects of temperature on the regulation of photosynthetic carbon accumulation in leaves of maize and barley. **Planta**, Berlin, v. 181, n. 4, p. 547-554, July 1990.

LAFTA, A. M.; LORENZEN, J. H. Effect of high temperature on plant growth and carbohydrate metabolism in potato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 2, p. 637-643, Oct. 1995.

LAPORTE, M. M.; GALAGAN, J. A.; PRASCH, A. L.; VANDERVEER, P. J.; HANSON, D. T.; SHEWMAKER, C. K.; SHARKEY, T. D. Promoter strength and tissue specificity effects on growth of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. **Planta**, Berlin, v. 212, n. 5/6, p. 817-822, Apr. 2001.

LEEGOOD, R. C.; WALKER, D. A. The role of transmembrane solute flux in regulation of CO₂ fixation in chloroplasts. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 11, n. 1, p. 74-76, 1983.

LIMA, D. U.; OLIVEIRA, L. E. M.; SOARES, A. M.; DELÚ-FILHO, N. 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, v. 36, n. 3, p. 377-383, jul./set. 2002.

LOEF, I.; STITT, M.; GEIGENBERGER, P. Feeding orotate leads to a specific increase in uridine nucleotide levels, resulting in a stimulation of sucrose

degradation and starch synthesis in discs of growing potato tubers. **Planta**, Berlin, v. 209, n.3, p. 314-323, Sept. 1999.

LUNN, J. E.; FURBANK, R. T. Sucrose biosynthesis in C₄ plants. **New Phytologist**, Oxford, v. 143, n. 2, p. 221-237, Aug. 1999.

LUNN, J. E.; MACRAE, E. New complexities in the synthesis of sucrose. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 6, n. 3, p. 208-214, June 2003.

MAGEL, E.; ABDEL-LATIF, A.; HAMPP, R. Non-structural carbohydrates and catalytic activities of sucrose metabolizing enzymes in trunks of two juglans species and their role in heartwood formation. **Holzforschung**, Berlin, v. 55, n. 2, p. 135-145, Feb. 2001.

MANN, C. C. Genetic engineers aim to soup up crop photosynthesis. **Science**, London, v. 283, n. 5400, p. 314-316, Jan. 1999.

MARTINDALE, W.; LEEGOOD, R. Acclimation of photosynthesis to low temperature in *Spinacea oleracea* L. I. Effects of acclimation on CO₂ assimilation and carbon partitioning. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n.315, p. 1865-1872, 1997.

MESQUITA, A. C. **Desempenho da seringueira [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex. ADR. DE JUSS.) MUELL. ARG.] relacionado a caracteres fisiológicos e anatômicos em Lavras-MG**. 2004. 151 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MESQUITA, A. C.; OLIVEIRA, L. E. M.; CAIRO, P. A. R.; VIANA, A. A. M. Sazonalidade da produção e características do látex de clones de seringueira em Lavras, MG. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 4, p. 633-639, 2006a.

MESQUITA, A. C.; OLIVEIRA, L. E. M.; MAZZAFERA, P.; DELÚ-FILHO, N. Anatomical characteristics and enzymes of the sucrose metabolism and their relationship with latex yield in the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Vicososa, v. 18, n. 2, p. 263-268, Apr/June 2006b.

MICALLEF, B. J.; HASKINS, K. A.; VANDERVEER, P. J.; ROH, K. S.; SHEWMAKER, C. K.; SHARKEY, T. D. Altered photosynthesis, flowering, and fruiting in transgenic tomato plants that have an increased capacity for sucrose synthesis. **Planta**, Berlin, v. 196, n. 2, p.327–334, May 1995.

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

MIGUEL, A. A.; OLIVEIRA, L. E. M.; CAIRO, P. A. R.; OLIVEIRA, D. M. Photosynthetic behaviour during the leaf ontogeny of rubber tree clones [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex. A.Dr. 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**, Washington, v. 31, n. 5, p. 426-428, 1959.

MIZIORKO, H. M.; LORIMER, G. H. Ribulose biphosphate carboxylase oxygenase. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 52, p. 507–535, 1983.

MORAES, V. H. F.; NETO, O. G. R.; SEESCHAAF, K. W. Teores de sacarose no látex de seringueiras nativas estimuladas com Ethrel. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 27-34, 1978.

NATARAJA, K. N.; JACOB, J. Clonal differences in photosynthesis in *Hevea brasiliensis* Müll. Arg. **Photosynthetica**, Prague, v. 36, n. 1/2, p. 89-98, 1999.

NELSON, C. J. Genetic associations between photosynthesis characteristics and yield: review of the evidence. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 26, n.4, p. 543-554, July/Aug. 1988.

NUGAWELA, A.; LONG, S. P.; ALUTHHEWAGE, P. Possible use of certain physiological characteristics of young *Hevea* plants predicting yield at maturity. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, Bangalore, v. 8, p. 100-108, 1995.

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

OLIVEIRA, L. E. M. **Comportamento fisiológico de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) sob condições de deficiência hídrica: alterações na assimilação do nitrato e mobilização de açúcares**. 1985. 126 p. Tese

(Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

PAMMENTER, N. W.; LORETO, F.; SHARKEY, T. D. End product feedback effects on photosynthetic electron transport. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 5-14, Jan. 1993.

PARRY, M. A. J.; ANDRALOJC, P. J.; KHAN, S.; LEA, P.J.; KEYS, A. J. Rubisco activity: effects of drought stress. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 833-839, 2002. Supplement.

PARRY, M. A. J.; ANDRALOJC, P. J.; MITCHELL, R. A. C.; MADGWICK, P. J.; KEYS, A. J. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 386, p. 1321-1333, May 2003.

PARRY, M. A. J.; ANDRALOJC, P. J.; PARMAR, S.; KEYS, A. J.; HABASH, D.; PAUL, M. J.; ALRED, R.; QUICK, W. P.; SERVAITES, J. C. Regulation of Rubisco by inhibitors in the light. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 528-534, Apr. 1997.

PAVLINOVA, O. A.; BALAKHONTSEV, E. N.; PRASOLOVA, M. F.; TURKINA, M. V. Sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and invertase in sugar beet leaves. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 49, n. 1, p. 68-73, Jan./Feb. 2002.

PÉREZ, P.; MORCUENDE, R.; MARTÍN DEL MOLINO, I. M.; SÁNCHEZ DE LA PUENTE, L.; MARTÍNEZ-CARRASCO, R. Contrasting responses of photosynthesis and carbon metabolism to low temperatures in tall fescue and clovers. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 112, n. 4, p. 478-486, Aug 2001.

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

POZUETA-ROMERO, J.; PERATA, P.; AKAZAWA, T. Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues of plants. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 18, n. 6, p. 489-525, 1999.

PUSHPARAJAH, E. Problems and potentials for establishing *Hevea* under difficult environment conditions. **Planter**, Kuala Lumpur, v. 59, p. 242-251, 1983.

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

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, n. 11, p. 1189-1202, Nov. 2004.

RENZ, A.; STITT, M. Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers. **Planta**, Berlin, v. 190, n.2, p. 166-175, May 1993.

ROCHA NETO, O. G. **Eficiência no uso de água em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) submetidas a déficit hídrico**. 1979. 36 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ROCHER, J. P.; PRIOUL, J. L.; LECHARNY, A.; REYSS, A.; JOUSSAUME, M. Genetic variability in carbon fixation, sucrose-P-synthase and ADP glucose pyrophosphorylase in maize plants of differing growth rate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 89, n. 2, p. 416-420, May 1989.

ROLLAND, F.; MOORE, B.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 185-205, 2002. Supplement.

ROSSMAN, H. **Dados de produção** [mensagem pessoal]. Mensagem enviada por Heiko Rossman, via borracha@borrachanatural.agr.br e recebida em 17-05-2006.

RUFTY, T. W.; HUBER, S. C.; KERR, P. S. Association between sucrose-phosphate synthase activity in leaves and plant growth rate in response to altered aerial temperature. **Plant Science**, Clare, v. 39, n. 1, p. 7-12, 1985.

SAGE, R. F.; SHARKEY, T. D. The effect of temperature on the occurrence of O₂ and CO₂ insensitive photosynthesis in field grown plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 3, 658-664, July 1987.

SAMSUDDIN, Z.; TAN, H.; YOON, P. K. Correlation studies on photosynthetic rates, girth and yield in *Hevea brasiliensis*. **Journal of Rubber Natural Research**, Kuala Lumpur, v. 2, p. 46-54, 1987.

SARQUÍS, J. I.; GONZALEZ, H.; SÁNCHEZ DE GIMENEZ, E.; DUNLAP, J. R. Physiological traits associated with mass selection for improved yield in a maize population. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 239-246, Apr. 1998.

SÁ, T. D. **Avaliação ecofisiológica de seringueiras (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) submetidas a diferentes intensidades de sangria, em ambientes contrastantes do estado de São Paulo**. 1991. 132 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SAVITCH, L. V.; GRAY, G. R.; HUNER, N. P. A. Feedback-limited photosynthesis and regulation of sucrose-starch accumulation during cold acclimation and low-temperature stress in a spring and winter wheat. **Planta**, Berlin, v. 201, n. 1, p. 18-26, Jan. 1997.

SAWADA, S.; SATO, M.; KASAI, A.; YAOCHI, D.; KAMEYA, Y.; MATSUMOTO, I.; KASAI, M. Analysis of the feed-forward effects of sink activity on the photosynthetic source-sink balance in single-rooted sweet potato leaves. I. Activation of RuBPCase through the development of sinks. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 190-197, Feb. 2003.

SCHLEUCHER, J.; VANDERVEER, P. J.; SHARKEY, T. D. Export of carbon from chloroplasts at night. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 4, p.1439-1445, Dec. 1998.

SCHRADER, S.; SAUTER, J. J. Seasonal changes of sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase activities in poplar wood [*Populus x canadensis* Moench (*robusta*)] and their possible role in carbohydrate metabolism. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 159, n. 8, p. 833-843, Aug. 2002.

SHARKEY, T. D.; SAVITCH, L. V.; BUTZ, N. D. Photometric method for routine determination of kcat and carbamylation of rubisco. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 28, n. 1, p. 41-48, Apr. 1991.

SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 449-475, 2002.

STITT, M; SCHULZE, D. Does Rubisco control the rate of photosynthesis and plant growth? An exercise in molecular ecophysiology. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 465-487, May 1994.

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

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

SUNDAR, D.; REDDY, A. R. Low night temperature-induced changes in photosynthesis and rubber accumulation in guayule (*Parthenium argentatum* Gray). **Photosynthetica**, Prague, v. 38, n. 3, p. 421-427, 2000.

TANGPAKDEE, J.; TANAKA, Y.; OGURA, K.; KOYAMA, T.; WITITSUWANNAKUL, R.; CHAREONTHIPHAKORN, N. Rubber formation by fresh bottom fraction of *Hevea* latex. **Phytochemistry**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 275-281, May 1997.

TEZARA, W.; MITCHELL, V. J.; DRISCOLL, S. D.; LAWLOR, D. W. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. **Nature**, London, v. 1401, n. 6756, p. 914-917, Oct. 1999.

TROUVERIE, J; THENENOL, C.; ROCHER, J-P.; SOTTA, B; PRIOUL, J-L. The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 390, p. 2177-2188, Sept. 2003.

TUPY, J. Sucrose supply and utilization for latex production. In: DÁZUAC, J.; CHRESTIN, H. **Physiology of rubber tree latex**. Boca Raton: CRC, 1988. p. 179-218.

TUPY, J. The activity of latex invertase and latex production in *Hevea brasiliensis* Muell Arg. **Physiologie Végétale**, Paris, v. 11, n. 4, p. 633-641, 1973.

WARD, J. M.; KÜHN, C.; TEGEDER, M.; FROMMER, W. B. Sucrose transport in higher plants. **International Review of Cytology**, Amsterdam, v. 178, p. 41-72, 1998.

- WARDLAW, I. F. The control of carbon partitioning in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 116, n. 3, p. 341-381, Nov. 1990.
- WEBSTER, C. C.; PAARDEKOOPEER, E. C. The botany of the rubber tree. In: WEBSTER, C. C.; BAULKWILL, W. J. (Ed.). **Rubber**. New York: Longman, 1989. p. 57-84.
- WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 35, n. 4, p. 253-289, 2000.
- WOODROW, I. E.; BERRY, J. A. Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, p. 533-594, 1988.
- WORRELL, A. C.; BRUNEAU, J.- M.; SUMMERFELT, K.; BOERSIG, M.; VOELKER, T. A. Expression of a maize sucrose-phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. **The Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 10, p. 1121-1130, Oct. 1991.
- YEANG, H. Y.; LOW, F. C.; GOMEZ, J. B.; PARANJOTHY, K.; SIVAKUMARAN, S. A preliminary investigation into the relationship between latex invertase and latex vessel plugging in *Hevea brasiliensis*. **Journal of Rubber Research Institute of Malaysia**, Kuala Lumpur, v. 32, n. 1, p. 50-62, 1984.
- YELLE, S.; CHETELAT, R. T.; DORAIS, M.; DE VEME, J. W.; BENNETT, A. B. Sink metabolism in tomato fruit. IV. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, n. 4, p. 1026-1035, Apr. 1991.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.
- ZONG DAO, H.; XUEQIN, Z. Rubber cultivation in China. In: PLANTERS' CONFERENCE, 1983, Kuala Lumpur. Persidangan Pelandang, 1983. 15 p.
- ZRENNER, R.; SALANOUBAT, M.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 7, n.1, p. 97-107, Jan. 1995.

ZRENNER, R.; STITT, M. Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 14, n. 9, p. 939-946, Dec. 1991.