



**VARIAÇÃO SAZONAL DA PRODUÇÃO DE
BORRACHA E DA ATIVIDADE DA INVERTASE
NOS CLONES RRIM-600 E GT-1 DE
SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)**

DÁRIA PIMENTA DE OLIVEIRA

1999

47664

33502 MFN

DÁRIA PIMENTA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO SAZONAL DA PRODUÇÃO DE LÁTEX E
ATIVIDADE DE INVERTASE NOS CLONES RRIM-600 E GT-1
DE SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)
CULTIVADOS EM LAVRAS, MINAS GERAIS.**

Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Luiz Édson Mota de Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

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

Oliveira, Dária Pimenta de

Avaliação sazonal da produção de látex e atividade de invertase nos clones RRIM-600 e GT-1 de seringueira (*Hevea brasilienses* Muell. Arg.) cultivados em Lavras, Minas Gerais / Dária Pimenta de Oliveira. – Lavras : UFLA, 1999.

71 p. : il.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Seringueira. 2. Látex – Produção. 3. Invertase. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.8952

-678.5

DÁRIA PIMENTA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO SAZONAL DA PRODUÇÃO DE LÁTEX E
ATIVIDADE DE INVERTASE NOS CLONES RRIM-600 E GT-1
DE SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)
CULTIVADOS EM LAVRAS, MINAS GERAIS.**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 16 de abril de 1999

Prof. José Donizeti Alves

UFLA

Prof. Paulo Roberto Mosquim

UFV



Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

A minha família, em especial meus pais e irmãos, pelo apoio e estímulo durante minha formação profissional, todo meu amor e agradecimento.

Para Renan, meu filho e maior inspiração, dedico este trabalho e todos os que virão. Te amo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Edson Mota de Oliveira, pela orientação, apoio e compreensão durante a realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade.

Aos professores José Donizeti Alves e Paulo Roberto Mosquim pelas sugestões, orientações e correções.

Ao casal Eva e André, pela colaboração nas análises estatísticas.

Aos companheiros do setor de Fisiologia Vegetal, professores, alunos e funcionários pelos momentos de convívio.

À amiga Rita de Cássia e demais companheiras de república, pelos momentos alegres e pela amizade sincera.

Aos amigos Nelson Delú, pelas valiosas sugestões apresentadas e Rafael Ribeiro, pela participação, colaboração e conhecimentos de computação, sem os quais seria impossível a realização desse trabalho.

Ao meu filho Renan, por ter abdicado de muitas coisas, a favor do desenvolvimento desse trabalho.

Ao amigo Leo, pela compreensão, carinho, amizade e principalmente por seu amor pelo nosso filho.

Para Daniel Leão, pelo companheirismo, dedicação, solidariedade, pelo respeito à minha maneira de ser e por seu amor, coisas que tornaram mais suáveis os momentos mais difíceis e tensos.

Finalmente, agradeço a Deus, por todas as pessoas que, de modo direto ou indireto, cruzaram meu caminho, contribuindo para meu amadurecimento espiritual e profissional.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Caracterização do ambiente.....	17
3.2 Determinação do potencial hídrico.....	18
3.3 Sangria e produtividade.....	18
3.4 Obtenção das amostras para avaliações bioquímicas.....	19
3.5 Análises enzimáticas.....	20
3.5.1 Extração.....	20
3.5.2 Ensaio de atividade de invertase.....	21
3.5.3 Ensaio de atividade de invertase no látex.....	21
3.6 Determinação do pH no látex fresco.....	22
3.7 Análises químicas.....	23
3.7.1 Extração e dosagens bioquímicas.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1 Caracterização do ambiente.....	24
4.2 Produção de borracha.....	26
4.3 Potencial hídrico foliar.....	28
4.4 Concentração de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido.....	29
4.5 Aminoácidos totais e proteínas solúveis totais.....	35

4.6 Caracterização das condições de ensaio das invertases.....	37
4.6.1 Atividade das invertases nos tecidos foliares ontogenicamente diferentes e de casca em função do pH do meio de reação.....	37
4.6.2 Atividade das invertases ácidas e neutras, em função da concentração de sacarose no meio de reação.....	40
4.6.3 Atividade das invertases ácidas e neutras, em função da temperatura do meio de reação.....	43
4.7 Variação sazonal do pH no látex fresco.....	44
4.8 Atividade da invertase no látex para os clones RRIM-600 e GT-1.....	46
5 CONCLUSÕES.....	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
7 ANEXOS.....	63

RESUMO

OLIVEIRA, Dária Pimenta. **Variação sazonal da produção de borracha e da atividade da invertase nos clones RRIM-600 e GT-1 de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.).** Lavras: UFLA, 1999, 71p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal)*

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos das variações sazonais dos fatores ambientais sobre a atividade das invertases em tecidos foliares, de casca e no látex de seringueira e as variações fisiológicas nas atividades dessas enzimas, assim como sua influência na produção de látex. Foram determinadas as condições apropriadas de ensaio para as isoenzimas de invertase nos tecidos foliares completamente expandidos e em crescimento, e em casca de seringueira, tendo uma isoenzima ácida solúvel, pH 5,5, sido predominante em tecidos em crescimento e outra neutra solúvel pH 7,5, predominante em tecidos completamente expandidos, sabendo-se que nesses tecidos tipos de isoenzimas estão presentes. Determinaram-se também os níveis de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, amido, aminoácidos e proteínas solúveis totais. Os dados foram obtidos em plantas dos clones RRIM-600 e GT-1 com 9 anos de idade, no segundo ano de exploração, cultivadas na área experimental do Departamento de Biologia da UFLA-Lavras, Minas Gerais, Brasil. As análises foram realizadas em duas épocas, agosto e dezembro de 1998, sendo o material coletado entre 9:00 e 10:00 horas. Determinou-se também a atividade da invertase no látex em diferentes estádios fenológicos da planta. Foram utilizadas amostras do látex total tratado com Triton-X100 e do soro C. De modo geral, em plantas com alta densidade foliar, a atividade da invertase, tanto no látex tratado com Triton-X100 como no soro C, foi maior nas duas épocas de avaliação. O pH do látex fresco foi determinante para a atividade da invertase no soro C. Em períodos mais secos, com menores ocorrências de precipitações pluviométricas e baixas temperaturas, observou-se que o pH no látex foi menor, contribuindo para menor atividade da invertase determinada no soro C. A produção de borracha seca em cada época foi avaliada através de 2 sangrias semanais nos meses de junho, julho, agosto, novembro e dezembro. Os resultados encontrados indicaram um aumento na produção de borracha, que foi proporcional às variações da atividade da invertase. Os fatores ambientais no período de dezembro favoreceram um maior acúmulo de açúcares para os locais de síntese de látex, coincidindo com o aumento na produção de borracha.

* Comitê de Orientação: Luiz Edson Mota de Oliveira - UFLA (Orientador); José Donizeti Alves - UFLA e Paulo Roberto Mosquim - UFV.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Dária Pimenta. Seasonal variation of rubber production and invertase activity of Rubber-tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) RRIM-600 and GT-1 clones. Lavras: UFLA, 1999, 71p. (Dissertation- Master in Agronomy/ Plant Physiology)*

Our aim was to study the environmental seasonal variations effects on the invertase activity of rubber-tree leaves, bark, and latex, along with the influence of physiological variations of these enzymes activities on latex production. We detected the appropriate conditions for the invertase isoenzymes assays in rubber-tree growing leaves, total expanded leaves and bark. The acid and soluble isoenzyme, pH 5.5 was predominant in growing tissues while the neutral and soluble isoenzyme, pH 7.5 was predominant in total expanded tissues. Total soluble sugars, reducing sugars, starch, aminoacids and total soluble proteins were also quantified. The data were obtained from plants of the clones RRIM-600 and GT-1, 9 years old and at the second year of exploration, cultivated at the experimental area of the Biology department of UFLA, Minas Gerais State, Brazil. The assays were made at august and december of 1998 and the collecting period was from 9:00 to 10:00 am. Latex invertase activity was also assayed at different phenological stages of the plants. We utilized samples of total latex treated with Triton-X100 and of C serum. In general, plants with more leaves had higher invertase activity in the latex treated with Triton-X100 or C serum. The pH of the fresh latex was determinant for the activity in the C serum. Dryer seasons with low temperatures and precipitation had lower latex pH, which lead to less invertase activity in C serum. The rubber production was evaluated by two tappings per week at June, July, August, November and December. The results indicate that the rubber production was proportional to invertase activity variations. The environmental factors in december supported higher sugar contents and increased rubber production.

* Guidance committe: Luiz Edson Mota de Oliveira - UFLA (Adviser); José Donizeti Alves - UFLA e Paulo Roberto Mosquim - UFV.

1 INTRODUÇÃO

Em função da grande demanda por borracha natural, a seringueira (*Hevea spp*) vem sendo cultivada em regiões com condições edafoclimáticas diferentes de seu *habitat* natural.

A expansão da cultura da seringueira nessas áreas, isolada ou consorciada com outras culturas, como por exemplo o cafeeiro, aparece como alternativa promissora e uma nova opção para os produtores dessas localidades. O Estado de Minas Gerais apresenta-se com grande potencial para a utilização dessa cultura apesar de algumas regiões apresentarem uma estação seca e fria bem definida. Essa viabilidade, está baseada no desempenho promissor de alguns plantios pioneiros e isolados, desenvolvidos por pesquisadores e produtores, notadamente nas regiões sul, triângulo e zona da mata. A implantação deste ecossistema agrícola nessas regiões, apesar da instabilidade do mercado nacional, não deve ser desconsiderada, por representar uma alternativa econômica e ecologicamente viável a médio e longo prazo, especialmente, por promover uma prudente exploração agrícola diversificada.

Entretanto, isso impõe o desenvolvimento de pesquisas envolvendo as avaliações do comportamento sazonal das características fisiológicas relacionadas com o crescimento e produção de látex dos diferentes clones de seringueira mais promissores para essas regiões.

Os fatores edáficos, associados às mudanças climáticas sazonais afetam o metabolismo assimilatório do carbono, levando a alterações na produção de látex ao longo do ano, especialmente devido às variações das atividades enzimáticas e, conseqüentemente reflexo na sua produção, sendo as invertases

consideradas as enzimas chaves nos processos de regeneração do látex entre duas sangrias.

A produção do látex é dependente, entre outros fatores, da disponibilidade de carboidratos nos tecidos engajados na sua síntese, de maneira a suprir a demanda desses processos metabólicos, nos quais a invertase desempenha primordial função regulatória (Sá, 1991).

Outros fatores que interferem na síntese de látex referem-se à continuidade do seu fluxo e da sua regeneração após a sangria. O fluxo de látex após a sangria depende da pressão de turgescência, que envolve os processos de transferência de água do floema para os tecidos laticífero, e da sua coagulação nos vasos laticíferos. A biossíntese de látex é controlada por alguns mecanismos metabólicos essenciais, sendo o primeiro envolvendo o carregamento de sacarose nos vasos laticíferos, o segundo destaca a regulação da atividade enzimática no metabolismo de regeneração do látex, o terceiro passo envolve o requerimento energético para a regeneração *in situ*, e o último mecanismo refere-se aos fenômenos de senescência, os quais podem gerar moléculas tóxicas (H_2O_2 , OH) responsáveis pelo estresse e ressecamento do painel.

De maneira geral, a sacarose é a substância fundamental do metabolismo celular e mais especificamente, do metabolismo de isoprenóides. Entretanto, a sua utilização nos tecidos é regulada pela atividade das invertases, que podem ser encontradas em algumas isoformas com diferentes propriedades bioquímicas e em distintos compartimentos celulares, pois atuam fornecendo hexoses para atender a demanda metabólica de diferentes rotas bioquímicas.

Os propósitos deste trabalho foram avaliar a produção de borracha e as atividades das invertases na casca e no látex de dois clones de seringueira (RRIM-600 e GT-1) em função das variações edafoclimáticas sazonais, especialmente de temperatura e disponibilidade de água, na região de Lavras-

MG. Foram determinadas também as condições mais apropriadas de ensaio *in vivo* das diferentes isoenzimas de invertase em tecidos foliares ontogenicamente diferentes e na casca do caule de plantas de seringueira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O látex obtido pela sangria ainda não apresenta função definida na planta (Webster e Paardekooper, 1969). Ele compõe-se de um sistema coloidal polifásico, cujas células possuem todos os componentes usuais, porém com paredes celulares perfuradas com algumas organelas diferenciadas, como os lutóides e as partículas de Frey Wyssling (Lima, 1998). Quando submetido a centrifugação, é possível visualizar várias fases (D'Ázuc et al., 1988), podendo-se destacar algumas delas como principais: uma delas é constituída essencialmente de borracha (hidrocarboneto isoprênico), responsável por cerca de 37% do volume total; outra mais aquosa, denominada de soro citoplasmático também chamado Soro C que ocupa 48% do total; uma fração de fundo, chamada soro de sedimentação ou soro S, que ocupa um volume de 15% do total.

Nessa fase, encontramos diversas partículas, destacando-se os lutóides, vesículas ou vacúolos, envoltos em uma membrana frágil e semi-permeáveis, que contêm em seu interior um líquido denominado soro B, com pH em torno de 5,5, constituído de proteínas de alto ponto isoelétrico, enriquecidas de cátions bivalentes (Mg^{2+} e Ca^{2+}) capazes de provocar a floculação de partículas de borracha, se liberado, tendo importante papel na estabilidade coloidal do fluxo do látex (D'Azuc & Jacob, 1988b; Webster & Paardekooper, 1969). Um percentual muito pequeno em relação ao volume total é representado pelas partículas de Frey Wyssling, composta de carotenóides e lipídeos, cuja função ainda não foi esclarecida (Webster & Paardekooper, 1969).

No período entre duas sangrias, uma intensa atividade metabólica é requerida (Jacob et al., 1988 citado por Sá, 1991) e vários são os fatores atuantes nessa fase de regeneração do látex, destacando-se os fatores ambientais, fisiológicos e anatômicos (Condurú Neto, 1986).

A produção de látex está relacionada à intensidade e duração do fluxo após a sangria e com a capacidade de regeneração *in situ* do látex (Jacob et al., 1988).

A sangria, que implica num corte feito na casca, leva à ruptura dos anéis laticíferos, permitindo o fluxo de látex, induzindo a uma série de processos, como a migração do látex até as áreas de drenagem, e de reservas e outros produtos de síntese e acúmulo até os locais de demanda onde os constituintes do látex e borracha são regenerados (Jacob et al., 1988).

A paralisação do fluxo do látex é um fenômeno complexo. Segundo D'Áuzac (1988b), várias são as teorias voltadas a esclarecer os processos de coagulação. Em todas elas é destacada a participação dos lutóides que, ao serem rompidos durante a sangria, liberam substâncias que participam da coagulação do látex.

Segundo Compagnon (1986), três fatores metabólicos podem se impor à síntese de borracha, em etapas diferentes do processo: produção de acetato ou acetil CoA a partir do ácido pirúvico gerado pela glicólise e que pode ter sua produção alterada por fatores que influenciem o catabolismo de açúcares, como atividade de invertases, conversão de fosfoenol piruvato em malato ou piruvato, síntese de acetato ou acetil CoA a partir do piruvato, suprimento energético suficiente à síntese isoprênica; a glicólise pode fornecer ATP suficiente para esse processo, no entanto, deve-se considerar a atividade de ATPases lutóidicas, que são capazes de hidrolisar ATP, diminuindo sua oferta para o anabolismo isoprênico; formação de poder redutor, NADPH, que é responsável pela atuação da 3-hidroxi 3-metil glutaril CoA redutase (HGM-CoA redutase), enzima chave da síntese isoprênica. Portanto, a atividade de desidrogenase, que gera NADPH, favorece a síntese isoprênica.

Alguns aspectos fenológicos podem atuar no fluxo de látex; a relação entre parâmetros do fluxo do látex e variáveis fenológicas têm sido avaliada,

principalmente no que diz respeito a oscilação da densidade da copa, pela queda natural de folhas, em geral nos períodos mais frios do ano, característica da espécie (Sá,1991).

Vários autores observaram que, em períodos de senescência foliar, há uma queda na transpiração, ocasionando uma redução na pressão de turgescência com reflexo no fluxo inicial do látex (Monteny, 1987; Pakianathan et al., 1988).

Cretin (1978) estabeleceu uma relação entre os compostos fenólicos que estão envolvidos no processo de coagulação do látex e a fenologia da planta. Este autor observou que, com a queda natural das folhas, há um decréscimo desses compostos, atingindo valores máximos ao final do período vegetativo.

Grande parte dos estudos para o entendimento da relação entre parâmetros do fluxo do látex e variáveis fenológicas e do ambiente físico, foram realizadas em regiões onde não ocorrem diferenciações térmicas significativas durante o ano (Sá, 1991) e o enfoque, portanto, é somente nos aspectos de natureza hídrica (Jacob et al.,1988a; Pakianathan et al., 1988; Rao et al., 1990).

Jacob et al., (1988a) destacam que, em regiões em que as variações sazonais se restringem à distribuição de chuvas e nebulosidade, nos meses com menor disponibilidade de água são observados maiores índices de extrato seco no látex, época em que coincidem com os valores mais elevados de obstrução dos vasos laticíferos. Ribailier (1971) observou que os valores mais elevados de extrato seco, assim como atividade de fosfatases ácidas livres e totais, altos índice de obstrução e ruptura dos lutóides coincidem com o período seco. Teores de compostos desestabilizadores do látex, como cálcio e magnésio, não mostram variações sazonais (Jacob et al., 1988a).

O horário em que são feitas as sangrias também influencia no padrão do fluxo do látex, portanto, variações diárias do ambiente físico podem ser relacionadas com a produção (Sá, 1991).

Paardekooper & Sookmark (1969), em seus estudos sobre diferentes

horários de sangria, relacionaram valores de déficit de pressão de vapor do ar com o conteúdo de borracha seca. Fatores ambientais, fisiológicos e anatômicos podem ser destacados como importantes influenciadores na produção de látex (Condurú Neto, 1986). Em conjunto, esses fatores atuam direta ou indiretamente na quantidade de látex escoado através da sangria e a regeneração *in situ* do látex (Lima, 1998).

A seringueira já foi considerada como a espécie melhor adaptada às condições de clima tropical, florestas úmidas, com uma média de precipitação anual de 2000-4000 mm, distribuídos de forma regular. Novos conhecimentos sobre essa cultura permitem dizer que a seringueira apresenta condições de tolerância e adaptação a situações adversas de fornecimento de água. Em áreas produtivas em São Paulo, são alcançadas médias de 1000 a 1500kg/ha de borracha seca por ano, apesar dessas regiões apresentarem um índice pluviométrico anual de 1200mm (Ortoloni, 1985). No entanto, as deficiências hídricas são os principais fatores limitantes do crescimento da seringueira em qualquer região de cultivo, principalmente para plantas jovens (Cascardo, 1991). Em Minas Gerais, áreas aptas ou preferenciais para a seringueira apresentam período seco definido de até 7 meses. Logo, a necessidade hídrica dos clones e as condições edafoclimáticas das diversas áreas são fatores fundamentais na escolha dos clones (Carmo e Figueiredo, 1985). A produtividade da planta pode ser relacionada com a sua necessidade hídrica, interligada a fatores climáticos.

Em épocas em que a disponibilidade de água é menor, pode ocorrer um aumento na concentração de carboidratos e de compostos nitrogenados de baixo peso molecular, e também compostos de prolina e betainas (Argonda & Pahlich, 1991; Caballero et al., 1988). A baixa disponibilidade de água leva à conversão de amido em sacarose nas folhas de beterraba (Fox & Geiger, 1985). Com o aumento de açúcares solúveis o potencial osmótico diminui, contribuindo para a manutenção da turgescência, fenômeno conhecido como ajuste osmótico (Quick

et al., 1989). Em folhas completamente expandidas, o acúmulo em açúcares e aminoácidos resulta de uma diferença entre a taxa de assimilação de carbono e a taxa de exportação (Karami et al., 1980), enquanto que em folhas em expansão, o acúmulo que pode promover a regulação osmótica depende da importação de solutos, que é dependente das taxas fotossintéticas e da translocação de outras regiões fornecedoras (Meyer, 1981).

Em regiões com temperaturas médias anuais iguais ou superiores a 20°C, a seringueira desenvolve-se bem (Ortoloni et al., 1983; Compagnon, 1986). Estudos conduzidos em regiões sujeitas a baixas temperaturas no sul e sudoeste do Brasil mostraram que o frio reduz o desenvolvimento das plantas no período de inverno, entretanto, não é totalmente limitante, pois as plantas compensam a baixa performance no crescimento nos períodos mais quentes do ano (Cascardo, 1991). A susceptibilidade ao frio é maior quando a planta é jovem (Ortoloni et al., 1983).

Assim como os fatores ambientais, os mecanismos que regulam o metabolismo do látex estão conectados com a regeneração e produtividade de látex. O pH intracelular (Tupy, 1969), a síntese protéica, fosfato inorgânico e sacarose estão diretamente envolvidos na síntese de látex (Condurú Neto, 1986; Castro, 1990).

A sacarose é um dissacarídeo formado pela ligação glicosídica entre o carbono 1 da glicose e o carbono 2 da frutose, sendo, portanto, um açúcar não redutor. É o principal carboidrato utilizado pelas plantas, tendo um papel proeminente na produção de látex (Tupy, 1988). A disponibilidade de sacarose e a eficiência em sua utilização são fatores limitantes do metabolismo e produção de borracha (Compagnon, 1986; Castro, 1990). A síntese de produtos de reserva é dependente de altos níveis de sacarose, cuja concentração parece ser fortemente controlada em regiões de dreno.

Em grande parte das plantas de importância agrícola, há uma hierarquia

natural de órgãos que atuam como drenos de assimilados provenientes da fotossíntese. No entanto, em plantas lenhosas, a natureza sazonal do seu desenvolvimento leva, em maior ou menor intensidade, a uma superposição de utilização desses assimilados nos diversos órgãos em concomitante crescimento (Geiger 1987; Baker & Milburnt, 1989; Wardlaw, 1990)

Em seringueira, pode-se dizer que esse particionamento é mais complexo, devido a competição por um dreno artificial imposto pela sangria em relação aos drenos naturais (Tupy, 1988). Uma agravante desse processo é a possibilidade de manipular esse dreno artificial, aumentando ou diminuindo o volume ou intensidade de sua demanda (Sethuraj, 1986, citado por Sá, 1991).

Alguns autores destacam o decréscimo da taxa de crescimento da árvore, acarretado pelas sangrias sucessivas, uma vez que parte dos assimilados que seriam utilizados para o incremento de biomassa na planta é exportado no látex coletado (Gomez et al., 1989). O sistema radicular também pode ser afetado, pois o processo de absorção ativa de íons pelas raízes é dependente do suprimento de sacarose e a competição reduz a assimilação de íons e água do solo e, conseqüentemente, a produção de biomassa (Tupy, 1988).

Em *Hevea*, teores elevados de sacarose produzida fotossinteticamente podem significar um bom suprimento desse carboidrato nos vasos laticíferos. No entanto, se no látex forem encontrados altos teores desse carboidrato, isso pode significar uma fraca utilização metabólica desse açúcar, ou seja, uma baixa produtividade (Jacob et al., 1988a).

Na avaliação da eficiência de conversão de sacarose em borracha, é verificada a relação entre a produção de borracha e a energia metabólica requerida na sua biossíntese, sendo que essa relação pode variar com o clone, a estação do ano e o sistema de sangria (Tupy, 1988).

Dentre as enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose em plantas superiores, destacam-se a sintase da sacarose fosfato (EC 2.3.1.14), sintase da

sacarose (EC 2.4.1.13) e invertase (EC 3.2.1.26) (Pontis, 1977). Em cotilédones de *Vicia faba* duas enzimas estão presentes metabolizando sacarose, SPS e SUS. A SPS catalisa a reação irreversível de UDP-glicose e frutose-6 fosfato para sacarose fosfato. Em folhas, variações na taxa de síntese de sacarose são associadas com mudanças no estado de ativação de SPS (Neuhaus et al., 1990). As propriedades regulatórias das enzimas envolvidas no metabolismo de sacarose parecem ser fortemente conservadas entre diferentes espécies (Huber et al., 1989).

A principal função da enzima sintase da sacarose em órgãos drenos é a hidrólise de sacarose transportada pelo floema, catalisando, por exemplo, o primeiro passo da rota de biossíntese de amido. No entanto, alguns outros papéis fisiológicos têm sido propostos recentemente para essa enzima em diferentes tecidos vegetais. Geigenberger et al.(1993) demonstraram a atividade da sintase da sacarose na rota glicolítica no floema de hipocótilo de *Ricinus communis* L., sugerindo que essa enzima seja responsável pela quebra de sacarose no floema.

Hexoses-fosfato são convertidas a sacarose via sintase da sacarose fosfato (SPS) em tecidos fontes (Pressey, 1969; Pollock e Rees, 1975) e hidrolizadas para glicose e frutose por invertases localizadas nos tecidos drenos (Pressey, 1969; Zrenner et al., 1996).

A reação de hidrólise de sacarose pode ser catalisada por dois tipos de enzimas: α -D-glicosidases e β -D-frutofuranosidase. Essa última recebe várias denominações: invertina, sacarase, sucrase e, a mais comum, invertase (Reed, 1975). A hidrólise da molécula de sacarose recebe o nome de inversão, devido a mudança no sentido de rotação no plano de luz polarizada, ao atravessar uma solução de sacarose hidrolizada (Reed, 1975), levando à formação de uma mistura equimolar de açúcares redutores, glucose e frutose. A enzima α -D-glicosidase atua sobre a sacarose, rompendo a ligação pelo lado da glucose, enquanto a invertase rompe a ligação pelo lado da frutose (Reed, 1975).

A invertase foi descoberta em 1833 por Persoz em leveduras e isolada em 1860 por Berthelot (Draetta, 1972). Em leveduras, a maioria das invertases está localizada na parede celular, ocorrendo também uma forma intracelular.

Alguns trabalhos apontam as invertases como fornecedoras de açúcares simples para atender a necessidade energética das células, enquanto a sintase da sacarose, que também hidrolisa sacarose, é usada em processos biossintéticos (Isla et al., 1998). Poucos são os trabalhos que mostram resultados conclusivos sobre a atividade das invertases e suas funções no metabolismo da sacarose. Alguns trabalhos aparecem com resultados conflitantes quanto as atividades invertásicas nas folhas durante sua maturação, ora aumentando, ora diminuindo (Pollock, 1977). Algumas dessas diferenças podem ter origem nos diferentes métodos de extração e quantificação ou diferenças próprias de cada espécie.

Existem dois grupos de invertases que podem estar presentes em tecidos vegetais (Glasziou e Gayler, 1972). Um grupo consiste de invertases de parede celular, envolvendo o processo de translocação da sacarose do apoplasto para o simplasto (Hawker e Hatch, 1965; Vattuone et al., 1981); num segundo grupo, encontram-se as invertases solúveis, relacionadas na mobilização de sacarose intracelular (Vattuone et al., 1981).

As hexoses produzidas pela hidrólise de sacarose podem assumir destinos diferentes, de acordo com a demanda da planta. Giaquinta (1978), em seus estudos, observou que elas podem ser fosforiladas e entrar na via glicolítica para respiração ou podem ser usadas como precursores de compostos estruturais da célula. Outlaw et al. (1975) verificaram que a sacarose pode ser compartimentalizada nas células. Durante o metabolismo de síntese de isoprenóides, temos o acetil coenzima-A como precursor dos lutóides; as hexoses são responsáveis pelo fornecimento desse precursor através de sua quebra em triose na glicólise (Benzioni & Mills, 1991).

Aumento na atividade de invertase em tubérculos estocados a baixa temperatura pode favorecer um acúmulo de hexoses (Pressey e Shaw, 1966; Pressey 1969; Davies et al., 1989). Comparando diferentes cultivares de batata, Zrenner et al. (1996) encontraram fortes correlações entre atividade de invertase e quantidade relativa de sacarose e hexoses (Zrenner et al., 1996); a inibição antisenso de invertase levou a um acúmulo de sacarose e reduzindo a quantidade de hexoses.

Leigh et al. (1979) relataram a presença simultânea nos vacúolos de frutose, glicose, sacarose e invertase. A sacarose pode ser hidrolisada através da ação de duas enzimas, sintase da sacarose e invertase. Maior parte do conteúdo de sacarose em protoplasto de batatas foi encontrada nos vacúolos, simultaneamente com as invertases ácidas solúveis (Vattuone et al., 1983; Isla et al., 1992).

Durante os processos de divisão, as células mais jovens contêm grandes quantidades de uma invertase ácida vacuolar que começa a desaparecer logo que termina o alongamento celular (Hatch & Glasziou, 1963; Slack, 1965); as células maduras possuem uma invertase neutra e uma invertase ácida insolúvel da parede celular (Hawker & Hatch, 1965). Glasziou & Waldron (1964) postularam que a invertase ácida vacuolar em células ligeiramente em expansão trabalha junto com a neutra para manter alto e constante o nível de hexoses disponíveis no citoplasma.

A função reguladora depende grandemente de que a sacarose pode ser hidrolisada antes de entrar nas vias metabólicas nas células do parênquima armazenador (Sacher et al., 1963), enquanto que a enzima do espaço externo hidrolisa a sacarose proveniente dos tecidos condutores. A enzima vacuolar permite que a sacarose armazenada se torne disponível para ser utilizada nos processos metabólicos quando o fornecimento pela fotossíntese for inadequado

(Glasziou & Waldron, 1964). Inibidores endógenos de proteína podem atuar como possíveis inibidores fisiológicos de invertase ácida solúvel (Pressey, 1966).

Leigh et al. (1984) consideram que as invertases ácidas solúveis têm um importante papel na hidrólise de sacarose dentro dos vacúolos. No entanto, em vista da capacidade de armazenamento dos vacúolos e presença de invertases de parede, é possível que os vacúolos atuem como um depósito de enzimas vacuolares e que essas não apresentem funções fisiológicas (Isla, 1998). Uma possível hidrólise ácida de sacarose foi observada em frutos de lima (Echeverria et al., 1992).

A sacarose dentro do citosol é, possivelmente, transportada ao vacúolo, onde será hidrolisada por invertases ácidas. O vacúolo aparece, portanto, como um reservatório de hexoses derivadas da hidrólise da sacarose. Glasziou e Gayler (1972) propuseram um movimento difusional de açúcares do vacúolo para o citosol em cana-de-açúcar, em resposta a um gradiente de concentração gerado pelo uso de hexoses nesse compartimento celular.

Huber e Huber (1992) verificaram que algumas espécies acumulam sacarose como produto final da fotossíntese, enquanto outras acumulam amido. Essas contêm invertases ácidas atuando nos vacúolos que, provavelmente, evitam o acúmulo de sacarose.

O entendimento do mecanismo de acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar tem contribuído com importantes conclusões sobre a função fisiológica das invertases em plantas. No apoplasto a sacarose não é transportada através da membrana celular, são hidrolisadas a glicose e frutose pelas invertases de parede celular antes de ser assimilada. No interior da célula, a sacarose é ressintetizada no compartimento metabólico (citosol) e armazenada no compartimento de acúmulo (vacúolo) (Sacher et al., 1963; Hawker e Hatch, 1965).

A sintase da sacarose, que também hidrolisa sacarose em células de cana-de-açúcar, não é encontrada em quantidades significantes. Ao invés disso,

uma invertase ativa está presente, a invertase ácida vacuolar (Hawker e Hatch, 1965).

A atividade das invertases ácidas está relacionada com a capacidade das folhas em acumularem sacarose. O acúmulo de sacarose foi verificado em espécies que apresentam baixas atividades invertásicas, não havendo acúmulo em espécies onde foram detectadas altas atividades das invertases ácidas vacuolares, como em tomate (Huber, 1989).

Estudando a relação existente entre atividade invertásica e o acúmulo de açúcar, Sacher et al. (1963) verificaram que, no caso da cana-de açúcar, as invertases têm uma importante função nesse processo. Altas atividades das invertases foram associadas à hidrólise da sacarose em tecidos de armazenamento (Ricardo e Rees, 1970; Matsushita e Uritani, 1974), com a formação de hexoses em uva (Hawker, 1969) e com o crescimento em cana-de-açúcar (Hatch e Glasziou, 1963). Assim, altas atividades dessas enzimas podem ser responsáveis pela hidrólise de sacarose em células com alta demanda por hexoses.

Hatch e Glasziou (1964) verificaram correlação entre a atividade invertásica e o crescimento de cana-de-açúcar e destacam o fato de que a sacarose só entra no metabolismo de plantas superiores após prévia hidrólise pelas invertases. Já Sacher et al. (1963) e Gayler e Glasziou (1972) relatam que o incremento em matéria seca é derivado da sacarose, a qual é hidrolisada pelas invertases antes de entrar no metabolismo celular. Assim há relação entre o ganho de matéria seca em tecidos vegetais e atividade invertásica.

A correlação estabelecida entre a atividade de invertase no látex de Hevea e produção de borracha (Tupy 1985) indica que fatores que modulam atividade da invertase *in situ* podem ser de grande importância na regeneração do látex entre sangrias. Pequenas variações no pH do látex podem levar a grandes variações na atividade enzimática, as quais possuem uma faixa estreita de pH

ótimo. Tratamento com reguladores de crescimento (Ethrel) usado para aumentar a produção de borracha, tem mostrado um efeito de aumentar tanto o pH como também atividade de invertase no látex (Tupy, 1973).

A influência de numerosos componentes naturais do látex na atividade de invertases tem sido estudada. Jacob et al. (1982) e Prado et al. (1979) mostraram que a invertase no citosol está em contato com ativadores como fosfatos, nitratos e tiois, todos presentes em concentração suficiente para influenciar a atividade de invertases

Os ativadores estudados por Jacob et al. (1982) estão presentes no soro citoplasmático, podendo ter um efeito estimulatório nas invertases. Normalmente, concentrações fisiológicas desses efetores não são saturantes em relação a ativação de invertases, mas fatores externos podem alterar essa situação. Tratamento com Ethrel para aumentar o tempo de sangria e, por conseqüência, estimular a produção de borracha, modifica a concentração de tiol e fosfato inorgânico no látex (Ribailier, 1972). Consequentemente, é possível que esse tratamento influencie a atividade das invertases e ajudem no metabolismo de isoprenóide.

A variação sazonal na atividade invertásica no látex foi verificada por Yeang et al. (1984), que observaram que, nos meses de temperaturas mais baixas, houve uma redução na atividade dessa enzima. Observaram também um aumento no índice de obstrução, que está diretamente relacionado com o fluxo inicial do látex e o total de látex escoado, contribuindo para uma produtividade menor nesse período (Tupy, 1973). Com isso, a atividade de invertase pode ser correlacionada negativamente com a facilidade de obstrução dos vasos laticíferos e, provavelmente, entre sua atividade e produção (Tupy, 1973).

Devakumar et al. (1988) estudaram a influência de alguns fatores do sistema solo-planta-atmosfera sobre a produção de látex e seus parâmetros fisiológicos, em condições hídricas nas épocas secas e chuvosas, na Índia. No

período de seca, a queda na produção de látex vem associada ao alto nível de obstrução dos vasos laticíferos e ao baixo fluxo inicial de látex. Menores taxas de transpiração e turgescência nos vasos laticíferos também foram observados durante o período. Paardekooper e Sookmark (1969) observaram uma grande variação sazonal no índice de obstrução, decrescendo gradualmente entre maio e dezembro. O estresse devido ao período seco deve induzir a certas mudanças bioquímicas que levam a uma menor estabilidade dos lutóides, ocasionando maior obstrução ao fluxo de látex e, conseqüentemente, menor produção (Devakumar et al., 1988).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em condições de campo, na área experimental do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, MG.

Foram selecionadas quatro plantas dos clones RRIM-600 e GT-1, cultivadas no espaçamento tradicional de cultivo comercial (7 metros entre linhas e 2,5 metros entre plantas) implantadas no segundo semestre de 1989, estando no segundo ano de sangria. O critério de seleção para escolha foi o de possuir perímetro do tronco igual ou superior a 45cm e altura de 1,50m.

Para a escolha dos clones levou-se em consideração o grau de representatividade em relação a área plantada na região, para que os dados obtidos pudessem ser utilizados por um número maior de heveicultores

Os dados de produção de borracha foram obtidos da média de quatro repetições, onde cada planta representou uma parcela experimental.

3.1 Características do ambiente

Foi monitorada, durante as avaliações, a temperatura no local de coleta através de um termômetro simples de máxima e mínima; os dados de precipitação pluviométrica, insolação e a umidade relativa do ar foram obtidos junto à Estação Climatológica localizada no município de Lavras, na região sul do estado de Minas Gerais, a 918m de altitude, latitude 21°14' S, longitude de 45°00' W GRW. A média anual da temperatura do ar é 19,4°C, e as médias anuais de temperaturas máximas e mínimas são, respectivamente, 26,1°C e 14,8°C, e a precipitação total, de 1529mm (Brasil,1992).

3.2 Determinação do potencial hídrico

Nos meses de julho, setembro e dezembro foi avaliado o potencial hídrico das plantas selecionadas. No mês de julho, somente nas plantas do clone RRIM-600 determinou-se o potencial. Os folíolos utilizados obedeceram sempre à mesma orientação cardinal em relação à radiação solar incidente, encontrando-se no estágio de desenvolvimento foliar D (completamente expandido).

Para determinação do potencial hídrico utilizou-se uma bomba de pressão (bomba de Scholander); o horário de avaliação foi entre 5 e 6 horas. Os folíolos coletados eram colocados em papel alumínio e armazenados em caixa de isopor com gelo para diminuir o efeito da perda de água do tecido até o momento das determinações.

3.3 Sangria e produtividade

A colheita do látex foi realizada mediante sangria, meia espiral (S/2), 2 vezes por semana em intervalos de 3 e 4 dias (D/3 e D/4) com a adoção da estimulação da produção, utilizando-se 1mL de Ethrel (2,5%), pincelados na canaleta de sangria, a cada 3 meses. Para acelerar o processo de coagulação do látex adicionaram-se 2mL de ácido acético diluído (vinagre). Depois de coagulado, o látex foi transferido para estufa controlada para 72°C, até peso constante para determinação da matéria seca. Para representar os valores de produção de borracha, utilizou-se a especificação gramas de borracha seca por planta por sangria ($\text{g bs. planta}^{-1} \cdot \text{sangria}^{-1}$).

Os dados de produção de borracha foram obtidos através da média de 8 sangrias realizadas em quatro plantas dos clones RRIM-600 e GT-1, totalizando 32 repetições, nos meses de junho, julho, agosto, novembro e dezembro de 1998.

3.4 Obtenção das amostras para avaliações bioquímicas

O material vegetal utilizado para as avaliações bioquímicas constituiu-se de lâminas foliares nos estádios B e D (tecidos em expansão e completamente expandidos), casca e látex de seringueira.

O tecido foliar foi colhido ao acaso em pontos distintos na copa foliar, nas diferentes orientações cardeais em relação à radiação solar incidente. Posteriormente à coleta, tecido foliar e casca foram acondicionados em sacos plásticos, colocados em caixa de isopor com gelo e conduzidos ao laboratório, onde foram lavados com água destilada, retirada a nervura central, pesados em amostras de 1,0g, colocados em papel alumínio e, após serem congelados em nitrogênio líquido, foram armazenados imediatamente em freezer a -86°C e retirados somente no momento da utilização.

As amostras de casca foram coletadas no momento da sangria nos mesmos dias em que foram coletadas amostras foliares. Esse material foi mantido sob baixa temperatura nas mesmas condições descritas para tecido foliar. Cada planta representou uma parcela, num total de 4 repetições para análise desse tecido.

A atividade de invertase foi realizada em tecidos foliares, casca e látex. No látex, a atividade foi determinada tanto na fração do Soro C, como no látex total tratado com Triton-X 100. O látex utilizado foi coletado em recipiente resfriado e conservado a baixa temperatura até o momento das análises, que foram realizadas sempre no mesmo dia da coleta.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Metabolismo de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras, MG.

3.5 Análises enzimáticas

3.5.1 Extração

Para obtenção dos extratos enzimáticos, utilizaram-se amostras de tecido foliar nos estádios B e D e casca de seringueira, segundo metodologia descrita por Prado et al. (1979) com algumas modificações. O extrato cru foi obtido por meio de homogeneização dos tecidos em homogeneizador Polytron PT 35, durante 20 segundos, por três vezes seguidas.

O meio de extração utilizado era constituído por tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,5, contendo 2-mercaptoetanol 1 mmol/L; $MnSO_4$ 5 μ mol/L. Foram utilizados 10mL de tampão de extração por grama de tecido. Após homogeneização, o extrato foi filtrado em seis camadas de gaze e centrifugado a 18.000g, 20 minutos a 4°C. O extrato bruto obtido foi mantido sob temperatura em torno de 4°C em banho de gelo.

As invertases solúveis (ácidas e neutras) foram determinadas no sobrenadante, que foi saturado com $(NH_4)_2SO_4$ sólido, adicionado lentamente e com agitação constante até 60% de saturação. Após 12 horas a 4°C, essa suspensão foi centrifugada a 18.000g durante 20 minutos, a 4°C. O precipitado foi então ressuspensionado na proporção de 2 mL de solução extratora por grama de tecido. Essa amostra foi então desanilizada em coluna Sephadex G-25.

Os dados obtidos para invertase do látex e casca resultaram da média de 4 repetições, tendo cada planta representado uma parcela. Para tecido foliar foram utilizadas três folhas por planta e os resultados foram obtidos pela média de 12 repetições.

3.5.2 Ensaio de atividade de invertase

Para o ensaio das diferentes formas de invertase (em tecidos foliares e casca), foram utilizados tampões preparados segundo Vattuone et al. (1981). Atividades enzimáticas foram determinadas em meio de reação (4,0mL) constituído de 0,3mL do extrato enzimático em questão; 1,0mL de sacarose 0,2mol/L e 2,1mL de solução tampão no pH de reação indicada para cada isoenzima e o volume completado com 0,6mL de água.

Ensaio preliminares na fase inicial do experimento permitiram determinar as condições apropriadas para atuação da enzima.

Para determinar o efeito do pH sobre a atividade da invertase, as amostras foram preparadas com tampão glicina-HCl 0,2mol/L , pH 2,0-2,5 e 3,0; tampão acetato de potássio 0,2mol/L pH 3,5-4,5; 5,0-5,5 e 6,0 e tampão fosfato de potássio 0,2mol/L pH 6,5; 7,0-7,5; 8,0-8,5 e 9,0, segundo Vattuone et al. (1981).

O meio de reação foi incubado em banho-maria a temperatura de 37°C e o tempo de reação foi de 30 minutos. As atividades de invertase foram determinadas pela dosagem de açúcares redutores produzidos pela hidrólise da sacarose. Os açúcares redutores foram dosados pela metodologia descrita por Miller (1959).

As absorbâncias das amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 540nm e a quantificação dos açúcares baseou-se na curva padrão obtida a partir de diferentes concentrações de glucose.

3.5.3 Ensaio de atividade de invertase no látex

As análises no látex coletado e conservado em gelo foram realizadas seguindo, com pequenas adaptações, as metodologias citadas por Yeang et al.



(1984). Utilizou-se o soro-C como também o látex tratado com Triton X-100 (0,125%). Para determinar a atividade no látex total, parte da amostra coletada e mantida sob baixa temperatura foi tratada com Triton X-100 (0,125%), sendo 1 parte de látex para 4 partes de Triton X-100. Outra parte da amostra não recebeu esse pré-tratamento.

As duas amostras, tratadas e não tratadas com Triton X-100 (0,125%), foram centrifugadas a 40.000g por 60 minutos a 4°C.

Na amostra pré-tratada com Triton X-1000 (0,125%), a atividade da invertase foi determinada na fração mais clara do sobrenadante e representa a atividade da enzima no látex total. O meio de incubação foi constituído de 0,5mL do sobrenadante do látex pré-tratado, 0,5mL de sacarose 0,3mol/L, fluoreto de sódio 0,12mol/L e tampão fosfato de sódio 0,2mol/L pH 7,4. O meio para determinação da atividade de invertase na amostra não tratada era constituído de 1,0mL do soro-C, 0,1mL de sacarose 1,62mol/L e fluoreto de sódio 0,66mol/L, a reação foi realizada no pH do látex fresco.

Para os dois experimentos, a temperatura de incubação foi de 30°C (Yeang et al., 1984) e o tempo de reação foi 30 minutos. A reação enzimática foi paralisada pela adição de 1,1mL de etanol e levada ao banho-maria a 100°C. Os resultados foram obtidos a partir da média de 8 repetições, utilizando 4 plantas e 2 folíolos por planta.

3.6 Determinação do pH no látex fresco

O pH do látex fresco foi determinado no seringal com medidor digital Checker 1, no látex recém colhido e conservado em recipiente circundado por gelo.

3.7 Análises químicas

3.7.1 Extração e dosagens bioquímicas

Os resultados foram obtidos a partir da média de 12 repetições, utilizando-se 4 plantas e 3 folhas por planta.

Para obtenção do extrato bruto, que a princípio também seria utilizado para quantificações enzimáticas, procedeu-se a homogeneização do tecido vegetal, a baixa temperatura, em 10mL de meio por grama de tecido, sendo esse meio constituído de tampão fosfato de potássio 0,1mol/L, pH 7,5, DTT 1,0mol/L, PMSF 0,4mol/L, EDTA 0,1mol/L, MgCl₂ 0,5mol/L e 100mg de PVPP, seguindo metodologia descrita por Lemos (1996). O extrato cru foi obtido por meio de homogeneização dos tecidos em homogeneizador Polytron PT 35, durante 20 segundos, três vezes seguidas. Em seguida, foi filtrado sob pressão manual em seis camadas de gaze e centrifugado a 30.000g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi utilizado para determinação de açúcares solúveis totais, açúcares redutores, aminoácidos e proteínas. Com o precipitado foi quantificado o amido.

Os açúcares solúveis totais foram determinados pela reação com antrona, de acordo com Yemm e Willis (1954); açúcares redutores foram quantificados pelo método do DNS, conforme Miller (1959); o método de Bradford (1976) foi utilizado para quantificar proteínas solúveis totais; para o amido seguiu-se metodologia descrita por Lima (1998), e os aminoácidos totais foram determinados de acordo com Yemm & Cocking (1955).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do ambiente

As diferentes épocas de avaliação exibiram condições climáticas distintas, em especial quanto a intensidade e duração do período seco; temperaturas mínimas e máximas, umidade do ar e disponibilidade de radiação solar.

Na Figura 1, observa-se que em junho houve uma pequena precipitação, tendo o período sido mais seco no mês de julho, sem nenhuma ocorrência de precipitação. O mês de dezembro apresentou os maiores índices pluviométricos, sendo, portanto, o período com maior disponibilidade de água durante as avaliações.

A umidade relativa do ar, em média, para julho e dezembro não diferenciaram entre si. No entanto, no mês de dezembro foram observados valores pontuais superiores quando comparados com o mês de junho e julho. Em agosto, com a ocorrência de precipitação entre os dias 6 e 10, observou-se uma elevação da umidade relativa média e queda da temperatura máxima (Figura 1 e 3).

As maiores temperaturas foram atingidas em dezembro e as mínimas em julho (Figura 3).

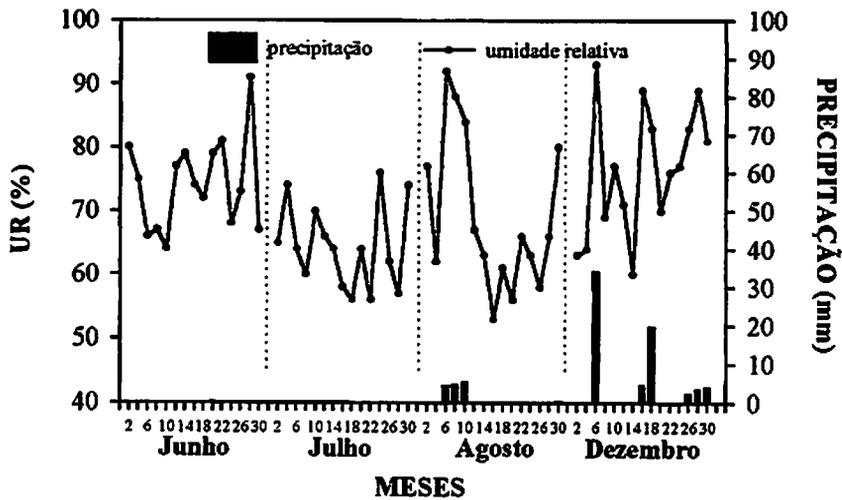


FIGURA 1. Distribuição da precipitação e umidade relativa média do ar referentes aos meses de junho, julho, agosto e dezembro de 1998, em intervalos de 2 dias.

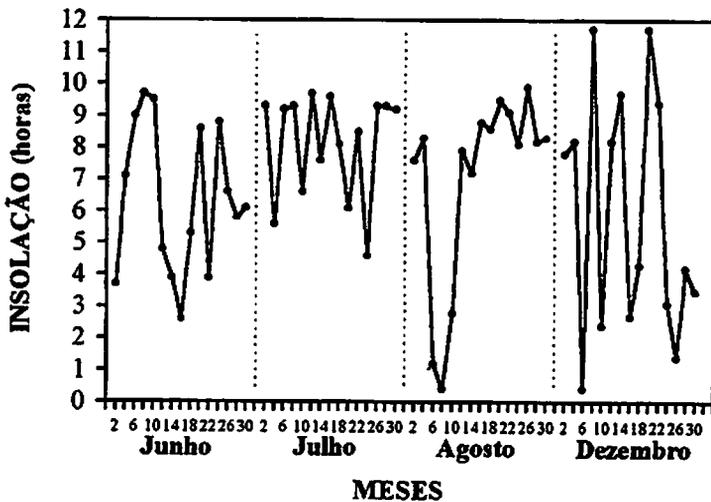


FIGURA 2. Distribuição da insolação referente aos meses de junho, julho, agosto e dezembro de 1998, em intervalos de 2 dias.

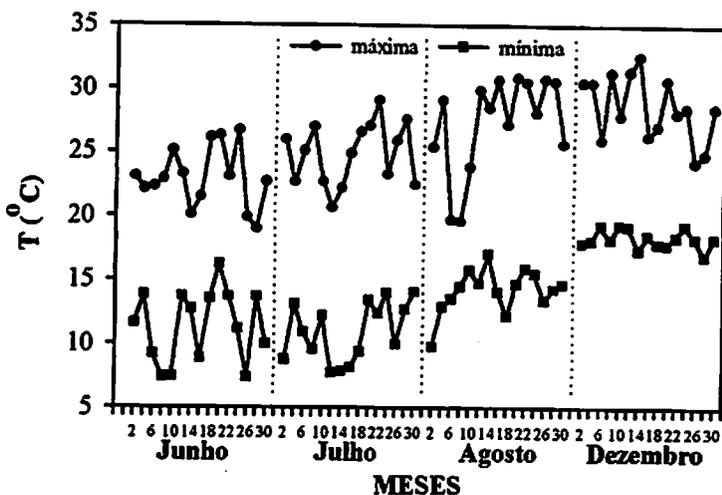


FIGURA 3. Distribuição das temperaturas (T) referentes aos meses de junho, julho, agosto e dezembro de 1998, em intervalos de 2 dias.

4.2 Produção de borracha

Os valores obtidos para produção no mês de junho não foram utilizados para análise dos resultados, uma vez que não estavam sendo realizadas sangrias no período anterior a esse mês e as primeiras coletas foram desconsideradas até que a produção se estabilizasse. Observa-se na Figura 4 que a produção média de borracha apresentou valores máximos em julho e dezembro com uma média próxima a $20\text{g bs.planta}^{-1}.\text{sangria}^{-1}$ para o clone RRIM-600 e $5\text{g bs.planta}^{-1}.\text{sangria}^{-1}$ para o clone GT-1. Em agosto, a produção de borracha em ambos os clones diminuiu significativamente ($P < 0,01$) a ponto de ser nula para o clone GT-1, enquanto o clone RRIM-600 atingiu média $6\text{g bs.planta}^{-1}.\text{sangria}^{-1}$. As médias encontradas para produção estão bem próximas daquelas encontrados por Lima (1998) no primeiro ano de sangria na área experimental de Lavras-MG.

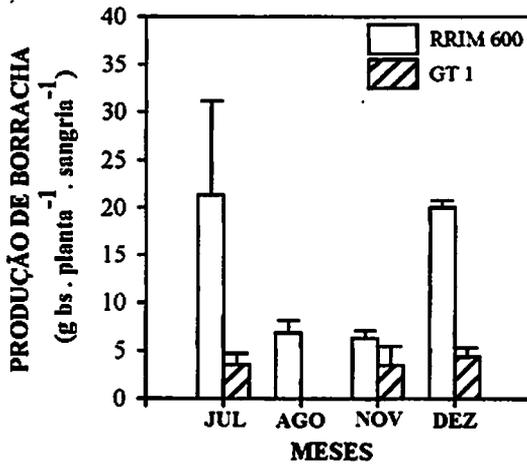


FIGURA 4. Variação sazonal da produção de borracha seca para os clones RRIM-600 e GT-1. Média de 32 repetições.

As condições ambientais de dezembro, mostradas nas Figuras 1, 2 e 3, podem estar associadas com o aumento da produção de borracha, em relação aos meses de agosto e novembro. No entanto, a queda de folhas observadas no mês de julho, fenômeno comum às plantas de seringueira nesse período, levando a uma baixa atividade metabólica da planta como um todo, também pode estar associada à diminuição da produção de látex no mês de agosto.

A ocorrência de precipitações pluviométricas e as maiores temperaturas médias, juntamente com a característica fenológica da planta, pode influenciar direta e indiretamente no fluxo e biossíntese de látex. A redução na produção de borracha também pode estar associada à queda na temperatura nos meses mais frios, o que leva a uma diminuição na atividade metabólica da planta, sendo a queda das folhas uma consequência final de todo o complexo “temperatura X água”.

4.3 Potencial hídrico foliar Ψ_f

A Figura 5 mostra que o Ψ_f aumentou significativamente ($P < 0,01$) no mês de dezembro, quando as precipitações foram mais constantes. Não houve diferença significativa ($P < 0,01$) entre as médias de potencial hídrico foliar para os dois clones, em setembro e dezembro.

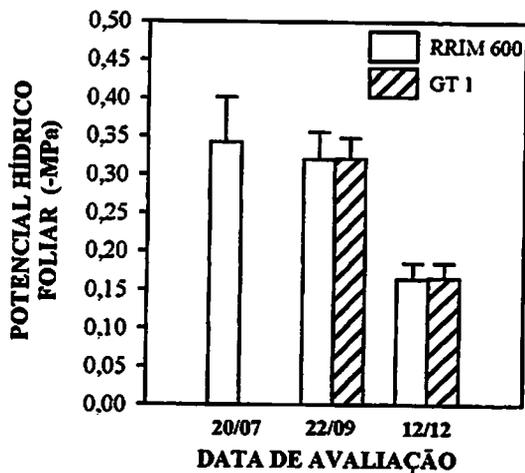


FIGURA 5. Variação sazonal do potencial hídrico foliar para os clones RRIM-600 e GT-1. Média de 48 repetições.

Não foi realizado o potencial hídrico foliar no clone GT-1 em julho, no entanto, os resultados obtidos nas avaliações dos meses de setembro e dezembro mostraram que os dois clones não apresentaram diferenças significativas ($P < 0,01$) para essa característica.

O potencial hídrico foliar parece ser bastante sensível as variações ambientais, sugerindo uma dependência com o fluxo de água na planta. Resnik & Mendes (1979), trabalhando com o clone FX-2361, observaram que os menores

valores de Ψ_f coincidiram com as horas de maior fluxo transpiratório, tanto em plantas irrigadas como para as plantas estressadas pela perda de água por transpiração, que causa um abaixamento no potencial de turgescência das células guardas (Ludlow, 1980).

A análise da Figura 5 permite dizer que o maior Ψ_f observado em dezembro reflete maior disponibilidade de água no solo, contribuindo para maior produção de látex, sugerindo efeitos de maior translocação de assimilados da folha para o caule/casca. Lima (1998) destaca em seus estudos que o aumento da umidade relativa do ar e na disponibilidade de água no solo no mês de dezembro, levando a uma melhor condição hídrica para as plantas, influencia na pressão de turgescência das células do tecido laticífero com conseqüente alteração no fluxo de látex, favorecendo a produção de borracha. Esse mesmo autor, avaliando correlação significativa entre taxa fotossintética e produção de borracha em plantas adultas observou que há uma dependência, mas não correlação direta com taxas fotossintéticas, uma vez que o aumento na produção entre diferentes épocas não foi acompanhado por aumento na assimilação de CO_2 .

O acompanhamento nas relações hídricas das plantas, como déficit de pressão de vapor e turgescência das células que compõem o sistema laticífero, possibilitam maiores informações e devem ser realizados em futuros trabalhos.

4.4 Concentração de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido

Os efeitos dos fatores ambientais no metabolismo dos açúcares foram analisados em dois períodos do ano (agosto e dezembro), em lâmina foliar completamente expandida e em crescimento e casca de seringueira. Esses dados podem ser visualizados na Figura 6, na qual também observa-se que, em folhas, nas diferentes épocas de avaliação, os teores de açúcares solúveis totais e redutores não variaram muito, o mesmo não ocorrendo com o amido.

Menores teores de amido foliar foram observados em agosto, quando há uma acentuada redução nas folhas D (Figura 6A), em relação ao mês de dezembro. Segundo Morgan (1984), plantas sob condições de baixa disponibilidade de água tendem a apresentar uma redução no teor de amido e um acúmulo de açúcares solúveis nas folhas, sinalizando para um ajuste osmótico. Uma possível causa para diminuição nos teores de amido nas folhas D em agosto (Figura 6A), é que esse amido esteja sendo armazenado no caule, o que pode acontecer em plantas lenhosas e em algumas plantas anuais. No entanto, nesse trabalho não foi quantificado amido no caule. O acúmulo na produção de fotoassimilados em períodos de déficit hídrico pode estar associado ao fato de que a fotossíntese é menos afetada por ele (Boyer, 1970), levando a um balanço positivo entre produção e consumo de assimilados (Chaves, 1991).

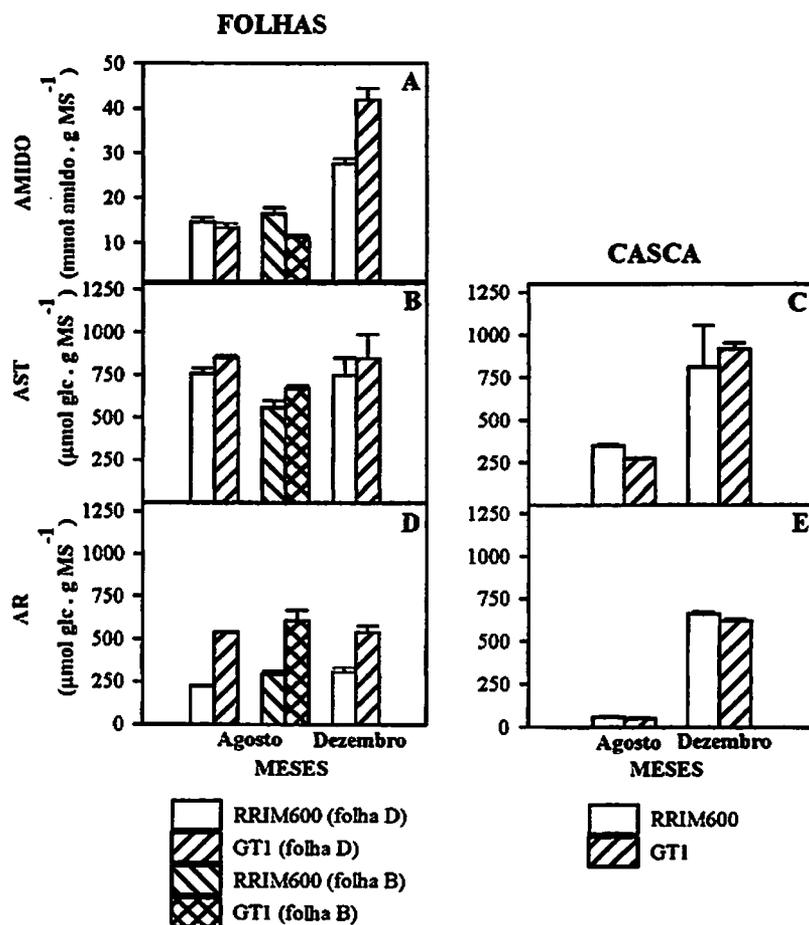


FIGURA 6. Variação sazonal dos teores de amido, açúcares solúveis totais (AST) e açúcares redutores (AR) em lâmina foliar completamente expandida (folha D), em crescimento (folha B) e em casca para os clones RRIM-600 e GT-1. Média de 4 repetições.

Entende-se por açúcares solúveis totais aqueles compostos basicamente por hexoses (redutores) e outros açúcares de cadeias maiores com função de armazenamento e transporte (não redutores), como a sacarose que, em plantas de seringueira, é essencial ao metabolismo de biossíntese do látex (Tupy, 1985; Castro, 1990). Cascardo (1991) observou que em folhas totalmente expandidas

de plantas jovens de seringueira pode ocorrer um ajuste osmótico. Nesse caso, as folhas acumulam uma alta proporção de sacarose, ao contrário de regiões de crescimento, nas quais o açúcar que mais acumula é a glicose.

Observam-se maiores concentrações dos açúcares solúveis totais em folhas completamente expandidas (estádio D) quando comparadas às folhas em expansão (estádio B), tanto para o clone RRIM-600 quanto para o GT-1, nos dois períodos de avaliação. Espera-se que folhas maduras apresentem altas concentrações de sacarose em função da maior taxa metabólica resultante principalmente da sua maior capacidade fotossintética.

Costa et al. (1996), através de avaliações fenológicas realizadas nessa mesma área experimental em 1995 e 1996, observaram que, em agosto, as plantas do clone RRIM-600 encontravam-se em fase final de queda foliar e iniciando novos lançamentos foliares. Lima (1998), em seus estudos, observou que em agosto as plantas encontravam em estágio intermediário de reenfolhamento, ou seja, apresentavam folhas em expansão (estádios B₁ e B₂), juntamente com grandes quantidades de folhas completamente expandidas (estádio D). Nas condições de nossos estudos, em agosto, observaram-se as mesmas características fenológicas descritas por Lima (1998), sugerindo que parte dos carboidratos assimilados por folhas em expansão poderiam estar sendo utilizados pelas folhas mais jovens.

A disponibilidade total de açúcares possíveis de serem transportados, em especial a sacarose, pode ser evidenciada pela diferença entre os conteúdos de AST e AR (Figura 6B e 6D).

De acordo com os dados observados na Figura 6B e 6D, não houve diferença significativa ($P < 0,01$) para teores de açúcares nas duas épocas para os dois clones, sugerindo uma menor eficiência no uso desses carboidratos nos meses em que as temperaturas foram menores, o que pode estar associado à menor translocação desses carboidratos.

Os açúcares solúveis totais em lâmina foliar, nos diferentes estádios de desenvolvimento e clones, variaram pouco entre os períodos de avaliação. Os dados obtidos para AST em casca (Figura 6C) apresentam valores maiores nas avaliações de dezembro, época que coincide com maior ocorrência de precipitações e menores amplitudes térmicas. Apesar da disponibilidade de AST e AR para o clone GT-1, este clone foi menos eficiente na produção de borracha seca, como observado nos resultados da Figura 4. Essa menor produtividade do clone GT-1 observada nesse trabalho, pode estar relacionada com a sua menor eficiência na translocação e uso desses carboidratos para produção de borracha. O período de reenfolhamento coincide com uma redução na disponibilidade de açúcares na casca, possivelmente pela competição exercida por dreno fortíssimo, e o lançamento de folhas novas, culminando com uma redução na produção de látex (Figura 4).

As condições climáticas observadas no mês de dezembro parecem ser mais favoráveis ao acúmulo de carboidratos, enquanto que a translocação de açúcares dos tecidos foliares para regiões da casca, que é considerada um dreno forte, parece ser proporcionalmente mais afetada em agosto.

Observa-se que os teores de AR (Figura 6D) praticamente não se alteraram para o clone GT-1 em folhas completamente expandidas, tanto para agosto quanto para dezembro, sendo o mesmo padrão observado para AST no clone GT-1 (Figura 6B). Por outro lado, na Figura 6D observa-se uma grande contribuição de AR para o clone GT-1 em folhas em expansão na totalização de AST (Figura 6B). Em folhas em expansão há um alto requerimento de açúcares prontamente disponíveis para sua metabolização.

Em dezembro, para os dois clones em folhas completamente expandidas, observa-se uma menor participação dos AR no total de AST, ou seja, o teor de açúcares solúveis são compostos por maior parte de açúcares não-redutores, sugerindo uma maior quantidade de sacarose disponível, que poderá ser utilizada

como para aquelas completamente expandidas.

Lima (1998) observou que teores de proteína ao longo do dia parecem estar relacionados inversamente à evolução da temperatura do ar. O mesmo autor observou que, em maiores temperaturas, maiores transpirações e, conseqüentemente, maior perda de água, ocorrem menores teores de proteína, provavelmente devido à sua hidrólise para produção de aminoácidos, auxiliando na manutenção da turgescência das células. Cascardo (1991) não verificou queda nos teores de proteína em plantas jovens de seringueira nas condições descritas acima.

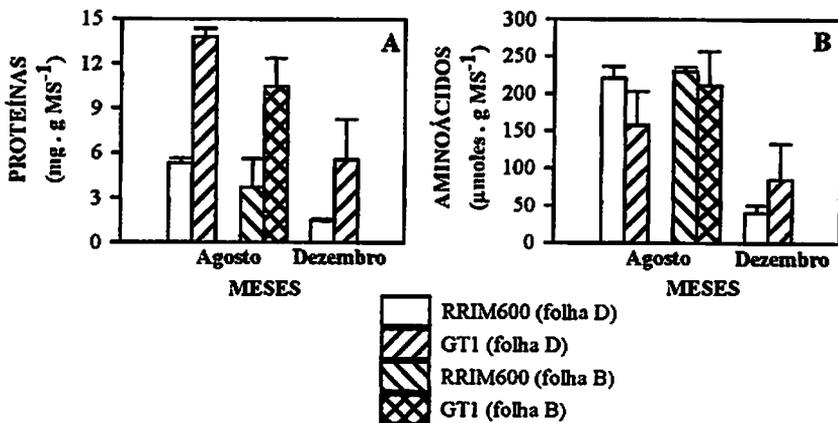


FIGURA 7. Variação sazonal dos teores de proteínas totais e aminoácidos totais, em lâmina foliar completamente expandida (folha D), em crescimento (folha B) para os clones RRIM-600 e GT-1. Média de 4 repetições.

Maiores teores de aminoácidos foram observados nos meses de agosto, período de inverno, tanto para folhas completamente expandidas como em expansão, em ambos os clones (Figura 7B). Uma hidrólise intensa de proteínas sob déficit hídrico pode ser descartada se observados os teores de proteínas na Figura 7A. O aumento no teor de aminoácidos totais em plantas sob baixa disponibilidade de água foi detectado por vários autores em folhas de aveia (Argonda & Pahlich, 1991), *Pinus* (Vance & Zaerr, 1990), milho (Caballero et al., 1988) e cana-de-açúcar (Oliveira, 1985). Correa et al. (1987), trabalhando com o clone IAN 873, observaram um aumento na concentração de prolina, que parece ser o aminoácido com maior contribuição para essa condição.

Novos estudos devem ser realizados, buscando determinar qual ou quais os pontos responsáveis por essa menor eficiência, analisando desde a taxa fotossintética, a síntese de sacarose nas folhas pela sintase da sacarose fosfato, sua translocação para o floema, seu transporte a longas distâncias a sua hidrólise (via invertase ou sintase da sacarose) e sua utilização na síntese de isoprenóides.

Poucos são os trabalhos com resultados conclusivos a respeito da função do acúmulo de aminoácidos em plantas sob condições de baixa disponibilidade água. Uma possibilidade seria a participação desses aminoácidos como fonte de N e C prontamente utilizáveis após a reversão do estresse, como também teriam uma função no ajuste osmótico (Handa et al., 1983).

4.6 Caracterização das condições de ensaio das invertases

4.6.1 Atividade das invertases nos tecidos foliares ontogenicamente diferentes e casca em função do pH do meio de reação

As proteínas possuem grupos laterais básicos, neutros ou ácidos, portanto, a enzima pode conter grupos carregados positiva ou negativamente, a

um dado valor de pH. Tais grupos ionizáveis são freqüentemente parte do sítio ativo, já que o mecanismo catalítico ácido-base está ligado a várias enzimas. Então, para a catálise ser possível, os grupos ionizáveis no sítio devem possuir uma carga particular, o que implica que a enzima cataliticamente ativa, pode ser uma parte maior ou menor da concentração total da enzima, dependendo do pH. Geralmente, a atividade passa por um máximo no pH ótimo e depois decresce.

Os resultados observados na Figura 8 possibilitam a caracterização de duas isoenzimas de invertase em lâmina foliar completamente expandida e em crescimento e em casca de seringueira, no clone RRIM-600

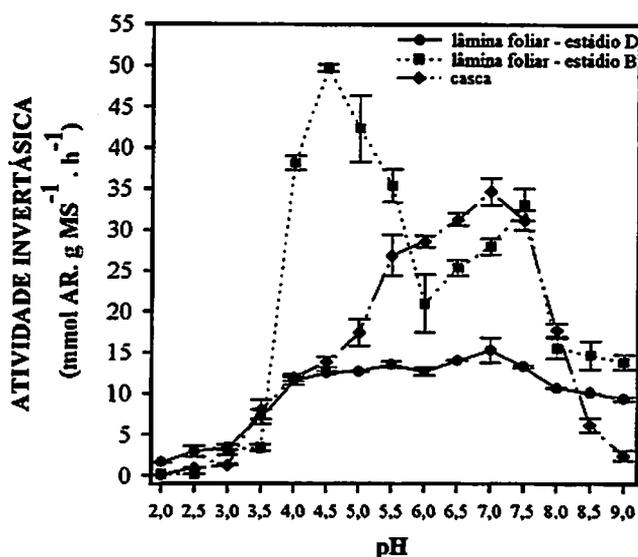


FIGURA 8. Atividade da invertase em lâmina foliar completamente expandida, lâmina foliar em crescimento e casca de seringueira do clone RRIM-600, em função do pH do meio de incubação. Média de 4 repetições.

Observa-se pela Figura 8 uma atividade bastante superior da isoenzima ácida (pH 4,5) sobre a neutra (pH 7,5), em tecidos de lâmina foliar em expansão.

Um decréscimo na atividade de invertase ácida é observado em lâmina foliar completamente expandida, na qual observa-se maior atividade enzimática em pH 7,0. Para a casca, há um predomínio da atividade de invertases neutras.

Pode-se associar altos valores para atividade da invertase ácida às regiões de intensa atividade de divisão e alongamento celular, como são as folhas em crescimento. Atividades altas de invertase ácida verificadas nos tecidos de lâminas foliares podem ser atribuídas à maior demanda de hexoses nos processos biossintéticos das regiões meristemáticas durante a fase de crescimento (Gayler e Glasziou, 1972; Huber 1992).

Alguns autores (Vattuone et al., 1983; Isla et al., 1992) encontram grande quantidade de invertase solúvel ácida juntamente com sacarose dentro de vacúolos de batatas. Isla et al. (1998), em seus trabalhos com vacúolos isolados de batata, identificaram a atividade de invertase solúvel ácida quantificando o aumento da concentração de glucose e frutose pela hidrólise de sacarose.

A maior atividade invertásica neutra nos tecidos fisiologicamente mais desenvolvidos sugerem o envolvimento dessa enzima na acumulação de sacarose no vacúolo. Pode ocorrer um trabalho em conjunto com invertase ácida de parede celular e invertase neutra, coordenando o acúmulo de sacarose.

Oliveira (1985) observou um aumento na atividade de invertases ácidas e neutras em cana-de-açúcar simultaneamente ao abaixamento do potencial hídrico do solo, sugerindo que a quebra da sacarose teria um efeito benéfico, não somente dobrando a concentração osmótica das células sem muito gasto de energia, como também contribuiria, a partir da liberação de glucose e frutose, na manutenção da demanda metabólica.

Observa-se que cada tecido em especial possui uma atividade de invertase numa faixa estreita de pH ótimo. Fleischmacher et al. (1980) destacam que posições da curva com atividades discretas da enzima podem indicar uma sobreposição de atividade de várias invertases.

A presença de invertase ácida vacuolar nos tecidos de folhas completamente expandidos nos permite sugerir que a sacarose armazenada nos vacúolos posteriormente poderá ser metabolizada e as hexoses formadas utilizadas para atender à demanda metabólica da planta, como acontece no metabolismo dos isoprenóides para a síntese de borracha em seringueira.

Resultados semelhantes aos das Figura 8 foram encontrados por Oliveira (1985) para cana-de-açúcar. Sampietro et al. (1980) e Fleischmacher et al. (1980) também obtiveram em seus trabalhos as mesmas observações, mostrando também que as invertases podem variar em função do estágio de desenvolvimento do tecido e também com a sua localização celular.

4.6.2 Atividade das invertases ácidas e neutras, em função da concentração de sacarose no meio de incubação

As Figuras 9, 10 e 11 apresentam gráficos de Michaelis-Menten com curva hiperbólica, mostrando que o “pool” de invertases em tecidos foliares completamente expandidas e em crescimento, e casca de seringueira seguem a cinética de Michaelis-Menten, na faixa de substrato analisada.

Interessante notar que as diferentes isoenzimas dos tecidos vegetais analisados apresentaram diferentes valores de K_{Mapp} para sacarose. Os valores de K_{Mapp} para lâmina foliar foram bem menores que aqueles encontrados para casca, sabendo-se que esse parâmetro cinético indica a afinidade de uma determinada enzima pelo seu substrato. Dessa forma, os valores obtidos sugerem, na casca, a coexistência uma possível rota alternativa para a hidrólise de sacarose, envolvendo, talvez, a sintase da sacarose.

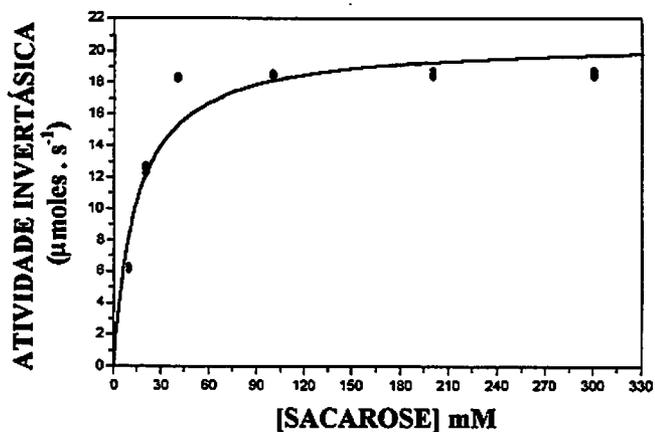


FIGURA 9. Atividade da invertase em lâmina foliar de seringueira em crescimento, em função da concentração de sacarose no meio de incubação. Média de 4 repetições. Curva ajustada segundo Michaelis-Menten.

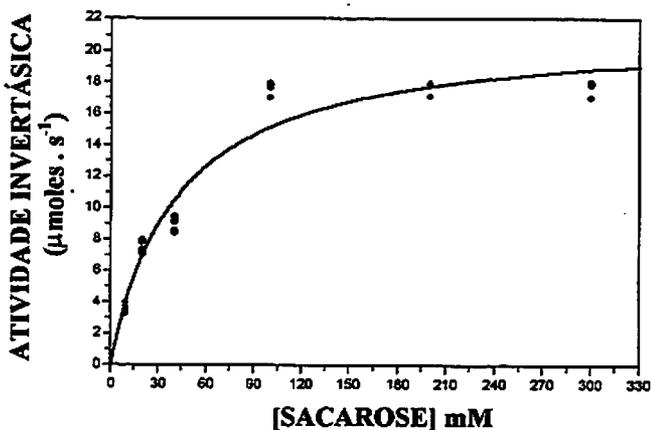


FIGURA 10. Atividade da invertase em lâmina foliar de seringueira completamente expandida, em função da concentração de sacarose no meio de incubação. Média de 4 repetições. Curva ajustada segundo Michaelis-Menten.

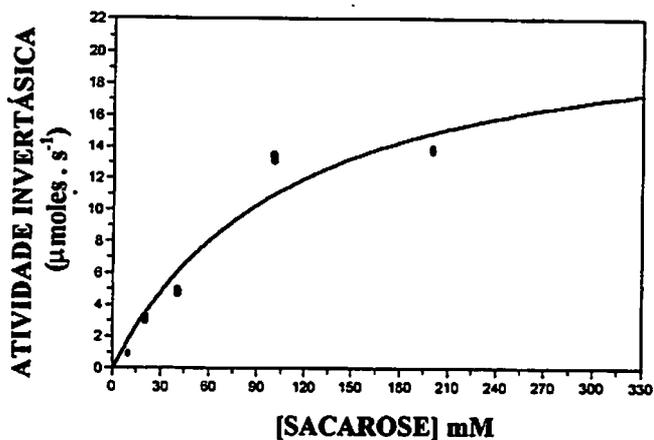


FIGURA 11. Atividade da invertase em tecidos de casca, em função da concentração de sacarose no meio de incubação. Média de 4 repetições. Curva ajustada segundo Michaelis-Menten.

O Quadro 1 apresenta os valores de K_{Mapp} e V_{max} encontrados para os tecidos de lâmina foliar e casca de seringueira na faixa de substrato avaliado na forma de Lineweaver-Burk.

	Folha expandida	Folha em crescimento	Casca
K_{Mapp} (mM)	40,80	13,89	111,34
V_{Mapp} ($\mu\text{moles} \cdot \text{s}^{-1}$)	21,33	20,63	23,15

QUADRO 1. Valores para K_{Mapp} e V_{Mapp} (Lineweaver-Burk) para invertases em tecido foliar completamente expandido em crescimento e casca de seringueira.

4.6.3 Atividade das invertases ácidas e neutras em função da temperatura do meio de reação

A máxima capacidade hidrolítica das invertases em folhas completamente expandidas e em crescimento de seringueira foi máxima a 37°C para as invertases neutras e ácidas (Figura 12). Em temperaturas elevadas, a queda na atividade enzimática pode estar relacionada com alterações físico-químicas na estabilidade da molécula, tornando-a inativa. As enzimas são moléculas complexas, suas atividades catalíticas provêm de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada, de modo a formar os sítios específicos de ligação com o substrato e o centro catalítico. Ao absorver energia pelo aumento da temperatura do meio de reação, essas ligações podem se romper até atingir um máximo, correspondente à chamada "temperatura ótima", decrescendo rapidamente devido à desnaturação da enzima (Segel, 1979).

A taxa da maioria das reações químicas aumenta com o aumento da temperatura, levando a uma maior energia cinética para as moléculas dos reagentes, ocasionando maior número de colisões produtivas por unidade de tempo (Segel, 1979).

As invertases são enzimas bastante tolerantes às altas temperaturas. Oliveira (1985) observou atividade dessas enzimas em temperaturas de aproximadamente 40°C, tanto para as invertases ácidas quanto para as neutras. Pelos resultados obtidos, a temperatura de 37°C foi utilizada nos ensaios deste trabalho.

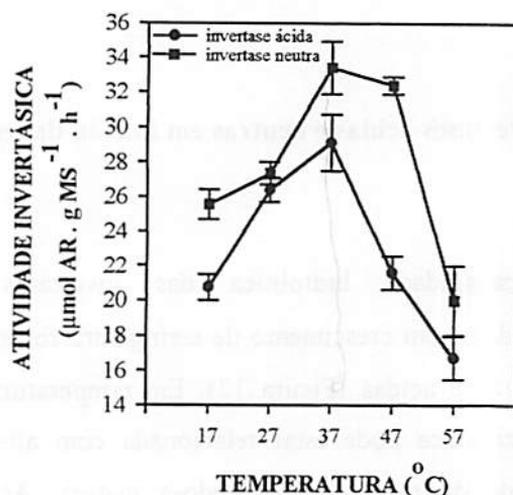


FIGURA 12. Atividade de invertases ácidas e neutras, em função da temperatura em lâmina foliar completamente expandida. Média de 4 repetições.

4.7 Variação sazonal do pH no látex fresco

O pH medido no látex fresco (Figura 13) apresentou, de maneira geral, valores superiores para o clone GT-1 e variou significativamente ($P < 0,01$) nas diferentes épocas para os dois clones.

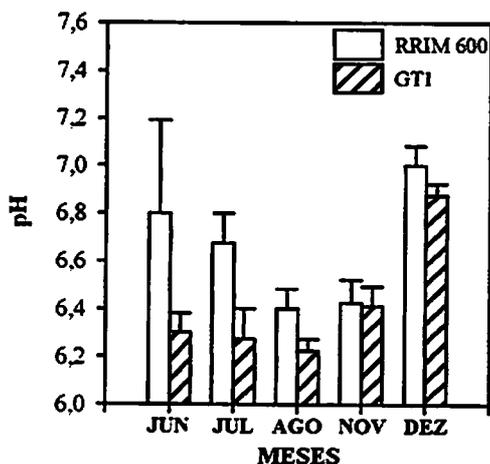


FIGURA 13. Variação sazonal dos valores médios de pH do látex fresco, em plantas do clone RRIM-600 e GT-1. Média de 4 repetições.

Yeang et al. (1984) estabeleceram uma relação positiva entre o pH do látex e atividade da invertase no soro C em árvores do clone PR 107. No entanto, para árvores do clone RRIM-701, a correlação entre pH do látex e atividade de invertase no soro C não foi estabelecida. A análise das Figuras 13 e 14 sugere, nesse trabalho, uma certa relação entre variação nos valores de pH do látex e atividade da invertase no soro C. Esses resultados mostram a grande importância do pH dos compartimentos subcelulares nos processos de produção. Maiores valores de pH contribuem para manter a integridade dos lutóides, os quais, quando apresentam as membranas intactas, favorecem um pH mais elevado entre compartimentos celulares. Baixos valores de pH nos períodos mais secos resultam numa extensiva porosidade dos lutóides, o que causa uma acidificação do citoplasma (Yeang et al., 1986; Tupy, 1969), desfavorecendo a síntese de isoprenóides e o fluxo de látex.

Segundo Tupy (1973 a) e Jacob et al. (1988 a), a invertase no látex é extremamente sensível à oscilação de pH. Observa-se, pela Figura 13, que valores maiores para pH foram encontrados no período de dezembro para os dois clones. Segundo Yeang (1984) e Sá (1991), os valores de pH do látex podem variar de acordo com a época do ano, como observado nesse trabalho, pelo sistema de sangria usado e a interação desses dois fatores. D'Auzac et al. (1988) observaram que o etileno tem efeito estreito na produção de látex e alcalinização do citosol laticífero em *Hevea*. A alcalinização do citosol favorece a atividade de certas enzimas, incluindo as invertases neutras, enzima chave no metabolismo do sistema laticífero, e também outras enzimas de igual importância, como a PEPcase. A maior atividade dessas e de outras enzimas favorece o aumento na produção do látex.

A Figura 13 mostra as variações de pH do látex nos clones RRIM-600 e GT-1 nas diferentes épocas de avaliação. Os menores valores de pH para os dois clones foram observados naqueles períodos mais secos e com menores temperaturas, julho e agosto. Por serem pH mais ácidos e menos favoráveis ao metabolismo observa-se que há uma coincidência com o início da senescência foliar e períodos menos produtivos.

Pela Figura 13 observa-se que maiores valores de pH ocorreram em dezembro, tanto para o clone RRIM-600 como para GT-1, período de maior ocorrência de chuvas.

4.8 Atividade da invertase no látex para os clones RRIM- 600 e GT-1

Observa-se na Figura 14 que a atividade enzimática variou com o grau de enfolhamento da copa. No início da senescência foliar, que coincide com as épocas de menores temperaturas e precipitações, há uma queda na atividade da invertase no látex e na produção. Após iniciar o reenfolhamento, a atividade da

enzima volta a aumentar.

São particularmente importantes as informações obtidas sob condições de baixa temperatura, pois os trabalhos disponíveis sobre o padrão diurno de comportamento hídrico dessa espécie e produção de látex (Paarderkkoper & Sookmark, 1969; Devakumar et al., 1988; Vijakumar et al., 1988; Rao et al., 1990) foram gerados em condições hídricas variadas, mas sempre em regiões sujeitas a temperaturas elevadas ao longo do ano. A capacidade catalítica de uma enzima envolve a interação do organismo com fatores que sinalizam para maior ou menor atividade dessa enzima e esses fatores são influenciados por condições ambientais.

Yeang et al. (1984), acompanhando a variação sazonal da atividade da invertase, verificaram que, nos meses de temperaturas mais baixas, houve uma menor atividade dessa enzima. Nessa mesma época, os mesmos autores observaram que o índice de obstrução aumentou e, conseqüentemente, o fluxo inicial do látex, quantidade total de látex escoada e a produção diminuíram. A atividade da invertase no látex é correlacionada negativamente à facilidade de obstrução dos vasos laticíferos e positivamente à produção de látex (Tupy, 1973).

O envolvimento da invertase na produção de látex está no fornecimento de glicose e frutose, produtos da hidrólise de sacarose. Esses açúcares são rapidamente metabolizados e sua concentração no látex não refletem, necessariamente, sua importância (Yeang et al., 1984).

A atividade de invertase no látex foi avaliada no clone RRIM- 600 em épocas diferentes do ano, observando-se a fenologia da planta durante as avaliações. Observa-se, na Figura 14, uma variação na atividade da enzima no látex nos diferentes estádios fenológicos da planta no clone RRIM-600. Maiores valores para atividade foram observados nas amostras de látex tratado com Triton- X100 (látex total) em todas as épocas, sendo que, nos períodos em que as plantas apresentavam maior densidade de copa, a atividade da invertase foi maior.

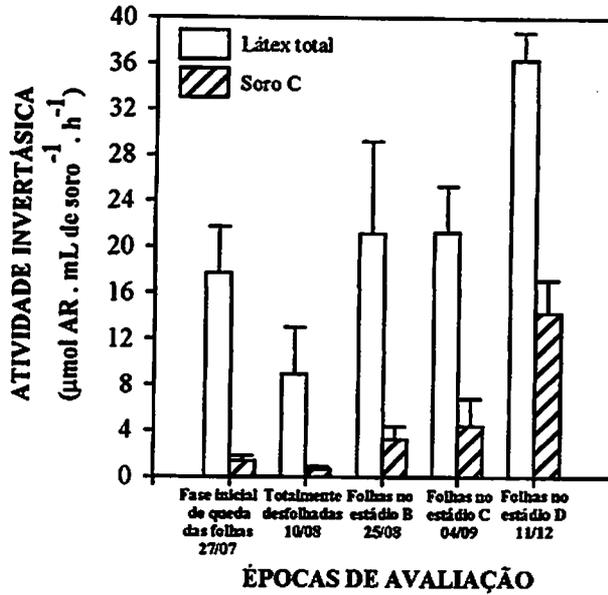


FIGURA 14. Atividade invertásica no látex total e no soro-C em função da variação da densidade da copa das plantas de seringueira no clone RRIM-600. Média de 4 repetições.

Pelos resultados apresentados na Figura 15, observa-se que, no clone RRIM-600, a atividade da invertase foi bastante superior que aquela encontrada no clone GT-1, sendo que esse último clone também apresentou valores de pH (Figura 13) e produção inferiores ao clone RRIM-600 (Figura 4).

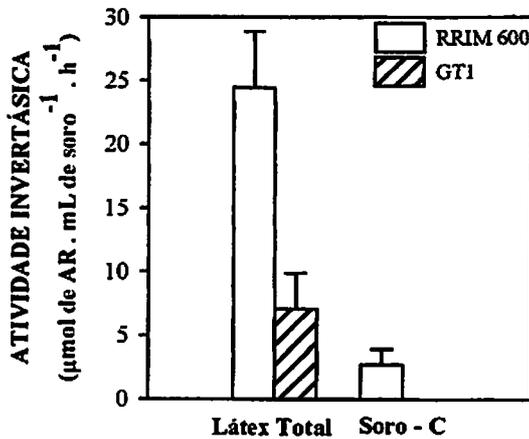


FIGURA 15. Atividade invertásica no látex total e no soro-C para os clones RRIM-600 e GT-1. Média de 4 repetições.

A perda de folhas nos dois clones em julho atingiu um máximo próximo ao dia 25, período em que a atividade da invertase no látex foi menor no clone RRIM-600. O clone GT-1 nesse período já não estava produzindo o suficiente para a determinação da atividade da invertase.

Durante as coletas foi possível observar diferenças na produção de látex nas diferentes árvores de um mesmo clone, o que pode ser devido à própria variabilidade genética característica dessa cultura e deve ser objetivo de estudos futuros.

Jacob et al. (1982), trabalhando nas mesmas condições ambientais com os clones PB 86, PB 5/51, PR 107, GT-1, RRIM 501, RRIM-600 e RRIM 605, obtiveram resultados semelhantes e observaram que, nesse período, o fluxo de látex foi menor e o teor de extrato seco maior. Frequentemente observa-se que a diminuição do extrato seco é menor nos períodos chuvosos e aumenta em épocas de seca, que são períodos de alta e baixa produção, respectivamente.

Os maiores valores de atividade da invertase neutra para os dois clones

foram encontrados no látex tratado com Triton-X100 (Figura 15), no qual a atividade é medida na fração do soro C mais o soro liberado pelo rompimento de lutóides após o tratamento com esse detergente. A contribuição precisa da invertase dos vários componentes do látex além do soro C não é bem definida, mas a diferença na atividade da enzima no soro C e no látex total e alguns fatores como o pH em que a reação é ensaiada, são influenciadores dos resultados obtidos. Quando se trabalha com o látex total tratado com Triton-X100, a atividade da invertase não é influenciada pelo pH do látex, pois a reação acontece em pH 7,4 determinado pelo tampão, valor ideal de pH para atividade de invertase em *Hevea* (Yeang et al., 1984). No soro C, o ensaio é realizado no pH natural do látex fresco que, em algumas épocas, foi bastante diferente de 7,4 (Figura 13).

Tupy (1988) identificou uma baixa atividade de invertase no soro C em pH próximo de 6,5. Esse mesmo autor atribui um aumento na atividade da invertase no soro C, após estimulação com ethrel, que contribui para a elevação do pH no látex. Um maior entendimento da correlação entre a utilização de estimulantes para produção e atividade da referida enzima podem ser estudados futuramente.

5 CONCLUSÕES

Os maiores valores de produção de borracha seca foram observados em dezembro (verão) e coincidem com o período de maiores ocorrências pluviométricas e temperaturas médias mais elevadas em relação às observadas em agosto (inverno).

A atividade das invertases, assim como a produção de látex, em geral foram mais elevadas no clone RRIM-600. Os valores de pH observados no látex coletado nas plantas desse clones em diferentes épocas de avaliação também foram mais elevados.

As condições climáticas verificadas em dezembro contribuíram para maior translocação e acúmulo de açúcares para a casca, local de síntese do látex, e para maior atividade de invertase nas lâminas foliares, casca e látex, coincidindo com o aumento da produção de borracha seca. As temperaturas mínimas observadas em agosto foram bem inferiores àquelas observadas em dezembro. Este parâmetro climático parece ser bastante influente na produção de látex, uma vez que as invertases se mostraram bastante sensíveis às baixas temperaturas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGONDA, V. & PAHLICH, E. Water stress on proline content and enzyme activities in barley seedlings. *Phytochemistry*, Oxford, 30(4): 1093-4. 1991.
- BAKER, D. A. & MILBURN, J.A.; *Transport of assimilates*. New York. Longman Scientific, 1989, 349p.
- BENZIONI, A., & MILLS, D. The effect of water status and season on the incorporation of $^{14}\text{CO}_2$ and $[^{14}\text{C}]$ acetate into resin and rubber fractions in guayule. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, 81: 45-50, Jan. 1991.
- BOYER, J. S. Leaf enlargement and metabolic rates in corn, soybean and sunflower at various leaf water potencial. *Plant Physiology*, Maryland, 46: 233-5, Aug. 1970.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Irrigação. Departamento Nacional de Meteorologia. Normas Climatológicas, Departamento Nacional de Meteorologia. Brasília, 1992. 84p.
- BRAZOWSKA, J.; HANOWER, P.; CHEZEAU, R. Free amino acids of *Hevea brasiliensis* latex. *Experientia*, p.894-896, 1973.
- BUTTERY, B.R.; BOATMAN, S.G. Turgor pressures in phloem: measurements on *Hevea brasiliensis* latex. *Science*, v.145, p.285-286, 1964.
- CABALLERO, J. I.; VERDUZCO, C. V.; GLÁN, J. M. & JIMÉNEZ, E. S. Proline accumulation as a symptom of drought stress in maize: A tissue differentiation requirement. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 39:(204): 889-97, 1988.
- CAIRO, P.A.R. Aspectos biofísicos e metabólicos de plantas jovens de espécies florestais associadas a disponibilidade de água no solo. Lavras: ESAL, 1992. 124p. (Tese de Mestrado)

- CARMO, D.N. do & FIGUEIREDO, M. de SOUZA. Solos para seringueira manejo e conservação. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 11(121): 13-7, jan. 1985.
- CASCARDO, J.C. DE M. Comportamento biofísico, nutricional e metabólico de plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), em função da aplicação de gesso e da disponibilidade de água no solo. Lavras: ESAL, 1991. 130p. (Tese de Mestrado)
- CASTRO, P.R.C. Bases fisiológicas da produção e da estimulação de *Hevea brasiliensis*. In: BERNARDES, M.S. Sangria da seringueira. Piracicaba: ESALQ/USP-FEALQ, 1990. p.1-25.
- CHAVES, M.M Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany*, v.42, p.1-16, 1991.
- COMPAGNON, P. Le caoutchou naturel: biologie, culture, production, Paris: Maisonneuve & Larose, 1986. 356p.
- CONDURÚ NETO, J.M.H. Fatores limitantes e parâmetros fisiológicos da produção da seringueira. Belém: FCAP, 1986. 20p.
- CORREA, A F. F.; RANZANI, G. & FERREIRA, L.G.R. Relações entre o déficit hídrico e alguns processos fisiológicos e bioquímicos em quatro clones de seringueira. *Acta Amazônica*, Manaus, 16/17(único): 3-12, 1986/87.
- COSTA, J.R.L.; SERCILOTO, C.M.; OLIVEIRA, L.E.M. DE; LIMA, D.U. DE; GUERRA NETO, E.G. Avaliação do comportamento fenológico de clones de seringueira (*Hevea spp*) na região de Lavras no período de julho de 1995 a julho de 1996. In: Seminário de Iniciação Científica da UFJF, Juiz de Fora, 1996. Resumos Minas Gerais: MEC/UFJF, 1996, P.17.
- CRETIN, H. Contribution à l'étude des facteurs limitant la production du latex d'*Hevea brasiliensis*. Rapp. D'élève 2° année ORSTOM. Adiiopodoumé, 1978.
- D'AUZAC, J. Factors involved in the stopping of flow after tapping. In: D'AUZAC, J.; JACOB, J.L. & CHRESTIN, N. *Physiology of rubber tree latex*. Boca Raton, CRC, 1988 b. p.85-257.

- D'AUZAC, J. & JACOB, J.L. The composition of latex from Hevea as a laticiferous cytoplasm. In: D'AUZAC, J.; JACOB, J.L. & CHRESTIN, N. *Physiology of Rubber Tree Latex*. Boca Raton, CRC, 1988 p.59-96.
- D'AUZAC, J. & JACOB, J. L. Tapping system and area of drained bark. In: D'AUZAC, J.; JACOB, J.L. & CHRESTIN, N. *Physiology of Rubber Tree Latex*. Boca Raton, CRC, 1988 a p.221-32.
- DAVIES, H. V.; JEFFERIES, R. & SCOBIES, L. Hexoses accumulation in cold storage tubers of potato (*Solanum tuberosum*): the effects of water stress. *Journal of Plant Physiology* 134: 471-475, 1989.
- DELÚ FILHO, N. Efeito do N-NO₃⁻ sobre o crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea Brasiliensis* Muell. Arg.). Lavras: UFLA, 1994, 87p. (Tese de Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- DEVAKUMAR, A.S.; RAO, G.G.; RAJOGOPAL, R.; RAO, P.S.; GEORGE, J.; VIJAYAKUMAR, K.R. & SETHUAI, M.R. Studies on soil-plant-atmosphere in Hevea: II Seasonal effects on water relations and yield. *Ind. J. Nat. Rubber. Res.*, 1: 45-60, 1988.
- DRAETTA, I.S. Isolamento, Purificação e Cinética da Invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. *Colet. Inst. Tecnol. Alim.* 4: 23-37, 1971/72.
- ECHEVERRIA, E.; BURNS, J.; FELLE, H. Compartmentation and cellular conditions controlling sucrose breakdown in mature acid lime fruits. *Phytochemistry*, 31: 4091-4095, 1992.
- FLEISCHMACHER, O. L.; PRADO, F. E. & SAMPIETRO, A. R. Cell wall invertases from apex and callus tissues of sugar cane. *Plant Cell Physiol.*, 21:1273-1281, 1980.
- FOX, T.C. & GEIGER, D.R. Osmotic response of sugar beet leaves at CO₂ compensation point. *Plant Physiology*, Maryland, 80:239-241, jan. 1985.
- GAYLER, K.R. & GLASZIOU, K.T. Physiological function of acid and neutral invertases in growth and sugar storage in sugar cane. *Physiol. Plant.*, 27: 25-31, 1972.

- GEIGENBERGER, P. & STITT, M. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissue. **Planta**, 189: 329-339, 1993
- GEIGER, D.R. Understanding interactions of source and sink regions of plants. **Physiol. Biochem.**, 25: 659-66, 1987.
- GIAQUINTA, R. Phloem loading of sucrose: Involvement of membrane ATPase and proton transport. **Plant Physiol.** , 63: 744-748, 1979.
- GIAQUINTA, R. Source and sink leaf metabolism in relation to phloem translocation In: Carbon partitioning and enzymology **Plant Physiol.** , 61: 380-385, 1978.
- GIAQUINTA, R. Sucrose hydrolysis in relation to phloem translocation in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol.** , 60: 339-343, 1977.
- GLASZIOU, K.T. & WALDRON, J.C. The regulation of invertase synthesis in sugar-cane. Effects of sugars, derivatives and polyhydric alcohols. **Australian Journal Biological Science**, Melbourne, 17: 609-618, 1964.
- GLASZIOU, K.T. & BULL, T.A. The relation between total invertase activity in sugar-cane stalks. In: 12th Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists. **Proceedings**, p. 575-581. 1965.
- GLASZIOU, K.T. & GAYLER, K. R. Storage of sugar in stalks of sugarcane. **Bot. Rev.** , 38: 471-490, 1972.
- GOMES, A .R.S. & KOZLOWSKI, T.T. Stomatal characteristics, leaf waxes, and transpiration rates of *Theobroma cacao* and *Hevea brasiliensis* seedlings. **Annals of Botany**, Cambridge, 61: 425-32, apr. 1988.
- GOMEZ, J.B.; SIVANADYAN, K.; LEONG, S. K. & GHANDIMATHI, H. The concept of harvest index as applied to Hevea. **J. Rubb. Res.**, 4: 86-92, 1989.
- HANDA, S.; BRESSAN, R.A; HANDA, A K.; CARPITA, N.C. & HASEGAWA, P.M. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. **Plant Physiology**, Maryland, 73: 834-43, Nov. 1983.

- HANSON, A.D. & HITZ, W.D. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, 33: 163-203, 1982.
- HATCH, M.D. & GLASZIOU, K.T. Direct evidence for translocation of sucrose in sugarcane leaves and stems. *Plant Physiol.*, 38: 180-184, 1964.
- HATCH, M.D. & GLASZIOU, K.T. Sugar accumulation cycle in sugarcane. II. Relationship of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of plant grown in controlled environments. *Plant Physiology*, Washington, 38:344-348, 1963.
- HAWKER, J.S. Insoluble invertase from grapes: not an artifact of extraction. *Phytochemistry*, 8: 337-344, 1969.
- HAWKER, J.S. & HATCH, M.D. Mechanism of sugar storage by mature stem tissue of sugarcane. *Physiologia Plantarum*, København, 18:444-453, 1965.
- HUBER, S. C & HUBER, J. L. Role of sucrose-phosphate-synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiol.*, 99: 127-1278, 1992.
- HUBER, S. C. Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. *Plant Physiol.*, 91: 656-662, 1989.
- ISLA, M. I.; VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, A. R. Hydrolysis of sucrose within isolated vacuoles from *Solanum tuberosum* L. tubers. *Planta*, 205: 601-605, 1998.
- ISLA, M. I.; LEAL, D. P.; VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, A. R. Cellular localization of the invertase, proteinaceous inhibitor and lectin from potato tubers. *Phytochemistry*, 31: 1115-1118, 1992.
- ISLA, M. I.; VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, A. R. Modulation of potato invertase activity by fructose. *Phytochemistry*, 30: 423-426, 1991.
- JACOB, J.L.; SERRES, E.; PREVOT, J.C. LACROTE, R.; VIDAL, A.; ESCHBACH, J.M.; D'AUZAC, J. Elaboración del diagnóstico látex del hevea. *Agritrop*, v.12, p.101-122. 1988.
- JACOB, J.L.; SERRES, E.; PREVOT, J.C. LACROTE, R.; VIDAL, A.; ESCHBACH, J.M.; D'AUZAC, J. Mise au point du diagnostic latex chez l'hevea. *Agritrop*, v.12, p.97-115. 1988a.

- JACOB, J.L.; PREVOT, J.C. and D'AUZAC, J. Physiological activators of invertase from *Hevea brasiliensis* latex. *Phytochemistry*, vol.21, n°4: 851-853, 1982.
- JOYCE, P.S.; PALES, L.G. & ASPINALL, D. The requirement for low-intensity light in the accumulation of proline as a response to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 35(51): 209-18, Feb. 1984.
- KARAMI, E.; KRIEG, D.R.; QUISENBERRY, J.E. Water relations and carbon-14 assimilation of cotton with different leaf morphology. *Crop Science*, Madison, 20:421-26, july/aug. 1980.
- KRAUSE, K. P.; REIMHOLZ, R.; HAMBORG NIELSEN, T.; SONNEWALD, U.; STITT, M. Sucrose metabolism in cold-storage potato tubers with decreased expression of sucrose phosphate synthase. *Plant Cell and Environment*, 21: 285-299, 1998.
- LEATHERBARROW, R. J. *Enziffiter manual biosalf*. London. p. 13-42, 1987.
- LEIGH, R. A. The role of the vacuole in accumulation and mobilization of sucrose. *Plant Growth Regul.* 2: 339-346, 1984.
- LEIGH, R. A.; REES, T.; FULLER, W. A.; BANFIELD, J. The location of invertase and sucrose in the vacuoles of storage roots of beetroot (*Beta vulgaris*). *Biochem. J.*, 178: 539-547, 1979.
- LEMONS, G.B. de. Crescimento e atividade de enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. Lavras: UFLA, 1996, 56p. (Tese de Mestrado).
- LIMA, D. U. Avaliação sazonal da produção de borracha e do metabolismo do carbono e do nitrogênio em plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas em Lavras, Minas Gerais. Lavras: UFLA, 1998, 71p. (Tese de Mestrado).
- LUDLOW, M. M. Adaptive significance of stomatal response to water stress. In: TURNER, N. C. & KRAMER, P. J. eds. *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress*. New York, Wiley, 1980. p. 123-38.

- MATSUSHITA, K. & URITANI, I. Change in invertase activity of sweet potato in response to wounding na purification and properties of its invertases. *Plant Physiol.*, 54: 60-66, 1974.
- MEYER, R.F. & BOYER, J.S. Osmoregulation, solute distribution and growth in soybean seedlings having low water potentials. *Planta*, New York, 151:882-9, apr. 1981.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, v.31, p.426-428, 1959.
- MILFORD, G. F. J.; PAARDEKOOPEER, E. C.; ANDHO, C. Y. Latex vessel plugging. Its importance to yield and clonal behaviour. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21: 274, 1968.
- MONTENY, B.A. Contribution a l'étude des interactions vegetation-atmosphère en milieu tropical humide. Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay. Paris, 1987.
- MORGAM, J. M. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiol.* Palo Alto, 35: 299-319, 1984.
- NASCIMENTO, R. Assimilação de sacarose e atividade de invertase em frutos de soja (*Glicina max*) em desenvolvimento. Viçosa: UFV, 1994. 49p. (Tese de Mestrado).
- NEUHAUS, H. E., QUICK, W. P., SIEGL, G. and STITT, M. Control of photosynthate partitioning in spinach leaves. *Planta*, 181: 583-592. 1990.
- OLIVEIRA, L.E.M. Comportamento fisiológico de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) sob condições de deficiência hídrica: Alterações da assimilação de açúcares. Campinas: UNICAMP, 1985. 126p. (Tese de Doutorado).
- ORTOLONI, A. A. Aptidão climática para para cultura da seringueira em Minas Gerais. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 11: (121) 8-12, 1985.

- ORTOLONI, A.A.; PEDRO JÚNIOR, M.J.; ALFONSI, R.R.; CAMARGO, A.P. de & BRUNINI, O. Aptidão agroclimática para a regionalização da heveicultura no Brasil. In: Seminário Nacional sobre Recomendações de Clones de Seringueira, 1, Brasília. 1982. Anais... Brasília, EMBRAPA, 1983, p.17-28.
- OUTLAW, W. H.; FISHER, D. B.; CHRISTY, A. L. Compartmentation in *Vicia faba* leaves. II. Kinetics of ¹⁴C-sucrose redistribution among individual tissue following pulse labeling. *Plant Physiol.*, 55: 704-711, 1975.
- PAARDEKOOPEL, E.C.; SOOKMARK, S. Clonal variation in latex flow pattern. *Journal of Rubber Research Institute of Malaya*, v.21, p.264-273, 1969.
- PAARDEKOOPEL, E.C.; SOOKMARK, S. Diurnal variation in latex yield and dry rubber content, and relation to saturation deficit of air. *Journal of Rubber Research Institute of Malaya*, v.21, p.341-347, 1969.
- PAKIANATHAN, S.W.; HARIDAS, G.; D'AUZAC, J. Water relations and latex flow. In: D'AUZAC, J.; JACOB, J.L.; CHRESTIN, H. *Physiology of Rubber Tree Latex*. Boca Raton: CRC, 1988. P.233-256.
- POLLOCK, C. J. & RESS, T. Activities of enzymes of sugar metabolism in cold stored tubers of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 14: 613-617, 1975.
- POLLOCK, C. J. & LLOYD, E. J. The distribution of acid invertase in developing leaves of *Lolium temulentum* L. *Planta*, 133: 197-200, 1977.
- PONTIS, H. G. Riddle of sucrose. In: NORTHCOLE, D. H., ed. *International Review of Biochemistry II*. Baltimore, University Park Press, 1977. V.13, p.79-117.
- PRADO, F.E.; SAMPIETRO, A.R. & VATTUONE, M. A. Ammonium heptamolybdate, an inhibitor of plant invertase. *Phytochemistry*, 18: 1799-1802, 1979.
- PRESSEY, R. & SHAW, R. Effect of temperature on invertase, invertase inhibitor and sugar in potato tubers. *Plant Physiol.* 41: 1657-1661, 1966.
- PRESSEY, R. Role of invertase in the accumulation of sugar in cold stored potatoes. *American Potato Journal* 46, 291-297, 1969.

- QUICK, P.; SIEGL, G.; NEUHAUS, E.; FEIL, R. & STITT, M. Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. *Planta*, New York, 177:535-46, apr. 1989.
- RAO, G.G.; RAO, P.S , RAJOGOPAL, R.; DEVAKUMAR, A. S.; VIJAYAKUMAR, K.R. & STHURAJ, M. Influence of soil, plant and meteorological factors on water relations na yield in Hevea. *Int. J. Biometeorol.*, 34: 175-180, 1990.
- REDINBAUGH, M.G.; CAMPBELL, W.H. Higher plant response to enviromentae nitrato. *Physiologica Plantarum*, Copenhagen, v.82, n.4, p.640-650, Aug. 1991.
- REED, G. *Enzymes in Food Processing*. New York, Academic Press, 1975.
- RESNIK, M. E. & MENDES, L. F. Water relations of young potatted rubber plants subjected to various degrees of water stress. *Revista Theobroma*, Itabuna, 9(4): 185-95, nov. 1979.
- RIBAILLIER, D. Quelques aspects du rôle des lutoides dans la physiologic de l'écoulement du latex d'*Hevea brasiliensis*. Action de produits libérant l'éthylene. *Physiol. Veg.* 9: 1091, 1972.
- RIBAILLIER, D. Étude de la variation saisonnière de quelques propriétés du latex d'*Hevea brasiliensis*. *R.G.C.P.* ,48: 1091-1093., 1971.
- RICARDO, C.P.P. Alkaline β -fructofuranosidases of tuberous roots: possible physiological function. *Planta*, Berlin, 118: 333-343, 1974.
- RICARDO, C.P.P & REES, T. Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochemistry*, 9: 239-247, 1970.
- SÁ, T.D. Avaliação ecofisiológica de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) submetida a diferentes intensidades de sangria, em ambientes contrastantes do Estado de São Paulo. Campinas: UNICAMP, 1991. 114p. (Tese de Doutorado).
- SACHER, J.A.; HATCH, M.D ; GLASZIOU, K.T. Sugar accumulation cycle in sugarcane.III. Physical and metabolic aspect of cycle in immature storage tissue. *Plant Physiology* , Washington, 38: 348-354, 1963.

- SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. & PRADO, F. E. A regulatory invertase from sugar cane leaf sheaths. *Phytochemistry*, 19: 1637-1642, 1980.
- SEGEL, H.I. **Enzyme kinetics behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems.** Wiley-Interscience, New York, 885p. 1979.
- SETHURAJ, M.R. Physiology of growth and yield in *Hevea brasiliensis*. In: **Proc.Int. Rubb. Conf.**, 1985, v.3, Kuala Lumpur, RRIM. 1986.
- SLACK, C.R. The physiology of sugarcane.VIII. Diurnal fluctuations in the activity of soluble invertase in elongating internodes. **Australian Journal of Biological Sciences.** Melbourne, 18: 781-788, 1965.
- TUPY, J. Sucrose supply and utilization for latex production. In: D'AUZAC, J. ; J.L. & CHRESTIN, H. **Physiology of Rubber Tree Latex.** Boca Raton, CRC, 1988: p. 179-218.
- TUPY, J. Some aspects of sucrose transport and utilization in latex producing bark of *Hevea brasiliensis* Muell. **Arg. Biol. Plant.**, p.51-64, 1985.
- TUPY, J. The activity of latex invertase and latex production in *Hevea brasiliensis* Muell. **Arg. Physiologie Végétale**, v.11, p.633-641,1973
- TUPY, J. Stimulatory effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 1-naphthylacetic acid on sucrose level, invertase activity and sucrose utilization in the latex of *Hevea brasiliensis*. **Planta**, 88: 144, 1969.
- VANCE, N.C. & ZAERR, J.B. Analysis by high-performance liquid chromatography of free amino acids extracted from needles of drought-stressed and shade *Pinus ponderosa* seedlings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 79: 23-30,May 1990.
- VATTUONE, M. A.; FLEISCHMACHER, O. L.; PRADO, F. E.; LOPEZ VIÑALS, A. ; SAMPIETRO, A. R., Localization of invertase activities in *Ricinus communis* leaves. *Phytochemistry*, 22: 1361-1365, 1983.
- VATTUONE, M. A.; PRADO, F.E. & SAMPIETRO, A. R. Cell wall invertase from sugar cane. *Phytochemistry*, 20: 189-191. 1981.

- VJAKUMAR, K.R.; RAO, G.; RAO, P.; DEVAKUMAR, A.S.; GEORGE, M.J. & SETHURAJ, M.R. Physiology of drought tolerance of *Hevea*. In: Conference *Hevea* 88, Paris, 1988. IRRDB-IRCA/CIRAD, Montpellier. 1988. p.125-8.
- WARDLAW, I. F. The control of carbon partitioning in plants. *New Phytol.*, 116: 341-381, 1990.
- WEBSTER, C. C.; PAARDEKOOPEER, E.C. The botany of the rubber tree. In: WEBSTER, C.C.; BAULKWILL, W.J. *Rubber*. New York: Longman Scientific & Tech.; 1989. p.57-84.
- YEANG, H.Y.; JACOB, J. L.; PREVOT, J. C.; VIDAL, A. Invertase activity in *Hevea* latex serum: interaction between pH and serum concentration. *J. Nat. Rubb. Res.* 1-16, 1986.
- 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*, v.32, p.50-62, 1984.
- YEMM, E.W.; COCCKING, E.C. The determination of amino acid with ninhydrin. *Analyst*, London, 80: 209-13, 1955.
- YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *The Biochemical Journal*, London, p.508-514, 1954.
- ZRENNER, R., SCHULER, K. & SONNEWALD, U. Soluble acid invertase determines the hexoses to sucrose ratio in cold-stored tubers. *Planta* 198: 246-252, 1996.

7 ANEXO

	Página
TABELA 01 Resumo da análise de variância para teores de aminoácidos totais, proteínas solúveis totais, açúcares solúveis totais(AST), açúcares redutores (AR) e amido, nos clones RRIM-600 e GT-1 em diferentes épocas.....	65
TABELA 02 Médias para teores de aminoácidos e proteínas solúveis totais.....	65
TABELA 03 Médias para teores de açúcares solúveis totais(AST), açúcares redutores (AR) e amido.....	65
TABELA 04 Resumo da análise de variância para teores de aminoácidos totais, proteínas solúveis totais, açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido, nos clones RRIM-600 e GT-1 em lâminas foliares, estádios B e D.....	66
TABELA 05 Médias para teores de aminoácidos e proteínas solúveis totais, para os clones RRIM-600 e GT-1 em diferentes épocas.....	66
TABELA 06 Médias para teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido, para os clones RRIM-600 e GT-1 em diferentes épocas.....	66
TABELA 07 Resumo da análise de variância para potencial hídrico foliar e produção de látex, para os clones RRIM-600 e GT-1 em diferentes épocas.....	67
TABELA 08 Médias para potencial hídrico foliar.....	67
TABELA 09 Médias para produção de látex.....	67

TABELA 10	Resumo da análise de variância de valores de pH do látex em diferentes épocas de avaliação para RRIM-600 e GT-1.....	68
TABELA 11	Médias de valores de pH do látex nas diferentes épocas de avaliação.....	68
TABELA 12	Resumo da análise de variância para a variação da atividade de invertase em função da temperatura do meio de incubação.....	68
TABELA 13	Médias da variação da atividade de invertase em função da temperatura do meio de incubação.....	69
TABELA 14	Resumo da análise de variância da atividade da invertase em função da concentração de sacarose no meio de incubação.....	69
TABELA 15	Média da variação da atividade da invertase em função da concentração de sacarose no meio de incubação.....	69
TABELA 16	Resumo da análise de variância para a variação da atividade da invertase no soro C e no látex tratado com triton X100.....	70
TABELA 17	Médias da variação da atividade de invertase no soro C e no látex tratado com triton X100.....	70
TABELA 18	Resumo da análise de variância para a variação da atividade de invertase em função do pH do meio de incubação.....	70
TABELA 19	Médias da variação da atividade de invertase em função do pH do meio de incubação.....	71

TABELA 01 - Resumo da análise de variância para teores de aminoácidos totais, proteínas solúveis totais, açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido, nos clones RRIM-600 e GT-1 em diferentes épocas.

FV	GL	Aminoácidos	Proteínas	AST	AR	Amido
Bloco	3	473,679	2,220	433,260	12,885	0,611
Clones	1	346,146 ns	157,879 **	1187,320 *	9797,536 **	136,831**
Erro a	3	1308,703	1,999	70,464	19,524	1,321
Épocas	1	64295,210 **	147,016 **	6,163 ns	197,754 *	1628,324 **
Clone x Épocas	1	11462,916 *	19,448 *	2,948 ns	236,314 **	213,817 **
Erro b	6	1510,841	1,897	265,806	15,664	0,871
Média Geral		125,741	6,513	143,579	72,454	24,102
CV (%)		30,91	21,15	11,36	5,46	3,87

ns - não significativo

* - significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F.

** - significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 02 - Médias para teores de aminoácidos e proteínas solúveis totais.

Clones/ Épocas	Aminoácidos			Proteínas		
	Ago	Dez	Média	Ago	Dez	Média
RRIM-600	157,72 bA	84,47 aB	121,09 a	13,79 aA	5,52 aB	9,67 a
GT-1	220,55 aA	40,24 bB	130,39 a	5,30 bA	1,44 bB	3,37 a
Média	189,13 A	62,35 B	----	9,55 A	3,48 B	----

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 03 - Médias para teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido.

Clone/ Época	AST			AR			Amido		
	Ago	Dez	Média	Ago	Dez	Média	Ago	Dez	Média
RRIM-600	152,38 ^a A	152,01aA	152,19a	97,53aA	96,87aA	97,20a	14,75aB	27,61bA	21,18b
GT-1	136,02bA	133,91bA	134,97b	43,35bB	55,87bA	47,71b	13,28aB	40,77aA	27,03a
Média	144,20 [^]	142,96B	----	68,94B	75,97A	----	14,01B	34,19A	----

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 04 - Resumo da análise de variância para teores de aminoácidos totais, proteínas solúveis totais, açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido, nos clones RRIM-600 e GT-1 em lâminas foliares, estádios B e D.

FV	GL	Aminoácidos	Proteínas	AST	AR	Amido
Bloco	3	1246,905	0,038	3,713	25,875	0,170
Clones	1	6772,386 ns	233,165 **	40,291 ns	12916,777**	42,902 **
Erro a	3	2152,942	3,545	29,611	40,478	1,803
Folhas	1	3972,087 *	24,253 **	9538,940 **	540,005**	0,624 ns
Clone x Folhas	1	1881,434 ns	2,908 ns	696,037 *	0,494	14,784 **
Erro b	6	513,998	1,89	30,191	34,532	0,528
Média Geral		204,889	8,313	119,783	74,748	13,871
CV (%)		11,07	16,54	4,59	7,86	5,24

ns - não significativo

* - significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F.

** - significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 05 - Médias para teores de aminoácidos e proteínas solúveis totais, para os clones RRIM-600 e GT-1 em diferentes épocas.

Clones/ Épocas	Aminoácidos			Proteínas		
	Ago	Dez	Média	Ago	Dez	Média
RRIM-600	210,92 bA	157,72 bB	184,32 a	10,47 aB	13,79 aA	12,13 a
GT-1	230,38 aA	220,55 aA	225,46 a	3,69 bA	5,30 bA	4,49 b
Média	220,65 A	189,13 B	---	7,08 B	9,55 A	---

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 06 - Médias para teores de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e amido, para os clones RRIM-600 e GT-1 em diferentes épocas.

Clone/ Época	AST			AR			Amido		
	Ago	Dez	Média	Ago	Dez	Média	Ago	Dez	Média
RRIM-600	90,36bB	152,38aA	121,37a	108,79aA	97,53aB	103,16a	16,27aA	14,75aB	15,51a
GT-1	100,38*B	136,02bA	118,19a	52,32bA	40,35bB	46,34b	11,07bB	13,39aA	12,24b
Média	95,37B	144,20A	---	80,56A	69,94B	---	13,67A	14,07A	---

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 07 - Resumo de análise de variância para potencial hídrico foliar e produção de látex, para os clones RRIM-600 e GT-1 em diferentes épocas.

FV	Potencial Hídrico		Produção de Látex	
	GL	QM	GL	QM
Blocos	3	0,0592	7	21,5689
Clones	1	0,0578**	1	3153,6062**
Erro a	3	0,0372	7	13,3569
Época	2	4,1890**	4	1238,5155**
Clone x Época	1	0,0089 _{ns}	3	585,3491**
Erro b	6	0,0681	26	43,5037
Média Geral		2,82		13,88
CV (%)		1,39		32,16

ns - não significativo

** - significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 08 - Médias para potencial hídrico foliar.

Clones/ Época	Potencial Hídrico			Média
	Julho	Setembro	Dezembro	
RRIM-600	3,43A	3,36aA	2,08aB	2,96a
GT-1	---	3,29aA	1,92aB	2,60b
Média	3,43A	3,33B	2,00C	---

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 09 - Médias para produção de látex.

Clones/ Época	Produção de Látex					Média
	Jun.	Jul.	Ago.	Nov.	Dez.	
RRIM-600	41,81aA	21,19aB	6,89B	6,28aC	20,20aC	19,47a
GT-1	6,07bA	3,57bA	---	2,31bA	4,44bA	4,64b
Média	23,87A	17,27B	6,89CD	4,75D	12,46BC	---

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 10 - Resumo da análise de variância de valores de pH do látex em diferentes épocas de avaliação para RRIM-600 e GT-1.

FV	pH látex	
	GL	QM
Blocos	3	0,017
Clones	1	0,600**
Erro a	3	0,005
Época	4	0,461**
Clone x Época	4	0,078*
Erro b	24	0,026
Média Geral		6,538
CV (%)		2,44

* - significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F.

** - significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 11 - Média de valores de pH do látex nas diferentes épocas de avaliação.

Clones/Época	Jun.	Jul.	Ago.	Nov.	Dez	Média
RRIM-600	6,800aA	6,675aAB	6,400aB	6,425aB	7,000aA	6,660a
GT-1	6,300aB	6,275aB	6,225aB	6,400aB	6,875aA	6,415b
Média	6,550B	6,475B	6,313B	6,413B	6,938A	

Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 12 - Resumo de análise de variância para variação da atividade de invertase em função da temperatura do meio de incubação.

FV	Invertase Ácida		Invertase Neutra	
	GL	QM	GL	QM
Blocos	3	0,243	3	1,104
Temperatura	4	95,281 **	4	118,440 **
Erro	12	1,494	12	1,652
Média Geral		22,924		27,745
CV (%)		5,33		4,63

** - significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 13 - Médias da variação da atividade de invertase em função da temperatura do meio de incubação.

Temperatura (°C)	Invertase Ácida	Invertase Neutra
17	20,753b	25,566b
27	26,402a	27,355b
37	29,123a	33,408a
47	21,607b	32,390a
57	16,735c	20,006c

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 14 - Resumo da análise de variância da atividade da invertase em função da concentração de sacarose no meio de incubação.

FV	Invertase - folha D		Invertase - folha B		Invertase - casca	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Blocos	3	0,451	3	0,064	3	0,014
Sacarose	5	155,925 **	5	105,296 **	5	143,742 **
Erro	15	0,112	15	0,09	15	0,006
Média geral		12,174		15,445		8,365
CV (%)		2,75		0,60		0,96

** - significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 15 - Média da variação da atividade da invertase em função da concentração de sacarose no meio de incubação.

Sacarose (mM)	Folhas D	Folhas B	Casca
10	3,638d	6,197d	0,935e
20	7,347c	12,485c	3,230d
40	9,145d	18,243b	4,890c
100	17,548a	18,563a	13,322b
200	17,648a	18,593a	13,827a
300	17,717a	18,590a	13,987a

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 16 - Resumo da análise de variância para a variação da atividade da invertase no soro C e no látex tratado com triton X.

FV	Soro C		Látex + Triton X	
	GL	QM	GL	QM
Blocos	3	1,927	3	47,084
Época	4	102,346**	4	393,527**
Erro	12	2,031	12	22,189
Média Geral		4,611		21,055
CV (%)		30,90		22,37

** - significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 17 - Média da variação da atividade da invertase no soro C e no látex tratado com triton X100.

Épocas de Avaliação	Atividade de Invertase no Soro C	Atividade de Invertase no Látex + triton X
Fase final de queda foliar	1,407BC	17,707BC
Desfolhada	0,668C	8,968C
Folhas em estádio B	3,269BC	21,166B
Folhas em estádio C	4,457B	21,010B
Folhas em estádio D	13,254A	36,424A

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 18 - Resumo da análise de variância para a variação da atividade da invertase em função do pH do meio de incubação.

FV	Invertase - folha D		Invertase - folha B		Invertase - casca	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Blocos	3	0,091	3	0,260	3	1,777
pH	14	75,985 **	14	1033,490 **	14	616,657 **
Erro	42	0,222	42	3,258	42	1,158
Média geral		10,109		21,629		15,537
CV (%)		4,66		8,35		6,92

** - significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

TABELA 19 - Médias da variação da atividade da invertase em função do pH do meio de incubação.

Valores de pH	Folhas D	Folhas B	Casca
2,0	1,629J	0,114H	0,105G
2,5	2,953I	0,184H	0,928G
3,0	3,453I	3,132H	1,321G
3,5	7,167H	3,390H	8,097F
4,0	11,583DE	38,305BC	11,930E
4,5	12,670CD	49,740A	13,830E
5,0	15,347A	42,363B	17,464D
5,5	14,306AB	35,430CD	26,937C
6,0	12,553CD	21,016F	28,645BC
6,5	12,717CD	25,431EF	31,361B
7,0	13,587BC	28,029E	34,700A
7,5	13,330BC	13,088D	31,266B
8,0	10,747EF	15,589G	17,799D
8,5	10,150FG	14,730G	6,166F
9,0	9,440G	13,896G	2,502G

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.