



DÉBORA DOMICIANO

**EFEITOS DO ETHREL[®] SOBRE A PRODUÇÃO
E ATIVIDADE DAS INVERTASES EM
SERINGUEIRA, CLONE RRIM 600,
CULTIVADA EM
NEPOMUCENO - MG**

LAVRAS- MG

2015

DÉBORA DOMICIANO

**EFEITOS DO ETHREL® SOBRE A PRODUÇÃO E ATIVIDADE DAS
INVERTASES EM SERINGUEIRA, CLONE RRIM 600, CULTIVADA
EM NEPOMUCENO - MG**

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

Orientador

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Domiciano, Débora .

Efeitos do ethrel[®] sobre a produção e atividade das invertases
em seringueira, clone RRIM 600, cultivada em Nepomuceno-MG /
Débora Domiciano. – Lavras : UFLA, 2015.

77 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Bibliografia.

1. Seringueira. 2. Borracha Natural. 3. Látex. 4. Ethrel[®]. 5.
Invertase. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

DÉBORA DOMICIANO

**EFEITOS DO ETHREL® SOBRE A PRODUÇÃO E ATIVIDADE DAS
INVERTASES EM SERINGUEIRA, CLONE RRIM 600, CULTIVADA
EM NEPOMUCENO - MG**

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

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015.

Dr. Nelson Delú Filho

UNIS – Varginha - MG, Brasil

Dra. Hilda Beatriz Wencomo Cárdenas

Universidade de Matanzas –
Matanzas, CUBA

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira
Orientador

LAVRAS – MG

2015

A minha filha Eloah Domiciano Belo,

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por me amparar em todos os momentos, me dar forças para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades.

Aos meus pais, Ted e Tida, pela segurança de seus passos sempre guiando os meus, pela crença nos meus sonhos e pelo amor e educação que me deram e que fez com que esse momento fosse possível.

A minha filha, Eloah, meu amor maior que inspira cada passo meu.

Ao meu companheiro, Vinícius, por estar ao meu lado na caminhada, me amparando com seu amor nos momentos difíceis e compreendendo as minhas ausências.

Ao Dê e Alan, pelas risadas, conselhos, pela cumplicidade, e principalmente por serem os melhores irmãos do mundo.

A minhas cunhadas, Eliza e Bi, pelo ombro amigo e meus sobrinhos Júnior e Dominique, pela diversão garantida quando estamos juntos.

As minhas tias, Zilda e Narazeth, pela torcida constante.

A Pollyanna Carvalho, pela amizade, por ter segurado a minha mão nos momentos difíceis, por todas as coisas que me ensinou e por sua família maravilhosa que me acolheu em Lavras.

A Débora Oliveira, pelo companheirismo, horas de estudo, por ter sempre um sorriso no rosto, uma palavra amiga e solução para todos os problemas.

A Roseane Oliveira por ter sido a grande incentivadora dessa caminhada, e por tudo que tem feito por mim.

Às amigas Shirley, Rô e Wal que mesmo longe fizeram tudo para tornar mais leve meus fardos.

A Professora Dra. Hilda Beatriz Wencomo Cárdenas por sua amizade e por durante seu Pós-Doc na UFLA, ter me auxiliado nas análises bioquímicas e demais atividades laboratoriais durante a execução desse trabalho.

Ao senhor José Osvaldo Lima Salgado e os funcionários Luiz, Reinaldo e Renildo da Fazenda Carandaí pela colaboração e boa vontade que tornou esse trabalho possível.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade.

Aos amigos do laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas do Programa de Fisiologia Vegetal: Marília, Jaqueline, Márcio e Tanhan pelo convívio e momentos compartilhados

Ao meu orientador, Luiz Edson Mota de Oliveira, pelo exemplo de profissionalismo, pelos conselhos e por todo apoio e confiança, a minha eterna admiração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Muito obrigada!

"Não se pode alcançar um novo objetivo pela aplicação do mesmo nível de pensamento que o levou ao ponto em que se encontra hoje."

- Albert Einstein

RESUMO

A Seringueira, *Hevea brasiliensis* (Willd. ex.Adr. deJuss.), é a principal espécie de seu gênero explorada economicamente pela produção de borracha natural. Dentre os clones de seringueira, o RRIM 600 se destaca por sua boa produtividade e adaptação a vários padrões climáticos e têm demonstrado boa adaptação à região Sul de Minas Gerais, caracterizada principalmente por possuir um período seco bem definido, desfavorável ao desenvolvimento do fungo causador do mal das folhas – *Microcyclus ulei* (P. Henn.) Arx.- fator limitante à expansão da heveicultura no Brasil. Com o intuito de compreender melhor os aspectos fisiológicos relacionados à produtividade do clone RRIM 600 nessa região, foram avaliados os efeitos da estimulação com Ethrel® sobre as enzimas envolvidas no processo de hidrólise da sacarose em tecidos da casca da seringueira e sua relação com a produção de látex, a partir da caracterização bioquímica, com base nas atividades das enzimas invertase neutra do citosol, invertase ácida do vacúolo e invertase ácida da parede celular, após dois períodos de aplicação do estimulante. Para as análises, foram utilizadas amostras da casca de seringueira coletadas nos meses de outubro de 2014 a janeiro de 2015. O trabalho foi conduzido em plantio comercial de seringueira de oito anos, localizado no município de Nepomuceno - MG. Os dados de produção foram obtidos nos respectivos meses, por meio de sangrias no sistema S ½ (d2/d3), a produtividade foi expressa através da razão da produção de borracha seca em g.árvores.sangria⁻¹ e g.cm⁻² de seção.sangria⁻¹, além disso, também foi avaliado o índice de obstrução dos vasos laticíferos. Das características bioquímicas avaliadas, as atividades das enzimas invertase ácida do vacúolo e invertase neutra do citosol apresentaram aumento significativo nas plantas que receberam o tratamento com estimulante. Comportamento semelhante foi encontrado para a produção em g.árvores.sangria⁻¹ e g.cm⁻² de seção.sangria⁻¹, ao passo que o índice de obstrução diminuiu nas árvores que foram estimuladas com Ethrel®. Os dados obtidos confirmam a correlação positiva entre o uso de estimulantes à base de etileno e o desempenho produtivo do clone RRIM 600.

Palavras-chave: Seringueira. Borracha Natural. Látex. Ethrel®. Invertase.

ABSTRACT

The rubber tree, *Hevea brasiliensis* (Willd. ex. ADR. de Juss.) is the main species of its genus economically exploited for the production of natural rubber. Among the rubber tree clones, RRIM 600 stands out for its good productivity and adapt to various weather patterns. Widely cultivated in Minas Gerais the RRIM 600 clone have shown good adaptation to this region, mainly characterized by having a well-defined dry season and therefore unfavorable to the development of the fungus evil leaves (*Microcyclus ulei* (P. Henn.) Arx.), limiting factor to the expansion of rubber trees in Brazil. In order to understand the physiological aspects related to productivity RRIM 600 clone grown in the southern region of Minas Gerais, were assessed the effects of stimulation with Ethrel® on the enzymes involved in sucrose hydrolysis process in tapping tissues. It was also evaluated relationship of the stimulation of latex based on yields of the biochemical characteristics, based on the activities of enzymes neutral cytosol invertase, vacuolar acid invertase and cell wall invertase, after two periods of application of the stimulant. For the analyzes, were used bark of caule samples collected from October 2014 to January 2015. The study was conducted on commercial planting of rubber tree eight years, in municipality of Nepomuceno-MG. Production data were obtained in the respective months, by tapping the bark in system ½ spiral (S) between 2 days to 3 days (d2 / d3), productivity was expressed as the ratio of dry rubber production in grams (gm) by area of the tapping section. The productivity was expressed by the ratio of dry rubber (bs) production gm to area tapping panel (cm²) and (bs)/plant /tapping gm. It was also given the obstruction index of latex vessel. The evaluated biochemical characteristics, the activities of enzymes vacuolar acid invertase, neutral cytosol invertase showed the significant increase in plants that received treatment with stimulant. Similar behavior evaluated for production bs/plant/tapping in grams and to the production area by tapping panel, whereas the index obstruction in the trees stimulated with Ethrel® decreased. The data confirm the positive correlation between the uses of stimulants the basis of ethylene and productive performance of clone RRIM 600.

Keywords: Rubber tree. Natural rubber. Latex. Ethrel®. Invertase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização do município de Nepomuceno, MG.....	35
Figura 2	Temperatura, umidade relativa do ar e índice de precipitação. Na Figura 2A, estão representados os dados climáticos para o ano de 2014 e janeiro de 2015. Na Figura 2B, os mesmos dados são referentes ao período experimental (28 de outubro de 2014 a 06 de janeiro de 2015).....	43
Figura 3	Correlação entre perímetro do caule e espessura da casca das 32 árvores avaliadas.....	45
Figura 4	Atividade da invertase ácida do vacúolo (IAV). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P<0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem Ethrel® (CE e SE) em cada tempo e letras minúsculas comparam o efeito do tempo em cada tratamento.....	52
Figura 5	Atividade da invertase neutra do citosol (INC). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P<0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem Ethrel® (CE e SE) em cada tempo e letras minúsculas comparam o efeito do tempo em cada tratamento.....	54
Figura 6	Atividade da invertase neutra do citosol (INC) e invertase neutra do látex (INL). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P<0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem Ethrel® (CE e SE) em tecidos da casca da seringueira (INC) e no látex (INL).....	57

Figura 7	Atividade da invertase ácida da parede celular (IAP). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem Ethrel [®] em cada tempo e letras minúsculas comparam o efeito do tempo em cada tratamento CE e SE.....	58
Figura 8	Atividade total das três isoformas de invertase (IAV, INC e IAP) para as quatro coletas realizadas durante o experimento. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem Ethrel [®] (CE e SE)	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características das árvores avaliadas (média de 16 árvores). SE: sem estimulação com Ethrel®; CE: com estimulação com Ethrel®44
Tabela 2	Produção de borracha seca (média de 16 árvores e 18 sangrias) e Índice de Obstrução dos vasos laticíferos (média de 5 árvores). SE: sem estimulação com Ethrel®; CE: com estimulação com Ethrel®46
Tabela 3	Teor de água, açúcar solúvel total (AST), açúcares redutores (AR) e teores estimados de sacarose na matéria seca (MS) de tecidos da casca na região do painel das árvores avaliadas50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	A seringueira – aspectos biológicos	17
2.2	Importância econômica	19
2.3	Fisiologia da produção de látex	21
2.3.1	A Hidrólise da sacarose no tecido dreno	23
2.3.2	A Biossíntese de látex	25
2.3.3	Composição do látex	27
2.3.4	Características anatômicas da casca da seringueira relacionadas à produção de látex	28
2.4	Estimulação da produção de látex	30
2.4.1	Respostas da produção de látex a estimulação com Ethrel®	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Área experimental	34
3.2	Unidades experimentais	35
3.3	Aplicação do estimulante Ethrel®	35
3.4	Avaliação da produção de borracha seca	36
3.4.1	Avaliação do índice de obstrução	37
3.5	Avaliação dos teores de água, açúcares redutores e sacarose	38
3.6	Análise da atividade enzimática	39
3.6.1	Invertases da casca	40
3.6.2	Invertase neutra do látex	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Dados climáticos	42
4.2	Produção de borracha seca e características do painel de sangria .	44
4.3	Atividade das invertases em tecidos da casca de seringueira	51
5	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A seringueira, pertencente ao gênero *Hevea*, é uma das mais importantes espécies da Família Euphorbiaceae. É nativa da Amazônia e tem seu cultivo justificado, principalmente, por ser uma planta produtora de borracha natural, produto largamente utilizado na fabricação de pneumáticos e de um grande número de manufaturados imprescindíveis à vida moderna. Atualmente a indústria de pneumáticos consome quase três quartos da borracha produzida no mundo (IAC, 2014). O plantio de seringais destaca-se como alternativa ao agronegócio, por seus benefícios sociais e econômicos e também pela ótica da sustentabilidade ambiental

O Brasil, berço do gênero *Hevea*, continua sendo um país importador de borracha natural, apesar de possuir em relação aos demais países produtores, área incomparavelmente maior, apta para o plantio de seringueira. Uma solução para minimizar os volumes de importação do produto, na busca da autossuficiência e, até mesmo, ocupar novamente uma posição de relevância na produção mundial de borracha, seria a expansão dos plantios de seringueira, com produtividade elevada de látex de boa qualidade (MARTIN; ARRUDA, 1993).

O zoneamento ecológico para a cultura da seringueira no Estado de Minas Gerais apresenta uma grande área climaticamente favorável ao desenvolvimento da cultura (ORTOLANI, 1986; RUFINO, 1986). Apesar da região Sul de Minas Gerais apresentar uma estação seca e fria bem definida, a viabilidade do estudo e da implantação de seringais ainda está baseada no desempenho promissor de alguns plantios isolados desenvolvidos por pesquisadores e produtores. Porém, a heveicultura ainda é incipiente nessa região e, para que sua expansão e fortalecimento sejam bem sucedidos, é necessário, entre outras iniciativas, o aprofundamento de estudos associados a fatores que influenciam a produção de borracha natural (MENDES et al., 2012).

A seringueira é um sistema produtivo no qual as folhas são responsáveis pela fixação do carbono e produção de fotoassimilados que são consumidos pelos órgãos drenos naturais (folhas jovens, raiz, ramos, flores e frutos), e requeridos pelo dreno artificial imposto pela sangria. Compreender a partição de fotoassimilados entre esses drenos é de grande importância para o entendimento dos aspectos fisiológicos relacionados à produtividade de borracha natural, uma vez que, a disponibilização de sacarose e a intensidade de seu metabolismo em regiões da casca da seringueira, são consideradas como aspectos fundamentais e que podem limitar a biossíntese de borracha.

O Ethrel[®], cujo princípio ativo é o ethefon, é um estimulante do fluxo de látex à base de etileno, largamente utilizado em plantios comerciais para aumentar a produção de borracha. Trabalhos anteriores têm revelado que o tratamento com Ethrel[®] atua sobre a permeabilidade da membrana celular, levando a um fluxo de látex prolongado e no metabolismo geral regenerativo (ZHU; ZHANG; 2009); mantém os vasos laticíferos com paredes mais rígidas e espessas evitando a oclusão e inibindo a coagulação do látex (BOATMAN, 1966; CASTRO; VIRGENS, 1986) e também atua aumentando a hidrólise da sacarose, resultando na aceleração da glicólise, o que leva à melhoria do abastecimento da fonte de carbono para a biossíntese de borracha (TUPY; PRIMOT, 1982; MESQUITA et al., 2006b).

As principais enzimas que atuam na hidrólise da sacarose e disponibilizam hexoses para biossíntese de borracha são a sacarose sintase (SuSy) e as invertases. Existem pelo menos três isoformas de invertase nos tecidos, as quais diferem entre si pela localização subcelular e propriedades. As isoformas de invertase são definidas como ácidas e neutras, baseadas no pH ótimo de reação (TYMOWSKA-LALANE; KREIS, 1998; STURM, 1999; ROITSCH; GONZÁLEZ, 2004). As invertases ácidas se localizam no vacúolo (invertase ácida solúvel) ou associada à parede celular (invertase ácida

insolúvel) enquanto a neutra (invertase neutra solúvel) está localizada no citosol (TYMOWSKA-LALANE; KREIS, 1998; STURM, 1999). No entanto, não se sabe qual é a contribuição relativa das três isoformas de invertase na disponibilização de hexoses em tecidos da casca da seringueira e suas respostas ao tratamento com estimulantes à base de etileno.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo compreender os aspectos fisiológicos relacionados à hidrólise da sacarose pelas isoformas de invertase em tecidos da casca de seringueira e sua relação com a produtividade em clones RRIM 600 estimulados com Ethrel®.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A seringueira – aspectos biológicos

O gênero *Hevea*, pertence à Família Euphorbiaceae e dentre os gêneros importantes da cultura tropical pertencentes a esta família, destacam-se *Ricinus*(mamona), *Manihot* (mandioca) e *Hevea* (seringueira). A classificação atual do gênero *Hevea* compreende 11 espécies de seringueiras, sendo elas: *H. brasiliensis*; *H. guianensis*; *H. benthamiana*; *H. nitida*; *H. rigidifolia*; *H. camporum*; *H. sipruceana*; *H. microphylla*; *H. camargoana*; *H. paludosa*; *H. pauciflora*, das quais a *Hevea brasiliensis* (Wild. ex. Adr. de Juss.) Muell. Arg. é a mais importante explorada comercialmente, por apresentar maior capacidade produtiva e qualidade de látex superior às demais (SECCO, 2008).

Todas as espécies do gênero *Hevea* são lenhosas, em geral de porte mediano a grande e apresentam sinais de periodicidade, como desfolhamento periódico, crescimento intermitente e variações no distanciamento das folhas ao longo dos ramos. As espécies, sem exceção, produzem látex, havendo grande variação inter e intraespecífica (IAC, 2014).

O comportamento decíduo da seringueira caracterizado pela senescência, queda e reenfolhamento, ocorre quando a planta muda seu hábito de crescimento a partir do terceiro ano após o plantio, período em que a planta é considerada jovem. A duração dessas fenofases depende da constituição genética, da intensidade e duração do déficit hídrico na estação seca e também das condições de nutrição mineral (GONÇALVES et al., 1990).

Nativa da região Amazônica, sua ocorrência natural está circunscrita aos limites daquela região brasileira, e aos países limítrofes como a Bolívia, Peru, Colômbia, Equador, Guianas, Suriname e Venezuela (GONÇALVES et al., 1990).

O cultivo da *Hevea brasiliensis* pode se estender desde as latitudes de 3° N e 15° S até as latitudes 24° N até 25° S, caracterizando uma alta capacidade de adaptação a diversas condições climáticas (SEAG/ES, 2014). Porém, desenvolve-se melhor em temperaturas médias anuais superiores ou iguais a 20 °C, sendo que os limites térmicos mais favoráveis à fotossíntese estão entre 27 °C e 30 °C. As temperaturas entre 18 °C e 28 °C são as mais indicadas para o fluxo de látex (YANG, 1984). A seringueira apresenta-se sensível a temperaturas baixas, principalmente na fase jovem e, em regiões onde a temperatura média é igual ou inferior a 16 °C, o crescimento da planta é considerado nulo (GASPAROTTO, 1988). Apresenta ainda susceptibilidade a ventos frios e também à geada, entretanto, em plantios comerciais em altitudes até 910 metros foram observados um bom desenvolvimento da cultura (CARMO, 2002).

No Brasil, as regiões tradicionais de cultivo da seringueira são a Amazônia Tropical Úmida, Mato Grosso e Bahia. As regiões não tradicionais, também chamadas de áreas de escape, são: Goiás, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Maranhão, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (AGRIDATA, 2004). Tais áreas de escape são reconhecidas por possuírem estação seca bem definida no período de troca das folhas (junho/setembro), e por isso são desfavoráveis ao desenvolvimento do fungo causador do mal das folhas –*Microcyclus ulei* (P. Henn.) Arx. (COSTA et al., 2008), principal fator limitante à expansão da heveicultura no Brasil. Outro aspecto que contribui positivamente para a expansão e exploração da heveicultura em regiões não tradicionais é o fato de a cultura ser uma atividade econômica, social e ambientalmente viável, com a disponibilidade de clones agronomicamente produtivos e de alta adaptabilidade a diferentes padrões edafoclimáticos (GONÇALVES et al., 1982).

2.2 Importância econômica

A borracha obtida a partir do látex da seringueira corresponde à maior parte da matéria prima utilizada no transporte e indústria, devido às qualidades peculiares como leveza, impermeabilidade (a água e gases), elasticidade, termoplasticidade, resistência à abrasão e à corrosão, capacidade de adesão ao tecido e ao aço. A borracha sintética obtida do petróleo possui quase a mesma composição química da borracha natural, porém suas propriedades físicas são viáveis para alguns manufaturados, mas inferiores para luvas cirúrgicas, preservativos, pneus de automóveis, caminhões, aviões e revestimentos diversos (IAC, 2014).

A maior área plantada de seringueira concentra-se no continente Asiático com 93% do total, seguido da África com 4% e América do Sul e Central com 3%. Dados de 2012 mostraram que o consumo de borracha concentra-se na Ásia Pacífica com 72%, na União Europeia (EU) com 13% e as Américas com 15%. No *ranking* dos países mais produtivos, encontram-se a Tailândia, Indonésia, Vietnã, Malásia, Índia, China, Costa do Marfim, Brasil, e Sri Lanka (IRSG, 2014)

Segundo estimativas do *International Rubber Study Group* (IRSG, 2014), a produção mundial de borracha no primeiro trimestre de 2014 cresceu 1,2%, enquanto o consumo elevou-se em 4%, o que demonstra um aumento da demanda pela matéria prima, concentrado, principalmente na China e nas economias consolidadas da Ásia e do Pacífico, demonstrando a tendência de recuperação da economia mundial.

O Brasil consome atualmente 395.000 toneladas de borracha natural e produz 178.000 toneladas o que equivale a 45% da demanda interna. A fração importada é oriunda de países asiáticos, sendo a borracha o segundo produto agrícola que mais onera a balança comercial do país (CEPLAC, 2014). Esse

défice de produção significa, no mínimo, descaso para um produto estratégico de tão alto valor econômico-social que se destaca pela geração de empregos, aumento da renda familiar, fixação do homem no campo, desenvolvimento econômico local e regional, receita com a venda da borracha e valorização da terra. Além disso, a borracha natural consiste em um recurso renovável o que a torna um insumo de grande importância para a economia brasileira juntamente com aço e o petróleo (SEAG/ES, 2014).

A produção brasileira está concentrada atualmente nos estados de São Paulo (53,3%), Bahia (15,9%), Mato Grosso (8,9%), Minas Gerais (6,3%), Goiás (4,7) e Espírito Santo (3,8%) (CEPLAC, 2014). No Estado de Minas Gerais, o cultivo está se expandindo no Sul de Minas, Triângulo Mineiro, Zona da Mata, Alto São Francisco e Vale do Rio Doce (CAIRO et al., 2009). Minas Gerais destaca-se por apresentar uma grande área climaticamente favorável para o desenvolvimento da cultura e desfavorável para ao desenvolvimento do fungo *Microcycluslei* (P. Henn.) von Arx. (DE CAMARGO, 2003). Além disso, os seringais mineiros apresentam uma produtividade média de 1.500 kg de borracha seca ha/ano. Esses valores quando comparados com as médias dos países produtores, como Tailândia, Indonésia e Malásia, cujas produtividades médias variam entre 750 a 1.100 kg/ha.ano, colocam o estado entre as regiões mais produtivas do mundo (CAVALCANTE; CONFORTO, 2006; COSTA et al., 2008; MESQUITA et al., 2006b).

Segundo o IBGE (2014), baseado na produção dos seringais brasileiros e área atual plantada no país, estima-se que exista a necessidade de formação de 350 mil hectares de novos seringais até 2020 para que o Brasil atenda 100% de sua demanda. Para continuar autossuficiente até 2030, estima-se a necessidade de formação de mais 300 mil hectares de novos seringais entre os anos de 2021 e 2030. Esta situação demonstra que o Brasil precisa aumentar a área atual plantada, ressaltando na necessidade de investimentos na cultura da seringueira,

políticas públicas de incentivo e no desenvolvimento de tecnologias de cultivo e exploração apropriadas às condições edafoclimáticas das diferentes regiões do país. Apesar de vários trabalhos já terem sido desenvolvidos por pesquisadores brasileiros, ainda são necessárias mais investigações acerca dos principais aspectos fisiológicos e fitotécnicos relacionados com todas as etapas da cadeia produtiva da seringueira, visando à evolução na seleção e recomendação de novos clones, redução no período de imaturidade, aprimoramento de tecnologias que possam auxiliar produtores e beneficiadores, possibilitando a exploração mais viável e maior competição com os mercados internacionais.

2.3 Fisiologia da produção de látex

A fisiologia da produção da seringueira é incomum, quando comparada com a de outras plantas cultivadas, pois o produto econômico é obtido ferindo-se a árvore e criando-se um dreno artificial induzido (BERNARDES, 1990).

A seringueira é considerada um sistema produtivo composto por folhas, que são responsáveis pela produção de fotoassimilados, e por outros órgãos (raízes, caules, ramos, flores e frutos) que consomem esses fotoassimilados pelo menos em parte da sua vida (CAIRO et al., 2009). De acordo com a capacidade de exportar ou importar fotoassimilados, os órgãos vegetais podem ser classificados em fonte e dreno respectivamente.

A demanda dos tecidos drenos (não fotossintetizantes) por esses fotoassimilados não é a mesma em todo o desenvolvimento da planta e a força do dreno é responsável pela regulação das taxas fotossintéticas nas folhas (fonte) (FOYER et al., 1994). A produtividade de alguns clones de seringueira pode estar relacionada com características fisiológicas e bioquímicas do sistema fonte-dreno, as quais podem estar associadas tanto aos processos de assimilação

e transporte de carbono, como à utilização de assimilados (sacarose) na biossíntese de borracha natural (MESQUITA, 2006b).

Dois sistemas combinados envolvem o metabolismo do carbono. O sistema de “carregamento”, que compreende a biossíntese de carboidratos primários e sacarose nas folhas, que é dependente da capacidade fotossintética da planta e o sistema de “descarregamento”, que por sua vez, compreende a hidrólise da sacarose, transportada a partir das folhas, e a biossíntese de látex em tecidos do caule (CAIRO et al., 2009).

Uma fase crítica desse transporte é o descarregamento do floema, que pode ocorrer por meio de duas rotas distintas: simplástica ou apoplástica. Na primeira, a sacarose é transportada de uma célula a outra através dos plasmodesmas, até chegar ao interior do tecido-dreno onde é convertida a hexoses. Os plasmodesmas são canais de comunicação que se estabelecem entre o citoplasma da maioria das células vegetais tornando-as contínuas, ocorrem ao longo da extensão da parede celular são finos e cilíndricos, com diâmetro aproximado de 20 a 60 nm (BRANCALHÃO, 2013), e permite a movimentação da sacarose através deles. De acordo com Bilka; Sowinski (2010), o frio em milho modifica a estrutura dos plasmodesmas, diminui a produção destes canais e, além disso, desativa os já existentes pelo depósito de calose. Essa alteração nos plasmodesmas influencia negativamente no transporte de intermediários da fotossíntese.

Quando o descarregamento é apoplástico, a sacarose é transportada através do apoplasto, com o auxílio de proteínas carreadoras ou transportadoras, sendo hidrolisada pela ação de enzimas ligadas covalentemente à parede celular, e descarregada no interior da célula do tecido-dreno na forma de hexoses (WINTER; HUBER, 2000). Estudos ultraestruturais em laticíferos maduros mostraram que eles não têm plasmodesmas e são, portanto, protoplasticamente isolados de células adjacentes (HÉBANT, 1981; DE FAY; JACOB, 1989).

A exploração econômica da seringueira envolve a partição de assimilados para os pontos de crescimento e o suprimento de metabólitos ao sistema laticífero, onde se processa a biossíntese da borracha. Vasos laticíferos de seringueira são considerados fortes drenos de sacarose que precisam ser fornecidas para satisfazer as suas altas demandas de carbono e elevadas exigências de energia (TUPY; PRIMOT, 1982; ESCHBACH et al., 1986; SILPI et al., 2007).

A partição desses assimilados é complexa, pois há uma alteração na relação fonte-dreno, após a criação de um novo dreno artificial induzido, observando-se uma redução no ritmo de crescimento das plantas, tendo em vista que os fotoassimilados produzidos nas folhas, em particular a sacarose, antes direcionada para atender apenas à demanda dos diferentes órgãos-drenos naturais da planta, passa a ser fortemente dirigida à reconstituição do látex extraído através da sangria e para a regeneração da casca (VIRGENS FILHO, 1986).

Frommer e Sonnewald (1995) descreveram passos básicos no particionamento de carbono em plantas, entre eles, a hidrólise de sacarose foi considerada fator limitante para o acúmulo de fotoassimilados nos tecidos drenos, o que torna as enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose pontos-chaves para o entendimento dos seus mecanismos de regulação.

2.3.1 A Hidrólise da sacarose no tecido dreno

Após ser sintetizada, a sacarose é exportada a partir das folhas, para suprir o restante da planta com carbono e energia, requeridos tanto para o crescimento como para o armazenamento de reservas (LUNN; FURBANK; 1999), numa trajetória que tem início com o carregamento do floema. O caráter não redutor da molécula de sacarose é o principal motivo que explica a sua larga

distribuição e utilização nas plantas superiores (TUPY; PRIMOT, 1982). Além da sua posição central como uma molécula energética, este dissacarídeo tem um papel importante no particionamento de carboidratos e atua como uma importante molécula sinalizadora agindo em diferentes processos que regulam o ciclo de vida das plantas. (BOLOURI-MOGHADDAM et al., 2010; SMEEKENS et al., 2010; RUAN, 2014).

Duas rotas alternativas são responsáveis pela clivagem da ligação glicosídica da sacarose. Uma dessas rotas envolve a hidrólise irreversível de sacarose a glicose e frutose, via invertase (EC 3.2.1.26), que é uma enzima que possui um baixo K_m para sacarose (7 a 15 mM) (AVIGAD, 1982). Após esta etapa, ocorre uma fosforilação de glicose e frutose, em reações catalisadas por várias hexoquinases e frutoquinases, usando ATP como doador de energia (RENZ; STITT, 1993). A outra rota de hidrólise da sacarose, exclusiva de plantas, é catalisada pela SuSy (EC 2.4.1.13) e envolve a clivagem da sacarose dependente de UDP, produzindo UDP-glicose e frutose. O K_m da SuSy para a sacarose é relativamente alto (40 a 200 mM) e a atividade da enzima é limitada pelas concentrações de sacarose e UDP no citosol (AVIGAD, 1982; LOEFI et al., 1999).

Existem algumas isoformas de invertase, com diferentes propriedades bioquímicas e localizações subcelulares (TYMOWSKA-LANANNE; KREIS, 1998; KOCH, 2004). Segundo Sturm (1999), as funções específicas das diversas isoformas de invertase, parecem regular a entrada de sacarose nas suas diferentes vias de utilização.

A maioria das espécies contém pelo menos duas isoformas de invertase vacuolar, que se acumulam como proteínas solúveis (invertases ácidas solúveis), no lúmen deste compartimento acidificado (KOCH, 2004). Supõe-se que a invertase vacuolar pode desempenhar um papel importante na expansão celular (GONZÁLEZ et al., 2005), no aumento da turgescência que pode levar à

resistência ao estresse hídrico. De maneira similar, existem algumas isoformas de invertase extracelular (invertases de parede celular) que são ligadas à parede celular, cuja função é mais proeminente em drenos sem ligações por plasmodesmas entre as células (PROELS et al., 2006; HIRSCHÉ et al., 2009; KANG et al., 2009). Invertases de vacúolo e de parede celular promovem a clivagem de sacarose com maior eficiência, quando submetidas a níveis de pH situados entre 4,5 e 5,0 (STURM, 1999). Além disso, as plantas têm, pelo menos, duas isoformas de invertases citoplasmáticas, denominadas neutras ou alcalinas, cuja atividade hidrolítica é maximizada em níveis de pH situados entre 7,0 e 7,8 (QUICK; SCHAFFER, 1996). A invertase neutra é considerada uma enzima de manutenção, envolvida na degradação de sacarose, quando as atividades da invertase ácida e da SuSy são baixas (COPELAND, 1990).

As invertases convertem sacarose a hexoses com o objetivo de fornecer substrato para a respiração celular e em seringueira, sua atividade também está relacionada à produção e ao fornecimento de matéria prima para biossíntese de látex (OLIVEIRA; ALVARENGA, 2008). Alguns estudos sugerem que o uso de estimulante à base de etileno aumenta a hidrólise da sacarose resultando na aceleração da glicólise, levando a melhoria do abastecimento da fonte de carbono (tais como acetil-Coenzima A) para a biossíntese de borracha (TUPY, 1985; COUPÉ; CHRESTIN, 1989; OLIVEIRA; ALVARENGA, 2008).

2.3.2 A Biossíntese de látex

A biossíntese de látex é a principal característica metabólica de laticíferos, e requer exclusivamente sacarose como precursor (DUSOTOIT-COUCAUD et al., 2010; OLIVEIRA; ALVARENGA, 2008).

Consequentemente, a produção de borracha é o resultado de uma complexa cadeia de eventos biofísicos, nutricionais e metabólicos que estão

relacionados com fatores diversos, como a variação das condições climáticas, a produção e o transporte de fotoassimilados, a disponibilidade de carboidratos de reserva e a demanda por outros tecidos (drenos) das árvores (MESQUITA et al., 2006a; 2006b; MIGUEL et al., 2007; CAIRO et al., 2009, OLIVEIRA; ALVARENGA, 2008). Também está intimamente relacionada com rotas metabólicas geradoras de energia e processos anabólicos (PUJADE-RENAUD et al., 1994).

O látex é sintetizado em vasos laticíferos e ocorrem em todos os órgãos da seringueira, a partir da fase cotiledonar (DE FAY; JACOB, 1989; MESQUITA; OLIVEIRA, 2010), através de uma sequência de reações que envolvem a hidrólise da sacarose, com liberação de hexoses que dão início à glicólise e, conseqüente, à geração de piruvato que será convertido pela enzima piruvato desidrogenase em acetil-CoA e o anabolismo de isoprenos, a partir do acetil-CoA e energia na forma de NADPH e ATP, permitindo a formação do isopentenil difosfato (IPP), unidade básica da borracha (TUPY, 1985; OLIVEIRA; ALVARENGA, 2008).

A via do mevalonato ocorre dentro do retículo endoplasmático e no citosol e é o caminho convencionalmente aceito que fornece o IPP para a biossíntese de borracha em tecidos da casca da seringueira. No entanto, a via de plastídica 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) pode ser uma fonte alternativa de IPP em plantas (CHOW et al., 2012). Evidência para a biossíntese de borracha pela via do MVA foi experimentalmente comprovada através da incubação do látex com intermediários marcados com C^{14} (KEKWICK, 1989). Mas recentemente, foram encontradas plantas que contêm tanto a via do MVA citosólica e a via MEP plastídica como precursoras de IPP (EISENREICH et al., 2001; BICK; LANGE, 2003; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006; KIRBY et al., 2009). Na seringueira, a existência da via MEP foi apoiada pela identificação de um deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase (DXS) através do sequenciamento do

transcriptoma do látex (KO et al., 2003; CHOW et al., 2007). Provavelmente, a via MEP sintetiza IPP para biossíntese de carotenoides e posteriormente partículas Frey-Wyssling que são organelas especializadas de laticíferos responsáveis pelo aspecto amarelado do látex de alguns clones de seringueira (DICKENSON, 1969; GOMEZ; MOIR, 1979; D'AUZAC; JACOB, 1993), além disso, a via MEP pode também fornecer IPP diretamente para a biossíntese de borracha (CHOW et al., 2012).

Estudos sobre a influência do estimulante à base de etileno em ambas as vias geradoras do IPP, relatam que o aumento na biossíntese de borracha provocada pela ação do estimulante não descarta a via MEP como fonte adicional de IPP (CHOW et al., 2012), porém, a exata contribuição dessa via no aumento da biossíntese de látex em resposta ao etileno, ainda carece de maiores investigações.

2.3.3 Composição do látex

O látex de *Hevea brasiliensis* é um sistema polidisperso, no qual partículas negativamente carregadas de vários tipos estão suspensas em um soro. Três tipos de partículas predominam: partículas de borracha que constituem 30 a 45% (em massa) do látex, os lutoídes que constituem 10 a 20% e os chamados complexos de Frey-Wyssling (FW) (WEBSTER; BAULKWILL, 1989). O soro no qual as partículas estão dispersas é chamado de soro C.

As partículas de borracha natural contêm centenas de moléculas de hidrocarboneto e são envolvidas por um filme de proteínas e fosfolipídios, que lhe confere carga negativa promovendo a estabilidade coloidal (CYR, 1991). Os lutoídes formam o segundo componente principal do látex de *Hevea brasiliensis* e constituem-se de proteínas, fosfolipídios e sais minerais (BLACKLEY; SCATTERGOOD, 1991). O conteúdo dos lutoídes é chamado soro B, contém

vários cátions e proteínas catiônicas que têm ação floculante muito rápida sobre as partículas de borracha no látex, resultando na coagulação (BLACKLEY; SCATTERGOOD, 1991). Os complexos de Frey-Wyssling são constituídos de carotenoides e lipídios conferindo à borracha sua coloração, mais ou menos amarela. Acredita-se que estes complexos tenham uma função vital nas atividades metabólicas, sendo possíveis sítios da biossíntese da borracha (SETHURAJ,2012).

2.3.4 Características anatômicas da casca da seringueira relacionadas à produção de látex

Os vasos laticíferos ocorrem em todos os órgãos da seringueira, a partir da fase cotiledonar, contudo, o grande interesse econômico é voltado aos vasos localizados na casca do tronco, onde se dá a extração do látex (DE FAY; JACOB, 1989). Segundo Azzini et al. (1998), a casca é o principal componente do tronco da seringueira, responsável pela produção de látex, transporte e armazenamento de assimilados produzidos na folha. Além dos vasos laticíferos, estão presentes na casca, próximo ao câmbio, os elementos de tubos crivados, as células parenquimatosas e os raios medulares.

Estruturalmente, os laticíferos são classificados em dois tipos: articulados e não articulados (ESAÚ, 1953; FAHN, 1988). Laticíferos articulados são formados por fileiras de células alongadas, que se dispõem em série, podendo suas paredes terminais permanecerem íntegras (articulados não anastomosados) ou serem parcial ou totalmente removidas (articulados anastomosados) (FAHN, 1988; EVERT,2006). Anastomoses podem ocorrer também, entre anéis laticíferos adjacentes dentro de um mesmo sistema laticífero articulado, constituindo uma complexa rede de vasos interligados (PICKARD, 2008). Os laticíferos não articulados formam-se de células

individuais que, mediante contínuo crescimento, originam estruturas tubulares pequenas e muito ramificadas e que não se fundem com outras células semelhantes (MARQUES; GONÇALVES, 1990; MESQUITA, 2004).

As estruturas envolvidas na produção de látex na seringueira são os laticíferos articulados (OLIVEIRA; ALVARENGA, 2008). Laticíferos não articulados maduros provavelmente têm poucos ou nenhum plasmodesma (SERPE et al., 2001), e não há evidência para plasmodesmas em laticíferos maduros articulados (FISHER, 1991), apesar de essas estruturas estarem presentes no início do desenvolvimento desses vasos (INAMDAR et al., 1988). Análises de plasmodesmas em laticíferos são pouco estudadas e há poucos trabalhos de microscopia eletrônica que fazem referência a plasmodesmas em vasos laticíferos (PICKARD, 2008), no entanto, ainda assim, parece que um laticífero maduro, forma frequentemente seu próprio domínio simplástico isolado (DE FAY et al., 1989). Desse modo, parece razoável supor que vasos laticíferos obtêm suas entradas de energia por um sistema simporte H^+ -produtos (BOUTEAU et al., 1999), que serão metabolizados em látex, o mesmo autor relata que laticíferos de seringueira possuem um potencial de repouso da membrana plasmática, que pode ser despolarizado pela adição de glicose ou sacarose e pode ainda, ser hiperpolarizado pela estimulação com etileno que ativa simportadores de açúcar, sensíveis à voltagem de canais de potássio (K^+).

Em seção transversal, os vasos laticíferos aparecem como anéis, o que levou à referência "anéis laticíferos". O número médio de anéis laticíferos é o fator inerente ao clone mais importante do sistema laticífero (WEBSTER; PAARDKOOPEL, 1989; OLIVEIRA; ALVARENGA, 2008), ao passo que o número de vasos laticíferos é um caráter determinante da produção em seringueiras (HO et al., 1973, OLIVEIRA; ALVARENGA, 2008).

Laticíferos são, portanto, estruturas anatômicas envolvidas no armazenamento, movimentação e liberação do látex, porém, os detalhes da

importância, mecanismo, ou fenomenologia de transporte de massa dentro deles permanecem vagos, apesar de sua importância econômica global na produção de borracha natural.

2.4 Estimulação da produção de látex

Os reguladores vegetais classificados como maturadores referem-se a compostos químicos capazes de modificar a morfologia e fisiologia vegetal, podendo alterar qualitativa e quantitativamente a produção de látex (PONTIN, 1995; CASTRO et al., 2001). O efeito comum dos reguladores vegetais utilizados como estimulante é o de promover a produção endógena de hormônios ou de liberá-los no tecido vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2013). A biossíntese de borracha natural, como de outros metabólitos secundários, é afetada por vários hormônios vegetais. Entre os hormônios vegetais extensivamente estudados, apenas o etileno foi identificado para estimular a produção de látex em seringueira (COUPÉ; CHRESTIN, 1989).

O Ethrel[®], cujo princípio ativo é o ethefon (ácido 2-cloretilfosfônico), é um estimulante do fluxo de látex que se mantém estável na forma ácida, mas, quando aplicado no painel de sangria, permite a evolução do hormônio vegetal gasoso etileno (BERNARDES, 1990).

O etileno liberado nos tecidos da casca atua sobre a permeabilidade da membrana, levando a um fluxo de látex prolongado e no metabolismo geral regenerativo (ZHU, ZHANG; 2009). Aumenta também a hidrólise da sacarose resultando na aceleração da glicólise, levando à melhoria do abastecimento da fonte de carbono (TUPY, 1985; MESQUITA et al., 2006b) e mantém os vasos laticíferos com paredes mais rígidas e espessas evitando a oclusão e inibindo a coagulação do látex (BOATMAN, 1966; CASTRO; VIRGENS, 1986).

A estimulação é considerada de grande importância para os sistemas de exploração de seringueira. Seus efeitos nos drenos estão relacionados à mobilização de reservas de açúcar, alcalinização do látex, ativação do catabolismo de carboidratos e síntese de isopreno, sendo, portanto, bastante favoráveis à manutenção de altos níveis de produção por longos períodos (BERNARDES, 1990).

A resposta à estimulação é normalmente definida pela proporção entre a produção do sistema de sangria estimulado e a produção do mesmo sistema de sangria sem estimulação (MORAES et al., 1978). Geralmente, o estimulante é aplicado em concentrações entre 2,5% e 5% do ingrediente ativo, a intervalos de três meses, quatro meses em casca raspada, ou ainda pode acontecer mensalmente durante oito a 10 meses seguidos (VIRGENS FILHO, 1986).

A aplicação bem gerenciada do estimulante à base de etileno em painéis de sangria, geralmente não acarreta em secamento de painel que é, de modo geral, um distúrbio fisiológico causado por sistema de sangria intenso ou doses excessivas do estimulante (BENESI; OLIVEIRA, 2000), desde que se garanta a sanidade das árvores respeitando um intervalo mínimo entre sangrias, o que permite uma boa regeneração do látex e realimentação do tecido laticífero, principalmente com sacarose (COSTA et al., 2008). Em sistemas de sangria com frequência reduzida, utilizando-se dosagens recomendadas de Ethrel[®], a ação estimulante mostrou-se eficiente mesmo após cinco anos de tratamento (ESCHBACH, TONNELIER, 1984).

2.4.1 Respostas da produção de látex a estimulação com Ethrel[®]

Imediatamente após o corte da casca, o látex exsuda rapidamente produzindo considerável quantidade de borracha, este fluxo decresce com o

tempo, até sua interrupção total pela coagulação do látex no corte (BERNARDES, 1990).

O grande fluxo inicial de látex, imediatamente após a sangria, é explicado pela contração dos vasos laticíferos em função da diminuição da pressão de turgescência dos vasos. A circulação de água entre os tecidos do floema, bem como o conteúdo de água do látex, é de grande importância nos processos de fluxo de látex.

A água proveniente do floema e xilema pode utilizar duas vias complementares e circular entre e dentro de tecidos por vias simplásticas (VARNEY et al., 1993), onde a água e os solutos podem mover-se de célula para célula através de plasmodesmas (BLACKMAN; OVERALL, 2001); e espaços intercelulares, ou caminhos apoplásticos. Porém, ao contrário das outras células que os rodeiam (células de parênquima, células vasculares, tubos crivados e células companheiras, etc.), vasos laticíferos maduros são desprovidos de plasmodesmas (DE FAY; JACOB, 1989), e provavelmente a água seja transportada por aquaporinas (TUNGNGOEN et al., 2009), que são proteínas de canal de água que aumentam a permeabilidade da bicamada lipídica da membrana celular à água (AGRE, 2004).

O decréscimo na pressão de turgescência não explica totalmente o processo de cessação do fluxo (VIRGENS FILHO, 1986). Boatman (1966) e BATTERY e Boatman (1967) demonstraram que o fluxo do látex é rapidamente restringido pela obstrução dos vasos em posições próximas ao corte pelo rompimento dos lutoídeos, segundo componente principal do látex de *Hevea brasiliensis* que contém cátions e são responsáveis pela coagulação do látex, principal causa do declínio na taxa de fluxo (GALIANI et al., 2011).

Embora seja uma característica clonal, o índice de obstrução é influenciado por fatores ambientais, especialmente pela manutenção da turgescência (HO et al., 1973). O seu valor indica uma intensidade de restrição

ao fluxo após a sangria e esse valor está relacionado com a resposta de diferentes cultivares à estimulação da produção (RAO et al., 1998).

Diversos aspectos positivos da estimulação com Ethrel[®], para melhorar o fluxo do látex e manter a produtividade e sanidade de seringueiras em sangria têm sido relatados. Ribailier (1970) constatou que a porcentagem de lutoídes que se rompem durante o fluxo de látex diminui de 13% a 6% após tratamento das plantas com ethephon. Mais tarde, Ribailier (1972) mostrou que os produtos estimulantes aumentam a permeabilidade das membranas dos lutoídes e também têm efeito estabilizante sobre estas partículas durante o fluxo. A produtividade está relacionada à regeneração de novas quantidades de látex e depende da frequência com que a sangria é realizada. Para tanto, as reservas de carboidratos fornecidas aos tecidos da casca e utilizadas na biossíntese da borracha precisam ser suficientes para suportar altas demandas, refletindo nos parâmetros fisiológicos relacionados com a produtividade. Porém, ainda não há estudos que relacionem o tempo entre a síntese da sacarose nos tecidos fonte e seu posterior escoamento na forma de produto da biossíntese de látex durante a sangria.

Em relação à sanidade das seringueiras, a aplicação de estimulantes à base de etileno compensa a redução na frequência de sangria pelos ganhos de produção alcançados. Este fato tem como resultados práticos a racionalização no uso da mão de obra e a redução no consumo de casca que diminui os riscos de estresse das plantas (VIRGENS FILHO, 1986).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área experimental

Foram realizadas atividades em condições de laboratório e de campo, acompanhando plantio já existente em fase de produção da cultura.

O trabalho foi conduzido na Fazenda Carandaí, de propriedade do senhor José Osvaldo Lima Salgado, em plantio comercial de seringueira (RRIM 600) de oito anos, localizado no município de Nepomuceno (Figura 1), na região Sul de Minas Gerais, no período de outubro de 2014 a janeiro de 2015. As coordenadas geográficas de referência são 21°17'33'' S de latitude, 45°10'41'' W de longitude e 904 m de altitude. O clima do município é do tipo CWB, segundo a classificação de Köppen (mesotérmico com verões brandos e suaves e estiagem de inverno). A cafeicultura é a principal atividade econômica na fazenda e conta com a aptidão de clima e solo (latossolo vermelho distrófico) e infraestrutura da propriedade.

A vegetação anterior à implantação dos seringais era de mata nativa. O plantio apresenta espaçamento de 5,6 m x 2,3 m. As árvores utilizadas no experimento estavam há três meses sem serem sangradas e foram selecionadas 32 árvores com diâmetro do tronco entre 55 e 65 cm (medido a cerca de 1,50 m do solo), dessas, 16 árvores receberam estimulação com Ethrel® e 16 não receberam nenhum tipo de tratamento.



Figura 1 Localização do município de Nepomuceno, MG

Fonte: Jonhhanes et al. (2007).

3.2 Unidades experimentais

O sistema de sangria adotado foi o de meia espiral ($\frac{1}{2}$ S), em uma inclinação de 35° , com duas sangrias por semana, espaçadas de três a quatro dias (d/3 e d/4) realizadas a cerca de 1,20 m da superfície do solo. O delineamento experimental utilizado foi em blocos inteiramente casualizados, com dois tratamentos e com 16 repetições cada, totalizando 32 plantas. Os tratamentos experimentais foram compostos da seguinte forma: plantas que receberam a aplicação do Ethrel[®] (CE) e plantas controle (SE).

As sangrias foram realizadas entre às 7h e 9h e os coágulos coletados de três a sete dias após a sangria, em seguida foram prensados e acondicionados em local seco, coberto e ventilado à temperatura média de 23°C e o conteúdo de borracha seca, pesados após 28 dias.

3.3 Aplicação do estimulante Ethrel[®]

O Ethrel[®] PA (2- chloroethylphosphonicacid - ETHEFON) consiste num regulador de crescimento do grupo etileno, produzido pela Bayer S/A e

registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/MAPA sob nº 01505.

A solução de Ethrel[®] foi aplicada nas árvores previamente selecionadas para receber estimulação com auxílio de um pincel sobre o canal de sangria, sem a retirada da fita.

A primeira aplicação do estimulante Ethrel[®] foi realizada em 28 de outubro de 2014, após um período de aproximadamente três meses sem a realização de sangria, seguindo as recomendações técnicas para o uso do produto que consiste em: 5 g de Ethrel[®] PA dissolvidos em 1 L de água (0,5% m/v) e cada uma das árvores selecionadas recebeu aproximadamente 0,5 mL da solução. Uma segunda aplicação foi realizada no dia 4 de dezembro de 2014, 34 dias após a primeira aplicação, nas mesmas árvores selecionadas para estimulação.

A primeira sangria após o tratamento foi realizada no dia 31 de outubro de 2014, três dias após a aplicação do Ethrel[®]. As sangrias foram espaçadas de três a quatro dias (d/3 e d/4) totalizando 18 sangrias e cada aplicação do estimulante, correspondeu a nove sangrias.

3.4 Avaliação da produção de borracha seca

Os dados de produção de borracha seca foram obtidos a partir da média de sangrias realizadas durante o experimento de todas as plantas, realizadas de outubro de 2014 a janeiro de 2015. O resultado foi expresso em gramas de borracha seca por planta por sangria e em gramas de borracha seca por cm² da seção do painel de sangria. Usando os valores da razão do raio do tronco com o cosseno da inclinação (35°) do painel de sangria, foi obtido o comprimento da seção, que foi multiplicado pela espessura da casca, encontrando o valor em

cm² da seção de painel de sangria, obtendo, assim, a produtividade através da razão da produção de borracha seca (g) por cm² da seção de painel de sangria.

A área de seção de sangria foi calculada multiplicando-se o comprimento do corte pela espessura da casca.

O comprimento do corte (l) é calculado pelo perímetro do tronco (PT) dividido pelo comprimento relativo do corte (cc) em função do sistema de exploração (½ para meia espiral) e dividindo-se pelo cosseno do ângulo de inclinação do corte (35°).

As árvores selecionadas para a realização do experimento eram muito semelhantes em suas características morfológicas. O perímetro do caule e a espessura da casca foram medidos com auxílio de fita métrica e paquímetro respectivamente.

As análises estatísticas para os dados de produção foram realizadas utilizando-se o pacote computacional Sistema de Análise de Variância – SISVAR (FERREIRA, 2002).

3.4.1 Avaliação do índice de obstrução

O índice de obstrução foi obtido medindo-se o volume de látex nos primeiros 5 minutos após a sangria que foi realizada entre 7h e 8h da manhã, e dividindo-se pelo volume total de látex coletado ao final da sangria. Para esta avaliação, foram escolhidas cinco árvores que foram estimuladas com Ethrel® e cinco árvores que não receberam estimulação. O resultado foi multiplicado por 100.

3.5 Avaliação dos teores de água, açúcares redutores e sacarose

A avaliação dos teores de Água, Açúcares Redutores e Sacarose, seguiram os procedimentos protocolares realizados de forma rotineira no Laboratório de Processamento de Produtos Vegetais, do Departamento de Ciências dos Alimentos da UFLA.

O teor de água foi determinado pelo método gravimétrico utilizando-se amostras compostas relativas às quatro coletas realizadas durante o experimento. Cerca de 5 g do material foram pesados em cápsulas de porcelana em balança analítica (com resultados expressos em quatro casas decimais) e submetidos à secagem em estufa regulada a 105 °C até peso constante (aproximadamente por 12 horas). Após esse período, as cápsulas foram retiradas da estufa com o auxílio de pinças tipo tenaz e armazenadas em dessecadores contendo sílica até que esfriassem (de 20 a 30 minutos). Por meio da diferença entre o peso da cápsula com a amostra integral e o peso da cápsula mais a amostra seca, obteve-se o teor de água presente na amostra (AOAC, 2000).

Para a extração de açúcares solúveis, também foram utilizadas amostras compostas relativas às quatro coletas realizadas durante o experimento. Foram pesados 5 g de matéria seca de tecidos da casca e homogeneizadas em gral com etanol. O extrato obtido foi centrifugado a 1.250 g por 10 minutos. O precipitado foi novamente ressuspensão em 3 mL de etanol fervente e centrifugado, repetindo-se o processo por três vezes, e os sobrenadantes combinados. O volume final foi completado para 25 mL. Desse extrato etanólico, 10 mL foram colocados em funil de separação, onde se adicionou 10 mL de clorofórmio. Após uma leve agitação e um período de 5 minutos de repouso, a fase aquosa foi coletada, e a fase clorofórmica foi submetida a três lavagens sucessivas com 1 mL de água destilada, sendo estas fases aquosas combinadas com a anterior. O extrato aquoso foi evaporado num evaporador rotativo a vácuo a 45 °C. Após a

evaporação, foram adicionados 3,0 mL de água destilada. Os açúcares solúveis totais foram determinados pela reação com antrona (HODGE; HODFREITER, 1962); e os açúcares redutores, conforme metodologia descrita por Nelson et al. (1944). Os teores de sacarose foram estimados pelas diferenças entre os teores de açúcares solúveis totais e redutores.

3.6 Análise da atividade enzimática

As análises bioquímicas e enzimáticas seguiram os procedimentos protocolares realizados de forma rotineira nos Laboratórios de Nutrição e Metabolismo de Plantas e do Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA.

Todo o material vegetal utilizado para análise enzimática foi obtido através de corte realizado no painel das 32 árvores selecionadas, com o auxílio de uma faca própria para sangria, entre 8h e 9h da manhã. Foram retiradas do painel de cada árvore, duas fitas da casca, com aproximadamente 1,00 mm de espessura, sendo a primeira dispensada e a segunda acondicionada imediatamente em nitrogênio líquido e transportada para o laboratório, onde foram transferidas para conservação em freezer a -80 °C até o dia das análises.

A coleta do material vegetal para análise enzimática foi realizada aos sete e 21 dias após a primeira aplicação de Ethrel[®] e aos 12 e 36 dias após a segunda aplicação. Foram avaliadas as atividades das três isoformas de invertase: ácida do vacúolo (IAV), neutra do citosol (INC) e ácida da parede (IAP), em árvores com estimulação (CE) e sem estimulação (SE) por Ethrel[®].

As análises estatísticas para as atividades enzimáticas foram realizadas utilizando-se o pacote computacional Sistema de Análise de Variância – SISVAR (FERREIRA, 2002).

3.6.1 Invertases da casca

Amostras de 0,4 g de casca do material obtidos conforme descrito acima, foram trituradas com microtritador Tecnal modelo TE 102 e N₂ líquido. As amostras foram acondicionadas em eppendorf de 2,0 mL, com 1,5 mL de meio extrator constituído de tampão fosfato de potássio (100 mM pH 7,5), PMSF (1 mM), MgCl₂ (5 mM) e DTT (1 mM). Posteriormente, o conjunto foi centrifugado a 18.000 g e 4 °C, durante 20 minutos (CAIRO et al., 2009). O sobrenadante, extrato proteico de casca, foi utilizado como fonte bruta das enzimas para avaliação da atividade das invertases solúveis. O pelet foi utilizado para extrair a invertase ácida da parede.

O meio de reação (2 mL) para as invertases foi constituído de tampão 0,1M, específico no pH de cada isoforma; MgCl₂ 5 mM, sacarose 200 mM e 200 µL de alíquota do extrato proteico de casca. A temperatura de incubação foi de 37 °C e alíquotas de 100 µL foram coletadas ao final de 10 e 70 minutos, para cálculo e determinação da atividade enzimática.

Para a extração da invertase ácida da parede, a metodologia foi realizada de acordo com Fahrendorf e Beck (1990) com algumas modificações. Foi utilizado o mesmo tampão de extração das invertases solúveis, no entanto, foram adicionados NaCl 1M e Triton-X (1%). Posteriormente, centrifugou-se, a 18.000 g e 4 °C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio enzimático. O meio de reação (1,5 mL) para essa invertase apoplástica foi constituído de tampão acetato de sódio 0,1M pH 3,5, MgCl₂ 5 mM, sacarose 200 mM e 200 µL de alíquota do extrato proteico da invertase ácida apoplástica da casca. A temperatura de incubação foi de 37 °C e alíquotas de 100 µL foram coletadas ao final de 10 e 70 minutos para cálculo e determinação da atividade enzimática.

As atividades enzimáticas foram avaliadas pela quantificação de açúcares redutores produzidos, segundo o método DNS descrito por Miller (1959). As atividades foram expressas em μmol de açúcares redutores (AR) produzidos, por grama de matéria fresca.

3.6.2 Invertase neutra do látex

Na quantificação da invertase neutra do látex, 20 mL de látex foi coletado aos 12 dias após a segunda aplicação do estimulante. O material foi centrifugado a 18.000g durante 1 hora a 4 °C, para extração do soro C. Após extração, uma alíquota de 300 μL do soro C foi adicionada à 4 mL de um meio de reação contendo: 2,1 mL de tampão fosfato de potássio 0,2 M pH 7,4; 2 mL de sacarose a 0,3 M e 1,4 mL de água destilada e em seguida foi incubado em banho-maria a 30 °C e uma alíquota de 500 μL do meio reacional foram coletadas ao final de 10 e 70 minutos para a quantificação da atividade enzimática em DNS pelo método de Miller (1959).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados climáticos

A Figura 2A representa a flutuação da temperatura, umidade relativa do ar e de precipitação, ao longo do ano de 2014 e janeiro de 2015, para a região de Lavras – Sul de Minas Gerais, localizada a 34 Km de Nepomuceno onde foi realizado o experimento. As quatro coletas de dados (outubro a janeiro de 2015) foram realizadas dentro de uma faixa de precipitação média de 4,15 a 7 mm aos sete e 21 dias; 9,4 mm dos 21 aos 50 dias e 5,3 mm dos 50 até os 70 dias (final do experimento) representadas na Figura 2B.

Durante o período experimental, os valores de umidade relativa do ar mantiveram uma variação de 92,25% a 46,5%, a temperatura média foi de 22,4 °C e o índice médio de precipitação foi de 7,07 mm. As condições ideais para o cultivo da seringueira são associadas com os valores de temperatura máxima, mínima e precipitação pluvial de 30,4 °C, 22,8 °C e 72 mm respectivamente (RAO et al., 1998).

O ano de 2014 foi caracterizado por uma das mais graves crises hídricas que atingiu grandes áreas do Brasil, inclusive Minas Gerais, onde o índice de precipitação ficou significativamente abaixo do volume mínimo esperado para a estação chuvosa na região Sul de Minas (NETA et al., 2015).

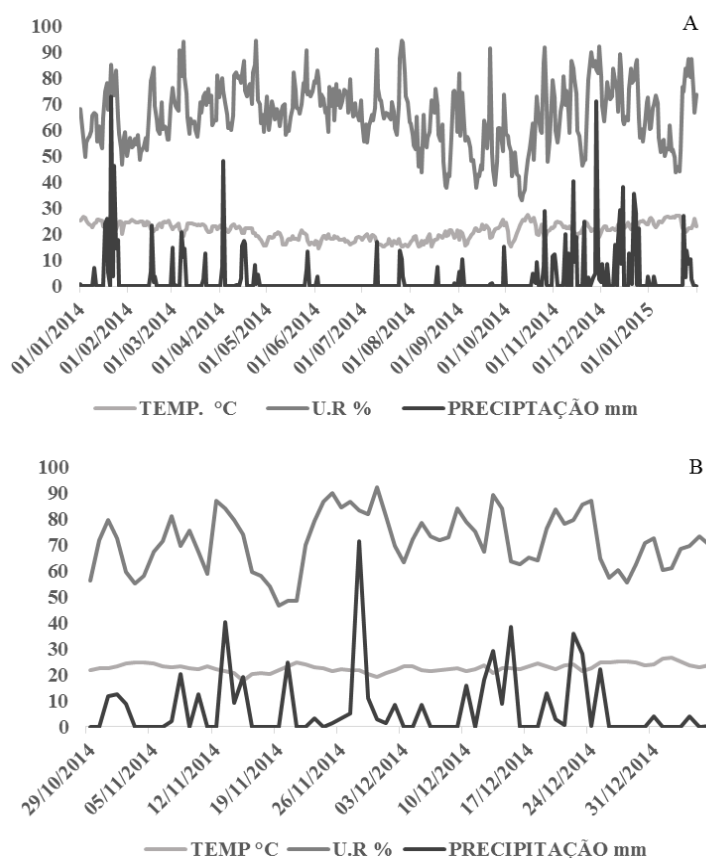


Figura 2 Temperatura, umidade relativa do ar e índice de precipitação. Na Figura 2A, estão representados os dados climáticos para o ano de 2014 e janeiro de 2015. Na Figura 2B, os mesmos dados são referentes ao período experimental (28 de outubro de 2014 a 06 de janeiro de 2015)

Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) - Estação: LAVRAS - MG.

Sob essa perspectiva, as características fisiológicas e de produtividade discutidas neste trabalho levam em consideração o período de seca atípico que antecede e persiste no período experimental (28 de outubro de 2014 a 06 de janeiro de 2015). Apesar das árvores selecionadas para o experimento não terem

apresentado durante o longo período sem precipitação, características visuais em respostas ao déficit hídrico, baixos teores de água no solo afetam as trocas gasosas como consequência do fechamento estomático que é desencadeado estrategicamente para reduzir a perda de água, porém, pode limitar a assimilação fotossintética de CO₂, ocasionando alterações no metabolismo de carboidratos que serão requeridos na biossíntese do látex e consequentemente na produtividade de borracha natural.

4.2 Produção de borracha seca e características do painel de sangria

Na Tabela 1, os dados de comprimento do corte, perímetro do caule, espessura da casca e área de seção de sangria, mostram que as plantas selecionadas foram uniformes em relação as características do painel de sangria, visto que tais características influenciam a produtividade em clones de seringueira.

Tabela 1 Características das árvores avaliadas (média de 16 árvores). SE: sem estimulação com Ethrel[®]; CE: com estimulação com Ethrel[®]

Tratamento	Comprimento do corte (cm)	Perímetro do caule (cm)	Espessura da casca (cm)	Área de Seção de Sangria (cm ²)
SE	36,0*	58,2*	0,5*	21,1*
CE	36,1	58,1	0,6	22,3
CV	5,75	5,76	19,06	24,64
EP	0,51	0,83	0,02	1,33

* Médias não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05).

Em seringueiras, produção e vigor estão inter-relacionados e, segundo Paardekooper, citado por Ho et al. (1973), mais da metade da variação na produção dos clones é devida às diferenças de circunferência do caule.

Entretanto, a precocidade de produção e de vigor somente é possível em uma árvore que se desenvolve vigorosamente na fase juvenil (SIMMONDS, 1989). Há evidência experimental de que o vigor esteja positivamente correlacionado com o desenvolvimento da circunferência do caule (EVERS et al., 1960).

Segundo Simmonds (1989), uma árvore de casca espessa torna-se mais fácil de ser sangrada e tem maior número de vasos laticíferos do que uma de casca fina. Partindo dessa hipótese, Narayanan et al. (1973) observaram que espessura de casca, diâmetro dos vasos e número de anéis de vasos laticíferos estão inter-relacionados em seringueiras adultas e correlacionados com a produção.

Uma correlação positiva entre perímetro do caule e espessura da casca também foi observada nas árvores avaliadas, como mostra a Figura 3.

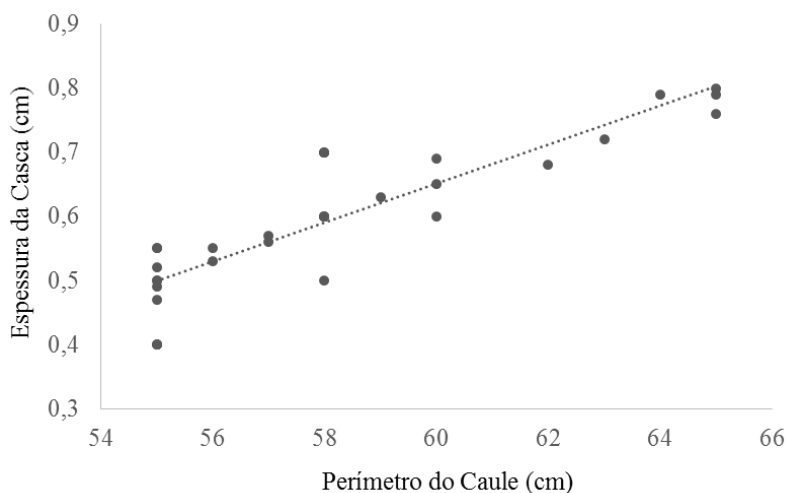


Figura 3 Correlação entre perímetro do caule e espessura da casca das 32 árvores avaliadas

Estudos realizados por Lavorenti et al. (1990) sobre a correlação entre caracteres fenotípicos para seleção e recomendação de clones produtivos, os

autores demonstraram que a circunferência do caule contribuiu com 36% da variação da produção.

Os valores médios de produção de borracha para os períodos de aplicação do Ethrel[®] estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 Produção de borracha seca (média de 16 árvores e 18 sangrias) e Índice de Obstrução dos vasos laticíferos (média de 5 árvores). SE: sem estimulação com Ethrel[®]; CE: com estimulação com Ethrel[®]

Tratamento	Produção de borracha seca		Índice de Obstrução (%)
	(g. árvore ⁻¹ .sangria ⁻¹)	(g.cm ⁻² de seção.sangria ⁻¹)	
SE	38 b	1,9 b	14,5 a
CE	53 a	2,7 a	8,0 b
CV	28,38	19,85	22,44
EP	4,78	0,31	1,14

As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05)

Os dados de produção correspondem a nove sangrias realizadas em cada uma das duas aplicações do estimulante, totalizando dezoito sangrias. As árvores estimuladas apresentaram um aumento de 40% da produção de borracha seca quando comparada as árvores não receberam aplicação do Ethrel[®]. No entanto, os valores de produção de borracha seca verificados nesse trabalho, diferem dos valores obtidos por Oliveira (2005), em que o uso do Ethrel[®] aumentou a produção de látex em 61,91% para o clone RRIM 600 com idade de 10 anos, atingindo valores 131,94 g. árvore⁻¹.sangria⁻¹. O mesmo autor destaca que a resposta à estimulação tende a ser mais positiva em plantas mais velhas, uma vez que a sangria acarreta uma redução de crescimento, visto que o material que seria utilizado para construção de novos tecidos é transferido para a borracha colhida. É possível que as diferenças entre os resultados do presente trabalho,

em comparação com os de Oliveira (2005) sejam justificados por diferenças na idade das plantas.

Outro fator que possivelmente influenciou na produtividade de borracha seca, foi o baixo índice de precipitação verificado antes e durante o experimento. Lima et al. (2002), avaliando clones RRIM 600, constataram que a maior produção de borracha ocorre nos períodos de maior precipitação e temperaturas médias mais elevadas, ressaltando que a umidade relativa do ar e a disponibilidade de água no solo contribuem para melhorar as condições hídricas das plantas e ainda aumentam o potencial de turgescência das células do tecido laticífero, permitindo maior fluxo de látex e contribuindo para o aumento da produção.

Contudo, as plantas que receberam estimulação, ainda assim, apresentaram um aumento significativo da produtividade. O Ethrel[®] interfere no mecanismo de bloqueio do escoamento do látex, com aumento do período de exsudação resultando em maior produtividade (BOATMAN, 1966). Admite-se que esse efeito é devido ao aumento da estabilidade dos lutoides, o que faz com que os laticíferos levem mais tempo para serem obstruídos às proximidades da superfície do corte (OLIVEIRA, 2005). Lutoides são partículas com membrana bipolarizada que contém o soro B, cuja rápida ação na floculação das partículas de borracha é responsável pela coagulação do látex e o rompimento destas partículas está relacionado à obstrução dos vasos laticíferos (BERNARDES, 1990). Desta forma, a estabilidade dos lutoides está inversamente relacionada ao índice de obstrução e diretamente relacionada com a produção de borracha (JACOB et al., 1985; CASTRO et al., 1990).

Os valores de índice de obstrução dos vasos laticíferos podem ser observados na Tabela 2, onde verifica-se que houve uma diminuição de 55% para as plantas estimuladas com Ethrel[®], o que provavelmente refletiu no aumento da produção, devido ao fato de ter ocorrido maior fluxo de látex durante a

realização da sangria, não somente nos cinco primeiros minutos, mas durante todo o tempo de sangria.

Em estudos utilizando centenas de clones obtidos de pés-francos previamente selecionados, foi observado que é possível inferir sobre a produção de árvores adultas de clones por meio do índice de obstrução das plantas jovens (HO et al., 1973). Os mesmos autores relatam que a seleção precoce utilizando esse critério reduziu em cerca de 50% o número de clones testados em experimentos, o que significou uma considerável redução no tamanho populacional e também no ciclo do melhoramento.

A circulação de água entre os tecidos do floema, bem como o conteúdo de água do látex, é de grande importância nos processos de fluxo de látex, e também são apontadas como responsáveis pela diminuição do índice de obstrução (YIP; GOMEZ, 1980).

A análise da atividade metabólica, com base na comparação entre o conteúdo de sacarose do látex e o teor de fosfato inorgânico (Pi), em diversas áreas da casca no tronco da seringueira estimuladas com Ethrel[®], pode confirmar a área de produção da casca (CHANTUMA et al., 2009). Segundo este autor, de acordo com o nível de sacarose concorrente, esta área de alta atividade metabólica pode ser dividida em duas partes distintas: i) A primeira área, com baixo teor de sacarose e alto Pi, próximo do corte, que poderia ser considerada como a área de regeneração do látex. ii) A segunda área, com altos teores de sacarose e Pi, mais distante do corte, que representa uma área altamente ativa de importação de sacarose, que consiste na reserva de sacarose para a próxima regeneração do látex. Trabalhos com a aplicação de sacarose (C¹⁴) na casca de seringueira resultaram no aparecimento de radioatividade nas frações do citosol e do látex coletado, e o processo foi acentuado pelo tratamento com estimulante da produção de látex (ESCHBACH et al., 1986).

A estimulação com Ethrel[®] induz ainda uma diminuição na concentração total de sólidos do látex, que corresponde à diluição, provavelmente devido a um influxo de água nos laticíferos (TUNGNGOEN et al., 2009). Como as células laticíferas maduras são desprovidas de plasmodesmas (DE FAY et al., 1989), sugere-se que aquaporinas podem ser chaves no mecanismo fisiológico do aumento induzido por etileno na produção de látex, uma vez que as aquaporinas podem ter sua atividade regulada ao nível pós-traducional em resposta aos tratamentos hormonais (TUNGNGOEN et al., 2009). O mesmo autor relata que as aquaporinas juntamente com a regulação dos transportadores de sacarose nos laticíferos, e a alcalinização citosólica dessas células, facilitam o influxo apoplástico de água. A combinação destes eventos pode ser responsável pelo prolongamento do fluxo de látex, representando, pelo menos, em parte, para o aumento induzido por etileno na produção de látex em clones de seringueira.

A cada sangria o látex flui através dos vasos laticíferos, no sentido do corte, de uma região da casca denominada área de drenagem ou de seção de sangria (BERNARDES, 1990). Essa área é condicionada pelos diferentes sistemas de exploração das árvores de seringueira.

Trabalhos realizados por Frey-Wyssling (1933) e posteriormente por Schweitzer (1941) mostraram que a área de drenagem situa-se quase inteiramente abaixo do corte de sangria, com duas pequenas zonas localizadas ao lado e acima do corte. A dimensão da área de drenagem, e particularmente, o comprimento longitudinal da área abaixo do corte, é provavelmente proporcional à capacidade de produção relativa da árvore (CASTRO et al., 1990).

A análise dos teores de água, açúcares redutores (AR) e sacarose nos tecidos da casca da seringueira estão representados na Tabela 3. O conteúdo de AR para as árvores estimuladas com Ethrel[®] foram maiores em relação ao controle. Já o teor de água e o conteúdo de sacarose não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos.

Tabela 3 Teor de água, açúcar solúvel total (AST), açúcares redutores (AR) e teores estimados de sacarose na matéria seca (MS) de tecidos da casca na região do painel das árvores avaliadas

Tratamento	Teor de água (%)	μmol de AST.g ⁻¹ MS	μmol de AR.g ⁻¹ MS	μmol de Sacarose.g ⁻¹ MS
SE	36,0*	1022,37 b	477,78 b	544,59*
CE	36,4	1164,77 a	602,08 a	562,68
CV	1,75	5,08	8,43	5,03
EP	0,23	13,89	11,38	6,95

* Médias não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (P<0,05).

Um menor teor de sacarose e maior teor de AR em regiões próximas ao corte, podem estar correlacionados à rápida utilização da sacarose através de sua hidrólise pelas isoformas de invertases ou SuSy, com a finalidade de disponibilizar hexoses para a biossíntese do látex (TUPY, 1985; CONDURÚ NETO, 1986), como também para a síntese de parede celular, fundamentais para os processos de regeneração da casca. Lima et al. (2002), analisando tecidos da casca, observaram que a quase totalidade dos açúcares solúveis totais (AST) foi composta de açúcares redutores, o que indica que a hidrólise da sacarose pelas isoformas de invertase, ou pela SuSy presentes nesse tecido, leva à maior disponibilidade de hexoses para a rota glicolítica e, conseqüentemente, possibilita a maior produção de borracha.

Outro aspecto importante, além da eficiência no suprimento de sacarose aos tecidos próximos à área de drenagem, é a pressão de turgescência do tronco no momento da sangria. No período que antecede à sangria, a pressão de turgescência no interior dos laticíferos encontra-se em equilíbrio com a dos tecidos circunvizinhos. A incisão feita para a extração do látex provoca a sua exsudação pela contração desses vasos. Isso promove uma redução na pressão de turgescência, estabelecendo uma diferença de potencial hídrico com os tecidos

adjacentes, resultando na transferência de água para os vasos laticíferos, o que causa a diluição do látex (BUTTERY; BOATMAN, 1967). A pressão de turgescência nos vasos laticíferos é facilitada pela translocação de água através de aquaporinas, que como dito anteriormente, têm sua expressão modulada pela estimulação com Ethrel[®] (TUNGNGOEN et al., 2009).

4.3 Atividade das invertases em tecidos da casca de seringueira

Na Figura 4, pode-se observar que houve diferença significativa para a atividade da IAV nos tecidos da casca de árvores de seringueira que receberam estimulação com Ethrel[®], em relação ao controle. Em todos os dias avaliados, o tratamento CE foi estatisticamente superior ao controle.

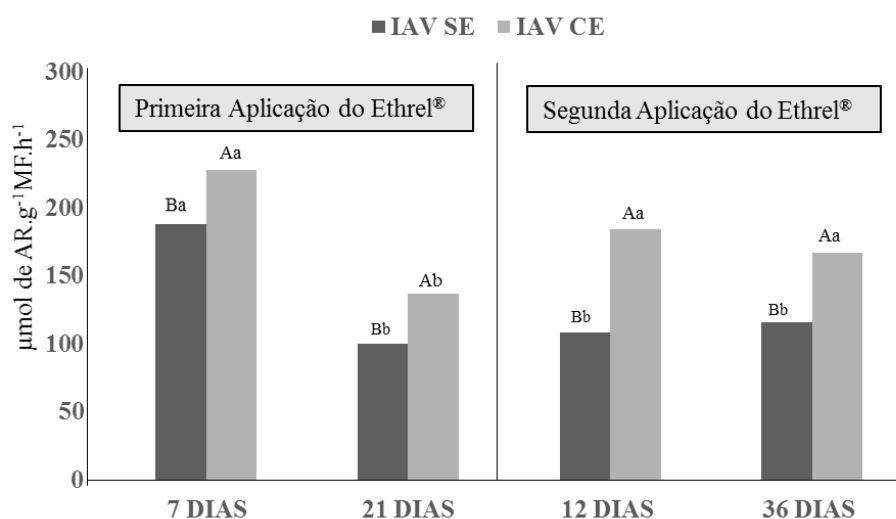


Figura 4 Atividade da invertase ácida do vacúolo (IAV). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem Ethrel® (CE e SE) em cada tempo e letras minúsculas comparam o efeito do tempo em cada tratamento.

O aumento da atividade da IVA pode estar correlacionado à acumulação de hexoses no vacúolo amenizando os efeitos do déficit hídrico. Os processos bioquímicos por serem dinâmicos, podem ser afetados por fatores endógenos e ambientais, principalmente em condições de baixa disponibilidade hídrica, o que pode causar a diminuição do volume celular e favorecer o acúmulo de açúcares (DAVIES; ROBINSON, 1996; SANTOS et al., 2013).

Estudos com milho relatam que a atividade da IAV pode ser estimulada por estresse hídrico. Foi verificado que a hidrólise da sacarose via IAV estimula o descarregamento do floema e o sequestro de sacarose pelo vacúolo, e consequentemente contribui para a manutenção da turgescência celular através

de uma possível queda no potencial osmótico, através do acúmulo de hexoses nesse compartimento (KIM et al., 2000).

O acúmulo de metabólitos em plantas (ajustamento osmótico) sob déficit hídrico proporciona redução do potencial osmótico mediante aumento líquido na concentração de solutos intracelulares (CHAVES, 1991). Esse ajustamento pode auxiliar a seringueira a manter o turgor, sustentando o influxo de água dentro dos tecidos internos da casca, contribuindo e prolongando o fluxo de látex.

Deste modo, o aumento da atividade da IAV pode ter correlação positiva com a baixa precipitação registrada na região onde foi realizado o experimento, bem como, com a aplicação do Ethrel[®], uma vez que os maiores valores para IAV foram obtidos das plantas que receberam a estimulação.

Tem sido relatado que o tratamento da casca da seringueira com Ethrel[®] ativa uma ATPase ligada ao tonoplasto do vacúolo (GIDROL, 1988), translocando prótons do citosol para este compartimento e conseqüentemente, favorecendo a acidificação do tonoplasto e a alcalinização do pH citosólico a favor de processos metabólicos, melhorando o catabolismo de sacarose no meio intracelular e a regeneração do látex em células laticíferas através da ativação de várias enzimas dependentes do pH (JACOB et al., 1982; CHRESTIN, 1984). Foi demonstrado também, que a acidificação vacuolar é concomitante com o aumento do teor de ATP no látex (AMALOU et al., 1992). A IAV promove a clivagem da sacarose com maior eficiência, quando submetidas a níveis de pH situados entre 4,5 e 5,0 e a atividade da INC é maximizada em níveis de pH situados entre 7,0 e 7,8. Deste modo, o aumento da atividade da ATPase ligada ao tonoplasto, pode ser uma provável explicação para a resposta positiva à estimulação com Ethrel[®], tanto para IVA pela acidificação do vacúolo, quanto também para INC (Figura 5) pela alcalinização do citosol.

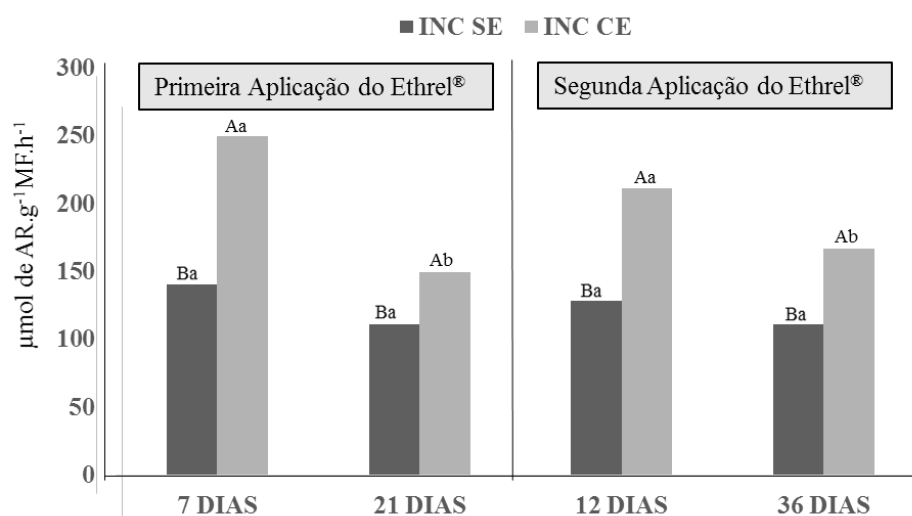


Figura 5 Atividade da invertase neutra do citosol (INC). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem Ethrel® (CE e SE) em cada tempo e letras minúsculas comparam o efeito do tempo em cada tratamento.

A atividade da INC apresentada na Figura 5 foi estatisticamente superior nas plantas que receberam estimulação em ambos os períodos de aplicação do Ethrel®. Das três isoformas de invertase analisadas na casca, a INC foi a que mais respondeu à estimulação, sendo que na média das quatro avaliações, a atividade da INC das plantas que receberam estimulação com Ethrel®, superou em 37% as plantas controle. Entretanto, nas duas aplicações, o efeito do estimulante caiu após a aplicação, apesar de ainda assim, as árvores estimuladas (CE) apresentarem maior atividade da INC que as árvores que não receberam estimulação (SE). Em estudos sobre os efeitos da estimulação com Ethrel® no clone PB217, realizados por Dusotoit-Coucaud et al. (2010) em árvores virgens e maduras, foi verificado que a estimulação aumentou o fluxo de látex

especialmente para as primeiras sangrias, chegando a ser 27 vezes maior que o controle, 40 horas após o tratamento.

De forma análoga a IAV, a INC também pode ter seu desempenho provavelmente favorecido pelo aumento da atividade de uma ATPase, porém, ligada à membrana plasmática que tem sua atividade promovida pela estimulação com Ethrel[®], intensificando um sistema simporte de sacarose-H⁺, envolvido na absorção desse açúcar em laticíferos (BOUTEAU et al., 1992). Estudos de rotulagem comprovaram que a sacarose possui alta afinidade para o simporte com H⁺ através da membrana plasmática de laticíferos e que esta característica revela a grande capacidade desse dreno peculiar para importação desse açúcar (TANG et al., 2010).

A estimulação com Ethrel[®] também poderia intensificar a atividade da INC através de um provável efeito no aumento de transportadores de sacarose. Os transportadores de sacarose desempenham um papel importante no carregamento e descarregamento do floema e participam na transferência de sacarose entre os compartimentos apoplásticos e simplásticos (RIESMEIER et al., 1994; BÜRKLE et al., 1998; BRAUN; SLEWINSKI, 2009; CHEN et al., 2012)

Dos transportadores de sacarose já estudados, apenas dois (*HbSUT1A*, *HbSUT2A*) foram encontrados para ser, em diferentes graus, significativamente estimulados pelo etileno (DUSOTOIT-COUCAUD et al., 2010) e promover um maior abastecimento de sacarose para o meio intracelular dos laticíferos (COUPÉ; CHRESTIN, 1989; ZHU; ZHANG, 2009). Geralmente esses transportadores de sacarose são codificados por uma família multigênica (MARGER; SAIER, 1993) e desempenham um papel fundamental em processos fisiológicos tanto nos órgãos fonte, como nos drenos (ZHU; ZHANG, 2009). A disponibilidade de transportadores de sacarose nos tecidos da casca da seringueira, eventualmente, pode estar envolvida na maior atividade das

invertases solúveis (IVA e INC), por facilitar a entrada desse substrato do apoplasto para o citosol e conseqüentemente do citosol para o vacúolo.

Um fator importante e que deve ser levado em consideração, é o fato de que todos os mecanismos citados neste trabalho para justificar a alta atividade da INC, podem também favorecer a atividade da sacarose-sintase (SuSy), uma vez que ambas possuem a mesma localização celular. Apesar de estarem envolvidas na hidrólise de um mesmo substrato – sacarose –, a participação de cada uma dessas enzimas nos diversos processos que levam ao crescimento e desenvolvimento de plantas se dá de forma diferenciada (CAIRO et al., 2009). O alto K_m da SuSy para a sacarose e limitações impostas a esta enzima pelas concentrações de UDP no citosol (AVIGAD, 1982; LOEFI et al. 1999) não impedem totalmente que sua atividade possa ter sido sobreposta à atividade da INC. Tupy e Primot (1976) observaram que, em condições naturais, a clivagem da sacarose pela SuSy pode ser significativa, principalmente na regeneração da casca (KOCH, 2004). No entanto, os mesmos autores relatam que a aplicação de Ethrel[®] à casca é seguida de um aumento da utilização de sacarose e da produção de borracha, induzido pelo aumento do pH que leva a uma maior atividade das invertases. Nesse caso, sugere-se que maiores investigações sejam realizadas sobre a participação de cada uma dessas enzimas na hidrólise de sacarose e regeneração da casca em plantas de seringueira estimuladas com Ethrel[®].

Outras evidências sugerem que alterações na nutrição mineral podem influenciar a atividade de algumas enzimas (PRADO, 1979; JACOB et al., 1982). Segundo esses autores, alguns ativadores, como fosfatos, nitratos e tióis, podem estar presentes no citosol em concentrações suficientes para promover a alcalinização desse compartimento e influenciar a atividade da invertase neutra, cuja ação sobre a hidrólise da sacarose representa uma etapa chave na biossíntese de látex. Porém, não há na literatura, nenhuma correlação entre a

estimulação com Ethrel® e nutrição mineral, sobre a atividade das diferentes isoformas de invertase em seringueira.

Neste trabalho, a atividade da INC também foi avaliada no látex, o que pode ser justificado pelo fato do látex ser essencialmente o conteúdo citoplasmático de células laticíferas (GOMEZ; MOIR, 1979; D'AUZAC; JACOB, 1993; DE FAY; JACOB, 1989; CHOW et al., 2012).

Na Figura 6, há uma comparação entre a atividade da INC analisada em tecidos da casca da seringueira e da invertase neutra encontrada no látex (INL) em amostras coletadas aos 50 dias do experimento e que correspondem aos 12 dias após a segunda aplicação do Ethrel®.

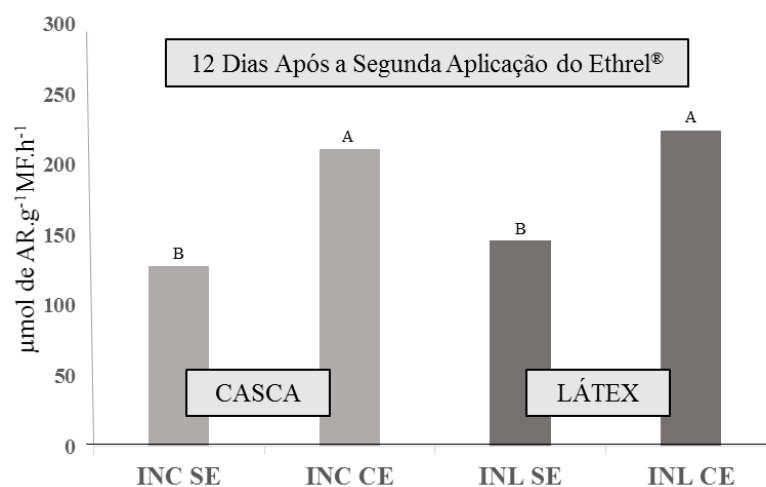


Figura 6 Atividade da invertase neutra do citosol (INC) e invertase neutra do látex (INL). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem Ethrel® (CE e SE) em tecidos da casca da seringueira (INC) e no látex (INL)

A atividade da invertase neutra no citosol (INC) e da invertase neutra no látex (INL) apresentaram diferenças significativas entre as plantas que receberam a aplicação do estimulante Ethrel[®] e as plantas controle. No entanto, não houve diferença em relação ao tipo de material analisado, o que mostra claramente que a atividade da isoforma citosólica analisada no látex, pode ser usada para se estimar a atividade da INC em tecidos da casca, pois apresentam os mesmos valores.

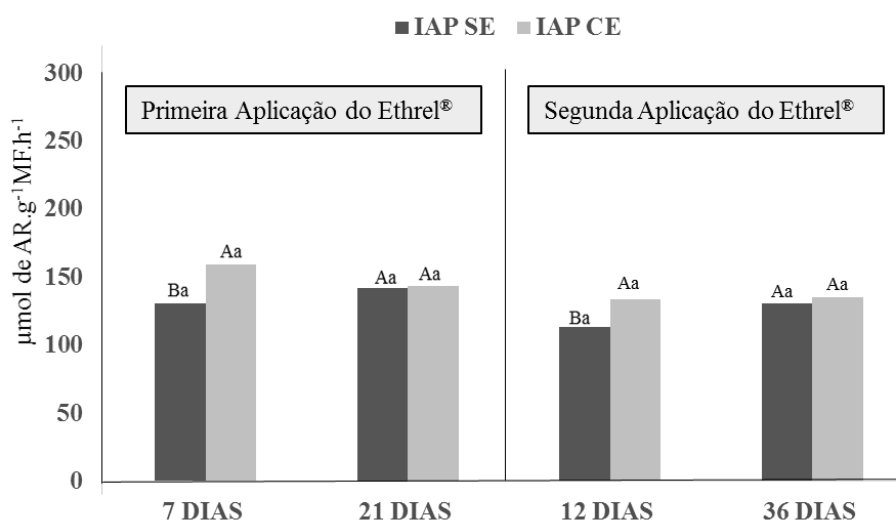


Figura 7 Atividade da invertase ácida da parede celular (IAP). As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem Ethrel[®] em cada tempo e letras minúsculas comparam o efeito do tempo em cada tratamento CE e SE

A atividade da invertase ácida da parede celular (IAP) das plantas estimuladas apresentou aumento significativo apenas nas primeiras coletas após a aplicação do estimulante (sete e 12 dias) como pode ser observado na Figura 7.

Contudo, esse aumento não foi tão expressivo quanto o verificado para IAV e INC entre as plantas que receberam estimulação.

O inexpressivo aumento da atividade da IAP, quando comparada com o aumento das outras isoformas intracelulares (IAV e INC), pode ser atribuído ao fato desta enzima (IAP) estar praticamente saturada pelo substrato (sacarose). A aplicação do Ethrel[®] praticamente em nada alterou sua atividade, porém intensificou a atividade das isoformas intracelulares. Isto ocorreu provavelmente, como consequência de um aumento na expressão de transportadores de sacarose influenciado pela estimulação com Ethrel[®] e que facilitam a transferência desse açúcar entre os compartimentos apoplásticos e simplásticos. Ainda assim, a atividade da IAP na hidrólise de sacarose no apoplasto é importante, pois estabelece um gradiente de concentração da fonte para o dreno determinando a força do dreno.

Em seringueiras não estimuladas com Ethrel[®], foi verificada pelo método *in vivo*, uma melhor quantificação da atividade da IAP, com reflexos na atividade invertásica ácida total, por basear-se na incorporação do tecido vegetal fragmentado - e não do extrato enzimático - ao meio de reação (Cairo et al., 2009). Porém, Cairo et al. (2009) destacam que a metodologia empregada tende a favorecer a quantificação de açúcares redutores produzidos pela ação da IAP, uma vez que, para quantificação da atividade das invertases solúveis (IAV e INC), a sacarose presente no meio de reação precisa ser transportada, através da membrana plasmática, para o citosol para ser hidrolisada pela INC, ou ainda do citosol para o vacúolo para que a hidrólise possa ser realizada pela IAV e os açúcares redutores produzidos precisam percorrer o trajeto inverso para que possam ser quantificados. No entanto, neste trabalho, nas plantas controle (SE), nenhuma variação entre as três isoformas de invertase foi verificada, como pode ser observado na Figura 8, onde está representada a média do total da atividade das três isoformas de invertase, das quatro amostras coletadas neste

experimento. Entretanto, nas plantas que receberam estimulação (CE), a atividade da IAP foi menor que a verificada para IAV e INC.

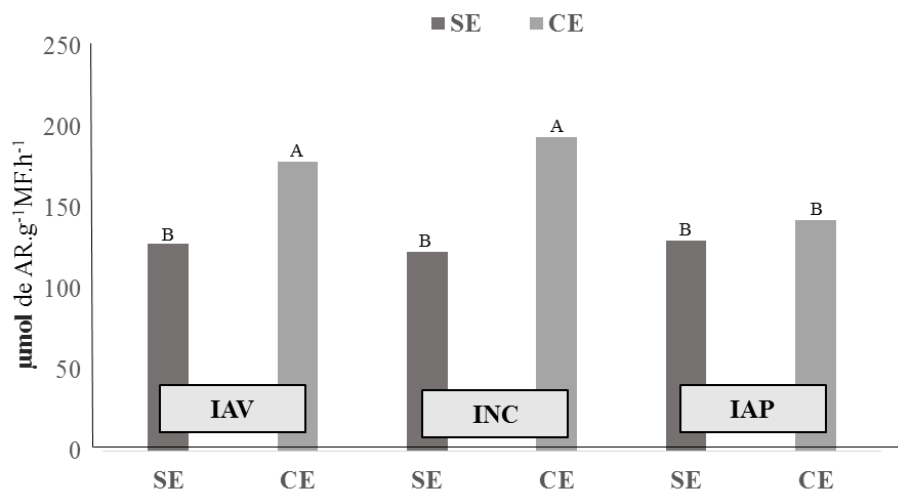


Figura 8 Atividade total das três isoformas de invertase (IAV, INC e IAP) para as quatro coletas realizadas durante o experimento. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparam os tratamentos com e sem Ethrel[®] (CE e SE)

Os fatores climáticos entre outubro de 2014 a janeiro de 2015, especificamente o baixo índice de precipitação no período que antecede e permanece durante o período experimental, possivelmente interferiram nas respostas das isoformas solúveis (IAV e INC), como consequência da adaptação ao déficit hídrico, por meio do qual o aumento líquido na concentração de solutos no interior das células pode auxiliar na manutenção da turgescência, permitindo às plantas manterem suas atividades metabólicas, crescimento e produtividade (TURNER, 1997). A partir de trabalhos produzidos na última

década, tornou-se evidente que as plantas percebem e respondem rapidamente mesmo a alterações pequenas na disponibilidade hídrica através de uma série de eventos fisiológicos, celulares e moleculares que ocorrem em sequência ou em paralelo (CHAVES et al., 2009).

Contudo, o aumento da atividade da IAV e INC também pode ter sido influenciado principalmente pela estimulação com Ethrel[®]. Entretanto, estudos complementares devem ser realizados para se verificar a resposta à estimulação, das diferentes isoformas de invertases sob a influência de fatores climáticos em tecidos da casca de seringueira, que não foi objeto de estudo e atenção nesta pesquisa.

5 CONCLUSÕES

- a) O uso do estimulante Ethrel[®] aumentou o desempenho produtivo do clone RRIM 600;
- b) A estimulação com Ethrel[®] aumentou a produção de borracha seca por área de seção de sangria;
- c) Em seringueiras estimuladas com Ethrel[®], houve uma diminuição no Índice de Obstrução dos vasos laticíferos;
- d) A aplicação do estimulante Ethrel[®] no painel de sangria aumentou a atividade das enzimas invertase ácida do vacúolo e invertase neutra do citosol em tecidos da casca da seringueira na região do painel de sangria.

REFERÊNCIAS

AGRE, P. Aquaporin water channels. **Bioscience reports**, London, v. 24, n. 3, p. 127-163, 2004.

AGRIDATA. **Agricultura**: seringueira. 2004. Disponível em: <<http://www.agridata.mg.gov.br/sering.html>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

ALVARENGA, A. P. et al. Determinação do carbono orgânico na biomassa da seringueira em solos de Minas Gerais. **Borracha natural**, Piracicaba, v. 10, 2003. Disponível em: <<http://www.borrachanatural.agr.br/artigos/pdf/CBCS20032.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2014.

AMALOU, Z. et al. Evidence for anamiloride-inhibited $Mg_2^+/2H^+$ antiporter in luteoid (vacuolar) vesicles from latex of *Hevea brasiliensis*. **Plant physiology**, Rockville, v. 100, n. 1, p. 255-260, 1992.

AOAC-ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 17th. Washington, D.C.: AOAC International, 2000. 1219 p.

AVIGAD, G. Sucrose and other disaccharides. In: LOEWUS, F. A.; TANNER, W. *Plant Carbohydrates I*. Heidelberg: Springer, 1982. v.13, p. 217-347

AZZINI, A. et al. O diâmetro dos tubos crivados e a produção de borracha em clones de seringueira. **Bragantia**, Campinas, v. 57, n. 1, p. 57-60, 1998.

BENESI, J. F. C.; OLIVEIRA, M. A. **Sangrador de seringueira: sangria de seringueira**. São Paulo: Senar, 2000. 57 p.

BERNARDES, M. S. **Efeito de métodos químicos de indução de copa no desenvolvimento da seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg. cv. RRIM 600)**. 192 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade de São Paulo, SP, 1990.

BICK, J. A.; LANGE, B. M. Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 415, n. 2, p. 146-154, 2003.

BILSKA, A.; SOWINSKI, P. Closure of plasmodesmata in maize (*Zea mays*) at low temperature: a new mechanism for inhibition of photosynthesis. **Annals of Botany**, Oxford, v.106, n.1, p. 675-686, 2010.

BLACKLEY, W. S.; SCATTERGOOD, R. O. Ductile-regime machining model for diamond turning of brittle materials. **Precision engineering**, [S.l.], v. 13, n. 2, p. 95-103, 1991.

BLACKMAN, L. M.; OVERALL, R. L. Structure and function of plasmodesmata. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 28, n. 7, p. 711-727, 2001.

BOATMAN, S. G. Preliminary physiological studies on the promotion of latex flow by plant growth regulators. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaya**, Kuala Lumpur, v. 19, n. 5, p. 243-258, 1966.

BOLOURI-MOGHADDAM, M. R. et al. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. **FEBS journal**, Cambridge, v. 277, n. 9, p. 2022-2037, 2010.

BOUTEAU, F. et al. Evidence of multiple sugar uptake across the plasma membrane of laticifer protoplasts from *Hevea*. **Bioelectrochemistry and bioenergetics**, London, v. 48, n. 1, p. 135-139, 1999.

BOUTEAU, F. et al. Sucrose/H⁺ and glucose/H⁺ symports at the plasma membrane of laticiferous cells and protoplasts of *Hevea brasiliensis*. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, Kottayam, v. 5, n. 1/2, p. 25-37, 1992.

BRANCALHÃO, R. M. C. et al. Prática de laboratório: visualização de plasmodesmas no pimentão. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar**, Maringá, v. 8, n. 2, p. 61-63, 2013.

BRAUN, D. M.; SLEWINSKI, T. L. Genetic control of carbon partitioning in grasses: roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 1, p. 71-81, 2009.

BÜRKLE, L. et al. The H⁺-sucrose cotransporter *NtSUT1* is essential for sugar export from tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 118, n. 1, p. 59-68, 1998.

BUTTERY, B. R.; BOATMAN, S. G. Effects of Tapping, Wounding, and Growth Regulators on Turgor Pressure in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 644-659, 1967.

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

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

CASTRO, P. R. C. et al. Efeito do *ethephon* na maturação e produtividade da cana-de-açúcar. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 76, n. 2, p. 277-290, 2001.

CASTRO, P. R. C. et al. Uso de estimulantes na exploração de seringais. In: **SOBRE A CULTURA DA SERINGUEIRA**, 2., 1987 Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: USP/ESALQ, Departamento de Agricultura, 1990. p.253-72.

CASTRO, P. R. C.; VIRGENS, A. C. Fisiologia da seringueira. In: **SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DA SERINGUEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO**, 1., 1986 . Piracicaba. **Anais...** Campinas, SP: Fundação Cargill, 1986. 333p.

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

CARDOSO NETA, L.; MOREIRA, G.L.; GOMES, R.G. Descargas atmosféricas e condições ambientais associadas a convecção profunda: um caso de estudo. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 115-123, 2015.

CEPLAC-COMISSÃO EXECUTIVA DA LAVOURA CACAUEIRA. **Crise no mercado da borracha ameaça a sobrevivência da heveicultura no Brasil**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/restrito/lerNoticia.asp?id=2201>> Acesso em: 25 jan. 2014.

CHANTUMA, P. et al. Carbohydrate storage in wood and bark of rubber trees submitted to different level of C demand induced by latex tapping. **Tree physiology**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 1021-1031, 2009.

CHAVES, M. M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 1-16, 1991.

CHAVES, M. M. et al. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of botany**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 551-560, 2009.

CHEN, L. Q. et al. Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. **Science**, Washington, v. 335, n. 6065, p. 207-211, 2012.

CHOW, K. S. et al. Metabolic routes affecting rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis* latex. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 63, n. 5, p. 1863-1871, 2012.

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

CHRESTIN, H. et al. Role of the luteoidictyonoplast in the control of the cytosolic homeostasis within the laticiferous cells of *Hevea*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 269-277, 1984.

CONDURÚ NETO, J. M. H. **Fatores limitantes e parâmetros fisiológicos da produção da seringueira**. Belém: Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 1986. 20 p.

COPELAND, L. Enzyme sof sucrose metabolism. **Methods in plant biochemistry**, Amsterdam, v. 3, n.1, p. 73-85, 1990.

COSTA, R. B. et al. Variabilidade genética e seleção para caracteres de crescimento da seringueira. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 2, p. 299-305, 2008.

COUPÉ, M.; CHRESTIN, H. Physico-chemical and biochemical mechanisms of hormonal (ethylene) stimulation. In: D'AUZAC, J.; JACOB, JL; CHRESTIN, L. (Eds.). *Physiology of Rubber Tree Latex: the laticiferous cell and latex-a model of cytoplasm*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989. p. 295-319.

CYR, R. J. Calcium/calmodulin affects microtubule stability in lysed protoplasts. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 100, n. 2, p. 311-317, 1991.

D'AUZAC, J.; JACOB, J. L. The composition of latex from *Hevea brasiliensis* a laticiferous cytoplasm. **Clinical Reviews in Allergy**, New York, v. 11, n. 3, p. 325-337, 1993.

D'AUZAC, J.; JACOB, J. L.; CHRESTIN, L. (Eds.) **Physiology of rubber tree latex: the laticiferous cell and latex-a model of cytoplasm**. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1989. 463 p.

DAVIES, C.; ROBINSON, S. P. Sugar accumulation in grape berries (cloning of two putative vacuolar Invertase cDNAs and their expression in grape vine tissues). **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 1, p. 275-283, 1996.

DE CAMARGO, A. P. et al. Paes. **Zoneamento climático da heveicultura no Brasil**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2003. 19 p.

DE FAY, E. et al. The distribution of plasmodesmata in the phloem of *Hevea brasiliensis* in relation to laticifer loading. **Protoplasma**, Viena, v. 149, n. 2-3, p. 155-162, 1989.

DE FAY, E.; JACOB, J. L. Symptomatological, histological and cytological aspects. In: D'AUZAC, J.; JACOB, JL; CHRESTIN, L. (Eds.). **Physiology of Rubber Tree Latex: the laticiferous cell and latex-a model of cytoplasm**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989. p. 407-428.

DICKENSON, P. B. Electron microscopical studies of latex vessel system of *Hevea brasiliensis*. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaya**, Kuala Lumpur, v. 21, n. 1, p. 543-59, 1969.

DUSOTOIT-COUCAUD, A. et al. Ethylene stimulation of latex yield depends on the expression of a sucrose transporter (*HbSUT1B*) in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Tree physiology**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 1586-1598, 2010.

EISENREICH, W. et al. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends in plant science**, London, v. 6, n. 2, p. 78-84, 2001.

ESAÚ, K. **Plant anatomy**. New York: J. Wiley, 1953.735 p.

ESCHBACH, J. M. et al. Photosynthate allocation and productivity of latex vessels in *Hevea brasiliensis*. **Biologia plantarum**, Dordrecht, v. 28, n. 5, p. 321-328, 1986.

ESCHBACH, J. M.; TONNELIER, M. **Influence of the method of stimulation, the concentration of the stimulant and the frequency of its application on the yield of GT-1 in the Ivory Coast.** Montpellier: IRCA-CIRAD, CR. Coll. Experimental Physiology, 1984. p. 295-306

EVERS, E. et al. **Relations entre climat, la phénologie et la production de l'*Hevea*.** Bruxelles: INEAC, 1960. 71 p. (Série Scientifique, 84).

EVERT, R. F. Epidermis. **Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development.** 3th. [Nova Jersey: John Wiley & Sons], 2006. p. 211-253.

FAHN, A. Secretory tissues in vascular plants. **New phytologist**, Lancaster, v. 108, n. 3, p. 229-257, 1988.

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

FERREIRA, D. F. **SISVAR** Sistemas de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, 2002.

FISHER, D. G. Plasmodesmatal frequency and other structural aspects of assimilate collection and phloem loading in leaves of *Sonchus oleraceus* (Asteraceae), a species with minor vein transfer cells. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 78, n. 11, p. 1549-1559, 1991.

FOYER, C. H. et al. Adaptations of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to changes in nitrate reductase activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, n. 1, 171-178, 1994.

FREY-WYSSLING, A. Ueber die physiologische Bedeutung der extrafloralen Nektarien von *Hevea brasiliensis* Müll. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 42, n. 1, p. 109-122, 1933.

FROMMER, W. B.; SONNEWALD, U. Molecular analysis of carbon partitioning in *solanaceous* species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 587-607, 1995.

GALIANI, P. D. et al. Seasonal and clonal variations in technological and thermal properties of raw *Hevea* natural rubber. **Journal of Applied Polymer Science**, Malden, v. 122, n. 4, p. 2749-2755, 2011.

GASPAROTTO, L. **Epidemiologia do mal das folhas (*Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx) da seringueira (*Hevea* spp.)**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988, 124 p.

GIDROL, X. et al. Early activation by ethylene of the tonoplast H⁺-pumping ATPase in the latex from *Hevea brasiliensis*. **Plant physiology**, Rockville, v. 86, n. 3, p. 899-903, 1988.

GOMEZ, J. B.; MOIR, G. F. J. The ultracytology of latex vessels in *Hevea brasiliensis*. **Malaysian Rubber Research and Development Board Monographs**, Malaysia, n. 4, 1979.

GONÇALVES, P. de S. et al. Variabilidade genética da produção anual da seringueira: estimativas de parâmetros genéticos e estudo de interação genótipo x ambiente. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n. 2, p. 305-320, 1990.

GONÇALVES, P. de S. et al. Comportamento preliminar de alguns clones de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.10, p.1447-1456, 1982.

GONZÁLEZ, M. C. et al. Circadian and developmental regulation of vacuolar invertase expression in petioles of sugar beet plants. **Planta**, Heidelberg, v. 222, n. 2, p. 386-395, 2005.

HÉBANT, C. Ontogénie des laticifères du système primaire de l' *Hevea brasiliensis*: une étude ultrastructurale et cytochimique. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, n. 6, p. 974-985, 1981.

HIRSCHE, J. et al. Interspecies compatibility of the anther specific cell wall invertase promoters from Arabidopsis and tobacco for generating male sterile plants. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 118, n. 2, p. 235-245, 2009.

HO, C. Y. et al. Clonal nursery studies in *Hevea* I. Nursery yields and associated structural characteristics and their variations. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaya**, Kuala Lumpur, v. 23, n. 4, p. 305-16, 1973.

HODGE, J. E.; HODFREITER, B. R. Determination of reducing sugars and carbohydrate. In: WILSTER, R.C.; WOLFRON, M.I. (Eds.). **Methods in carbohydrate chemistry**, Academic Press, New York, v. 1, p. 380-398. 1962.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. **Programa Seringueira**. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/>>. Acesso em: 06 set. 2014.

INAMDAR, J. A. et al. Ultrastructure of non-articulated laticifers in *Allamanda violacea*. **Annals of botany**, Oxford, v. 62, n. 6, p. 583-588, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Informe Agropecuário nº 246**. Disponível em: <www.ibge.org.br/informeagro246>. Acesso em: 17 jan. 2014.

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Production and Consumption of natural rubber**. Disponível em: <<http://www.rubberstudy.com/documents/WebSiteData.pdf>> Acesso em 27 de dez. 2014.

JACOB, J. L. et al. Physiological basis for latex diagnosis of the functioning of the laticiferous system in rubber trees: proceedings. In: INTERNACIONAL RUBBER CONFERENCE, 5., 1985, Kuala Lumpur. **Anais...**Kuala Lumpur: Rubber Research Institute, 1985. p. 49-65.

JACOB, J. L. et al. Physiological activators of invertase from *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochemistry**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 887-893, 1982.

JONNHANES, R. A. T. et al. **Nepomuceno SF.23-V-D-III, escala 1:100.000**: nota explicativa. Belo Horizonte: Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais, 2007. 92 p.

KANG, B. H. et al. Miniature1-encoded cell wall invertase is essential for assembly and function of wall-in-growth in the maize endosperm transfer cell. **Plant physiology**, Rockville, v. 151, n. 3, p. 1366-1376, 2009.

KEKWICK, R. G. O. The formation of isoprenoids in *Hevea* latex. In: D'AUZAC, J.; JACOB, J.L.; CHERSTIN, L.(Eds.). **Physiology of rubber tree latex**. Boca Raton: CRC Press Inc. p. 145-164, 1989.

KIM, J. Y. et al. A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. **Plant Physiology**, Rockville, v. 124, n. 1, p. 71-84, 2000.

KIRBY, J. et al. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v. 60, n.1, p. 335-355, 2009.

KO, J. H. et al. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (to rubber tree). **Plant molecular biology**, Dordrecht, v. 53, n. 4, p. 479-492, 2003.

KOCH, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current opinion in plant biology**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 235-246, 2004.

LAVORENTI, C. et al. Relação entre diferentes caracteres de plantas jovens de seringueira. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n. 1, p. 93-103, 1990.

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

LOEFI, S. M. et al. Feeding orotate leads to a specific increase in uridine nucleotide levels, resulting in a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis in discs of growing potato tubers. **Planta**, Heidelberg, v. 209, n. 1, p. 314-323, 1999.

LUNN, J. E.; FURBANK, R. T. Tansley Review No. 105. **New Phytologist**, Lancaster, v. 143, n. 2, p. 221-237, 1999.

MARGER, M. D.; SAIER, M. H. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. **Trends in biochemical sciences**, London, v. 18, n. 1, p. 13-20, 1993.

MARQUES, J. R. B.; GONÇALVES, P. S. Testes precoces de produção na seleção de plantas de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 7, p. 1065-1077, 1990.

MENDES, A. D. R. et al. Concentração e redistribuição de nutrientes minerais nos diferentes estádios foliares de seringueira. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 42, n. 4, p. 525-532, 2012.

MESQUITA, A. C. **Desempenho da seringueira (*Hevea brasiliensis* (Wild. ex. Ahr. de Juss.) Muell. Arg.) relacionado a caracteres fisiológicos e anatômicos em Lavras-MG**. 2004. 151 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

MESQUITA, A. C.; OLIVEIRA, L. E. M. Características anatômicas da casca e produção de látex em plantas de seringueira não enxertadas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 2, p. 241-246, 2010.

MESQUITA, A. C. et al. Sazonalidade da produção e características do látex de clones de seringueira em Lavras, MG. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 4, p. 633-639, 2006a.

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

MIGUEL, A. A. et al. Photosynthetic behaviour during the leaf ontogeny of rubber tree clones [*Hevea brasiliensis* (WILD. EX. ADR. DE JUSS) MUELL. - ARG.], in Lavras, MG. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 91-97, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAES, V. H. F. **Estimulação da produção de látex em seringais nativos**. Manaus: EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Seringueira e Dendê, 1978. 9 p.

NARAYANAN, R. et al. Some structural factors affecting the productivity of *Hevea brasiliensis*: II. Correlation studies between structural factors and yield. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaya**, Kuala Lumpur, v. 23, n. 1, p. 285-297, 1973.

NELSON, N. et al. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 153, n. 2, p. 375-380, 1944.

OLIVEIRA, D. M. Efeitos do ethefon sobre a produção de borracha em plantas de seringueira. In: CONGRESSO DOS PÓS GRADUANDOS, 14., 2005, Lavras. **Anais...** Lavras, MG: UFLA, 2005. p. 1-7.

OLIVEIRA, L. E. M. et al. Assimilação e transporte de carbono e biossíntese de látex em seringueira. In: ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Ed.). **Seringueira**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2008. p. 601-640.

ORTOLANI, A. A. Agroclimatologia e o cultivo da seringueira. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DA SERINGUEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO, 1., Piracicaba, 1986. **Trabalhos apresentados**. Campinas: Fundação Cargill, 1986. p. 11-32.

PICKARD, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytologist**, Lancaster, v. 177, n. 4, p. 877-888, 2008.

PONTIN, J. C. Avaliação de maturadores vegetais na cana-de-açúcar. **Álcool e Açúcar**, Piracicaba, v.77, n.4, p.16-18, 1995.

PRADO, F. E. et al. Ammonium heptamolybdate, an inhibitor of plant invertases. **Phytochemistry**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 1799-1802, 1979.

PROELS, R. K. et al. Gibberellin-dependent induction of tomato extracellular invertase Lin7 is required for pollen development. **Functional Plant Biology**, Sydney, v. 33, n. 6, p. 547-554, 2006.

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

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

RAO, P. S. et al. Studies on the relationship between yield and meteorological parameters of para rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Agricultural and Forest Meteorology**, Connecticut, v. 90, n. 3, p. 235-245, 1998.

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

RIBAILLIER, D. Importance des luto í desdans l'écoulement du latex: Action de la stimulation. **Revue generale du caoutchouc**, Paris, v. 47, n. 1, p. 305-10, 1970.

RIBAILLIER, D. Quelques aspects du rôle des luto í desdans la physiologie et l'écoulement du latex *d' Hevea brasiliensis* (Kanth) Muell. Arg. Action de produitslibérant de l'ethylène. **Horticultural Science Abstracts**, Wallington, v. 43, n. 1, p. 92-16, 1972.

RIESMEIER, J. W. et al. Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 13, n. 1, p. 1, 1994.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2006.

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

RUAN, Y.L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. **Annual review of plant biology**, Palo Alto, v. 65, n. 26, p. 33-67, 2014.

RUFINO, D. T. C. **Zoneamento ecológico para a cultura da seringueira no Estado de Minas Gerais**. 1986. 70 p. Tese (Masgister Scientiae em Meteorologia agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1986.

SANTOS, C. M. G. et al. Metabolism of ' Syrah'grapevine in the Brazilian semiarid northeast under three irrigation strategies. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, Suppl. 1, p. 3611-3623, 2013.

SCHWEIZER, J. *Hevea* plant material in Besoeki. **De Berg cultures**, Bogor, v. 15, n. 1, p. 598-610, 1941.

SECCO, R. S. A botânica da seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex. Adr. Juss) In: ALVARENGA, A.P.; CARMO, C.A.F.S. (Eds.). *Seringueira*. Viçosa: EPAMIG, 2008. p. 1-24.

SECRETARIA DE AGRICULTURA DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO.
Silvicultura. Disponível em: < <http://www.seag.es.gov.br/silvicultura.htm>>.
Acesso em: 22 out. 2014.

SERPE, M. D. et al. Localization of cell wall polysaccharides in non articulated laticifers of *Asclepias speciosa* Torr. **Protoplasma**, Wien, v. 216, n. 3/4, p. 215-226, 2001.

SETHURAJ, M. R. et al. (Eds.). **Natural rubber: biology, cultivation and technology**. Amsterdam: Elsevier, 2012. 610 p. (Developments in Crop Science 23).

SILPI, U. et al. Carbohydrate reserves as a competing sink: evidence from tapping rubber trees. **Tree Physiology**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 881-889, 2007.

SIMMONDS, N.W. Rubber breeding. In: WEBSTER, C.C.; BAULKWILL, W.J. (Eds.). **Rubber**. London: Longman, 1989. cap.3, p. 85-124

SMEEKENS, S. et al. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. **Current opinion in plant biology**, London, v. 13, n. 3, p. 273-278, 2010.

STURM, A. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant physiology**, Rockville, v. 121, n. 1, p. 1-8, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 820 p.

TANG, C. et al. The sucrose transporter *HbSUT3* plays an active role in sucrose loading to laticifer and rubber productivity in exploited trees of *Hevea brasiliensis* (rubber tree). **Plant, cell & environment**, Malden, v. 33, n. 10, p. 1708-1720, 2010.

TURNER, S. R. et al. Collapsed xylem phenotype of Arabidopsis identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall. **The plant cell**, Portland, v. 9, n. 5, p. 689-701, 1997.

TUNGNGOEN, K. et al. Involvement of *HbPIP2; 1* and *HbTIP1*; 1 aquaporins in ethylene stimulation of latex yield through regulation of water exchanges between inner liber and latex cells in *Hevea brasiliensis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 151, n. 2, p. 843-856, 2009.

TUPY, J; PRIMOT, L. Control of carbohydrate metabolism by ethylene in latex vessels of *Hevea brasiliensis* Muel. Arg. in relation to rubber production.

Biologia Plantarum, Dordrecht, v. 18, n. 1, p. 373-383, 1976.

TUPY, J. Some aspects of sucrose transport and utilization in latex producing bark of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 34, n. 4, p. 51-64, 1985.

TUPY, J.; PRIMOT, L. Sucrose synthetase in the latex of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 988-995, 1982.

TYMOWSKA-LALANNE, Z.; KREIS, M. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. **Advances in Botanical Research**, Cambridge, v. 28, n. 1, p.71-117, 1998.

VARNEY, G. T. et al. Sites of entry of water into the symplast of maize roots. **New phytologist**, Lancaster, v. 125, n. 4, p. 733-741, 1993.

VIRGENS FILHO, A. C.; Organização e exploração do seringal. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DA SERINGUEIRA, 1., 1986, Piracicaba. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1986. p. 271-315.

WEBSTER, C. C.; BAULKWILL, W. J. **Rubber**. New York: Longman Scientific & Technical, 1989. 614 p.

WEBSTER, C.C.; PAARDEKOOOPER, E.C. The botany of the rubber tree. In: WEBSTER, C.C.; BAULKWILL, W.J., eds. **Rubber**. London: Longman, 1989. cap.2, p.57-84.

WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Plant Sciences** United Kingdom, v. 19, n. 1, p. 31-67, 2000.

YANG, H. Y. A preliminary investigation into the relationship between latex invertase and latex vessels plugging in *Hevea brasiliensis*. **Journal of Rubber Research Institute of Malaysia**, Kuala Lumpur, v.32, n.1, p. 50-63, 1984.

YIP, E.; GOMES, J. B. Factors influencing the colloidal stability of fresh clonal *Hevea* latices as determined by the Aerosol OT test. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaysia**, Kuala Lumpur, v. 28, n. 2, p. 86-106, 1980.

ZHU, J; ZHANG, Z. Ethylene stimulation of latex production in *Hevea brasiliensis*. **Plant signaling & behavior**, Paris, v. 4, n. 11, p. 1072-1074, 2009.