

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LARISSA ALEXANDRA CARDOSO MORAES

**Cianogênese e estado nutricional na seleção de clones de copa  
de seringueira resistentes ao mal-das-folhas**

Piracicaba  
2010

**LARISSA ALEXANDRA CARDOSO MORAES**

**Cianogênese e estado nutricional na seleção de clones de copa  
de seringueira resistentes ao mal-das-folhas**

**Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear  
na Agricultura, Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**Área de Concentração: Biologia na Agricultura e  
no Ambiente**

**Orientadora: Prof. Dra. Siu Mui Tsai**

**Piracicaba  
2010**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Moraes, Larissa Alexandra Cardoso

Cianogênense e estado nutricional na seleção de clones de copa de seringueira resistentes ao mal-das-folhas / Larissa Alexandra Cardoso Moraes; orientadora Siu Mui Tsai. - - Piracicaba. 2010.

85p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Cianeto 2. Fungos fitopatogênicos 3. Heveicultura 4. Manganês 5. Nitrogênio 6. Nutrição vegetal I. Título

CDU 633.912.11:562.282

Aos meus filhos Vicente e Pedro e  
ao meu esposo Adônis, pelo absoluto  
e condicional apoio, **DEDICO**.

Aos meus queridos pais Vicente  
e Alexandra, e aos meus irmãos,  
cunhadas, cunhados, sobrinhos  
e sobrinhas, **OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Embrapa Amazônia Ocidental (CPAA) pela oportunidade de realização do Doutorado;

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) pela infraestrutura e excelência do curso de pós-graduação;

Aos orientadores, Professora Dra. Siu Mui Tsai e o Professor Dr. Eurípedes Malavolta (*in memoriam*) pelos ensinamentos e confiança na realização dos trabalhos;

Ao meu pai, Pesquisador Vicente Haroldo de Figueiredo Moraes (*in memoriam*) pela obstinação e exemplo de perseverança na busca da viabilidade do cultivo da seringueira na Amazônia tropical úmida;

Aos grandes colaboradores do CPAA, Sérgio, Concita e Francisco Exigidras, que sem o apoio irrestrito deles, os trabalhos não seriam realizados;

Aos desbravadores da região Norte, os pesquisadores José Clério, Paula, Regina, Gasparotto, Nelcimar, José Roberto e Eurico Pinheiro pelo incentivo e conselhos;

À Lúcia, Darciley, Deise e Glaucia, do DGP/CPAA pela colaboração e acompanhamento do processo de doutorado;

Aos Professores Dr. Victor Alexandre Vitorello, Dr. José Lavres Júnior e Dr. Severino Matias de Alencar pelas sugestões durante a qualificação;

Ao Professor Dr. Cássio Hamilton Abreu Júnior pelo apoio durante o processo de seleção da pós-graduação;

À Cleusa, Neuda, Suzi, João Salvador, Alzira e Cláudia pela ajuda quando solicitada;

Aos colegas Milton, André, Leila, Isabeli, Carol, Reges, Denis, Rafael, Vitor, Vinícius e Márcia pelo apoio, amizade e incentivo;

E aos especiais amigos Adriana, Telma, Fábio e “Juju” por todo caminho percorrido até a realização de mais essa etapa;

À Marília, Raquel, Celso e Renata pela revisão e indispensável colaboração na formatação desta tese;

A **todos** aqueles que, de alguma forma, colaboraram para realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 <i>Aspectos Gerais</i> .....	15
2.2 <i>Utilização da enxertia de copa na heveicultura</i> .....	16
2.3 <i>Enxertia de copa como solução de problema de mal-das-folhas</i> .....	19
2.4 <i>Cianogênese em seringueira</i> .....	20
2.5 <i>Cianogênese e restrição ao escoamento do látex</i> .....	21
2.6 <i>Síntese de glicosídeos cianogênicos e nutrição mineral das plantas</i> .....	24
<b>3 HIPÓTESES</b> .....	26
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	26
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
5.1 <i>Local e condições climáticas</i> .....	27
5.2 <i>Levantamento do potencial cianogênico (HCNp) entre os clones de copa</i> .....	27
5.2.1 <i>Material vegetal</i> .....	28
5.2.2 <i>Determinação do potencial cianogênico (HCNp)</i> .....	29
5.3 <i>Evidências do transporte de glicosídeos cianogênicos de copa para o tronco como fator de variação do HCNp da casca do painel de sangria</i> .....	31
5.3.1 <i>HCNp na casca do tronco a diferentes distâncias do câmbio</i> .....	31
5.3.2 <i>Gradiente longitudinal do HCNp ao longo painel sob copas enxertadas e com copa própria</i> .....	33
5.3.3 <i>Correlação entre o HCNp das folhas dos clones de copa e o HCNp da casca do painel sob essas copas</i> .....	34
5.4 <i>Relação entre a cianogênese e a estabilidade do látex e o secamento do painel de sangria</i> .....	35

5.4.1	<i>Potencial cianogênico (HCNp) e estabilidade do látex.....</i>	35
5.4.2	<i>Comparação semiquantitativa da liberação do HCN da casca de plantas com e sem secamento de painel .....</i>	36
5.4.3	<i>Indução de secamento do painel de sangria com KCN e linamarina .....</i>	40
5.5	<i>Adubação com nitrogênio (N) e manganês (Mn) na formação dos glicosídeos cianogênicos .....</i>	41
5.5.1	<i>Correlação entre o HCNp e o estado nutricional dos clones de copa .....</i>	41
5.5.2	<i>Nitrogênio e manganês no potencial cianogênico (HCNp) em plantas de seringueira.....</i>	41
5.5.2.1	<i>Obtenção de plantas gêmeas de seringueira para o experimento de viveiro em condições de campo .....</i>	41
5.5.2.2	<i>Repicagem para os sacos de plástico a pleno solo.....</i>	42
5.5.2.3	<i>Nitrogênio, manganês e teor de clorofila .....</i>	43
	a) <i>Nitrogênio.....</i>	44
	b) <i>Manganês .....</i>	44
	c) <i>Clorofila .....</i>	44
5.5.2.4	<i>Análise foliar e delineamento estatístico.....</i>	44
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	45
6.1	<i>Levantamento do potencial cianogênico (HCNp) entre os clones de copa .....</i>	45
6.2	<i>HCNp na casca do tronco a diferentes distâncias do câmbio .....</i>	49
6.3	<i>Gradiente longitudinal de HCNp ao longo do caule do painel sob copas enxertadas e com copa própria .....</i>	49
6.4	<i>Correlação entre HCNp das folhas dos clones de copa e o HCNp da casca do painel sob essas copas.....</i>	52
6.5	<i>Potencial cianogênico (HCNp) e estabilidade do látex.....</i>	54
6.6	<i>Comparação semiquantitativa da liberação de HCN da casca do caule de plantas com e sem secamento de painel .....</i>	54
6.7	<i>Indução de secamento do painel de sangria com KCN e linamarina .....</i>	58

6.8 Estado nutricional na cianogênese em plantas de jardim clonal de clones de copa de seringueira.....	63
6.9 Interações entre N, Mn e teor de clorofila com o HCNp nas mudas de seringueira .....	65
6.10 Avaliação do estado nutricional (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn) e teor de clorofila em função das doses de N e Mn em mudas de seringueira (folhas novas e diagnóstico).....	69
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>



## RESUMO

MORAES, L.A.C. **Cianogênese e estado nutricional na seleção de clones de copa de seringueira resistentes ao mal-das-folhas**. 2010. 85f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

O mal-das-folhas, principal doença da seringueira, ainda restrita ao continente americano, tem frustrado todas as tentativas de cultivo da seringueira em regiões com distribuição de chuvas durante todo o ano, tais como a Amazônia tropical úmida. A utilização da técnica de enxertia de copa com clones resistentes é uma solução para contornar este problema, porém, o efeito depressivo das copas enxertadas, ocasionado pela perda da estabilidade do látex tem sido um dos principais obstáculos para a adoção dessa técnica. O papel da cianogênese na perda da estabilidade do látex foi sugerido pelos resultados do estudo da incompatibilidade de enxertia de clones de copa sobre o clone de painel IPA 1 em plantas jovens mantidas em jardim clonal. Verificou-se que a incompatibilidade ocorria devido ao transporte de glicosídeos cianogênicos (linamarina e lotaustralina) sintetizados nos folíolos jovens dos clones de copa enxertados, para o caule do IPA 1, cujos sintomas iniciavam com a perda da estabilidade do látex seguido de sua coagulação nos laticíferos. Tais sintomas evoluíram para necrose do floema, além de acúmulo de polifenóis e taninos, aumento do número de esclerídeo, inclusão de tilosídeos nos vasos laticíferos e depósito intercelular de lignina amorfa de coloração marrom acinzentada, muito semelhante aos descritos para um dos tipos de secamento do painel, denominado “Brown Bast”, cuja causa ainda não está esclarecida. O passo inicial da biossíntese dos dois glicosídeos cianogênicos linamarina e lotaustralina é catalisado por citocromos multifuncionais, enzimas que se encontram ligadas à membrana e são denominadas, genericamente, de citocromos P-450. O aumento da atividade dessa enzima foi observado “in vivo” sob doses de nitrogênio (N), neste caso, acompanhado pelo aumento do conteúdo de glicosídeo cianogênico, e “in vitro” na presença de manganês (Mn). Essas evidências levaram à elaboração das seguintes hipóteses: i) clones de copa capazes de sintetizar grandes quantidades de glicosídeos cianogênicos (HCNp) podem translocá-los para o painel, elevando a concentração destes na casca do tronco, ii) altas concentrações de HCNp na casca do clone de painel, provenientes de copas enxertadas, reduzem a estabilidade do látex, produzindo o efeito depressivo sobre a produção, podendo evoluir para o secamento do painel de sangria do tipo “Brown Bast”. iii) a quantidade de glicosídeos cianogênicos produzidos nas folhas é influenciada pelo teor de N e Mn no tecido vegetal. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar critérios de seleção de clones de copa para a obtenção de combinações copa/painel mais produtivas, com base na avaliação das relações entre a cianogênese, estado nutricional, estabilidade do látex e incidência de secamento do painel de sangria com os seguintes estudos: a) levantamento do potencial cianogênico (HCNp) entre os clones de copa, b) evidências do transporte de glicosídeos cianogênicos da copa para o tronco, como fator de variação do HCNp da casca do painel de sangria, c) relação entre a cianogênese e a estabilidade do látex e o

secamento do painel de sangria, d) efeito da adubação com N e Mn na formação de glicosídeos cianogênicos. Verificou-se que o potencial cianogênico (HCNp) apresenta ampla faixa de variação dentro das espécies estudadas como clones de copa, com os valores mais baixos obtidos com os clones de *Hevea nítida* e os mais altos com os de *H. rigidifolia*. No entanto, a ocorrência de indivíduos de *H. nítida* com valores médios de HCNp e *H. rigidifolia* com valores baixos indicam que essa característica ainda não se encontra bem definida dentro das espécies de *Hevea*. As copas enxertadas exercem influência sobre o potencial cianogênico (HCNp) da casca do tronco dos clones de painel. No entanto, a ausência de correspondência entre os HCNps das folhas dos clones de copa e o da casca do tronco invalida a utilização do HCNp da copa como critério de seleção destas. Futuras pesquisas são necessárias para identificar o mecanismo do efeito das copas enxertadas sobre o HCNp do painel. A atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase não foi influenciada pelas combinações copa/painel, estando a capacidade cianogênica (HCNc) diretamente relacionada ao HCNp das cascas das plantas. Os teores foliares de N, Mn e clorofila apresentam correlação com o HCNp das folhas novas e diagnóstico, podendo os mesmos serem utilizados em futuros processos de seleção. Em baixas concentrações de N (0,8% de uréia), o Mn influencia a absorção de nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio, enxofre, ferro e manganês pelas plantas de seringueira, na fase de viveiro.

Palavras-chave: cianeto, fungo fitopatogênico, *Hevea* spp., heveicultura, manganês, nitrogênio, nutrição vegetal

## ABSTRACT

MORAES, L.A.C. **Cyanogenesis and nutritional status in selection of rubber tree crown clones resistant to South American leaf blight**. 2010. 85f. Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

The South American leaf blight (SALB), main disease of the rubber tree, which is still restricted to the American continent, has frustrated all the attempts of cultivation of the rubber tree in regions with rainfall distributed throughout the year, such as the humid tropical Amazon. The use of crown grafting with clones resistant to the disease is one possible solution to obviate this problem. However, the depressant effect of the grafted crowns caused by the loss of latex stability is one of the main obstacles to this technique. The role of cyanogenesis in the loss of latex stability was suggested in view of the findings of the study of incompatibility of crown clone grafting and the IPA 1 panel clone in young plants kept in the clonal nursery. This incompatibility occurred due to the transport of cyanogenic glycosides (linamarin and lotaustralin) synthesized in the young follicles of the grafted crown clones to the stem of IPA 1, which first symptoms were the loss of latex stability followed by coagulation within the lactiferous ducts. Such symptoms evolved to phloem necrosis, including the accumulation of polyphenols and tannins, increased number of sclereids, inclusion of tyloses in the lactiferous ducts and intracellular deposit of amorphous lignin of a greyish-brown color very similar to the one described in one of the types of panel dryness called "Brown Bast", which cause has not yet been clarified. The first step of biosynthesis of the two cyanogenic glycosides linamarin and lotaustralin is catalyzed by multifunctional cytochromes, enzymes connected with the membrane generically called P-450 cytochromes. The increased activity of the referred enzyme was observed "in vivo" when nitrogen (N) rates were applied, in this case, followed by increased cyanogenic glycoside content, and "in vitro" in the presence of manganese (Mn). Such evidence led to the creation of the following hypotheses: i) crown clones capable of synthesizing large amounts of cyanogenic glycosides (HCNp) may transport them to the panel, thus increasing their concentration in the bark of the tree trunk, ii) high concentrations of HCNp in the bark of the panel clone, from the grafted crowns, reduce latex stability, producing a depressant effect on the production that may evolve to panel dryness similar to the "Brown Bast" disease. iii) the amount of cyanogenic glycosides produced in the leaves is influenced by the N and Mn concentrations in the vegetable tissue. In this context, the present study aimed to determining criteria for the selection of tree crown clones to obtain more productive crown/panel arrangements, based on the assessment of the relationships between cyanogenesis, nutritional status, latex stability and incidence of dryness in the panel, through the following studies: a) assessment of cyanogenic potential (HCNp) of the crown clones, b) evidence of transport of cyanogenic glycosides from the crown to the tree trunk as a determining factor in the variation of HCNp level in the panel bark c)

relationship between cyanogenesis and latex stability and the dryness of the panel, d) N and Mn fertilization effects on cyanogenic glycosides formation. The cyanogenic potential (HCNp) was found to have a broad range of variation among the studied species as crown clones, with the lowest values obtained with *Hevea nítida* clones and the highest values obtained with *H. rigidifolia*. However, the occurrence of *H. nítida* individuals with average HCNp values and *H. rigidifolia* individuals with low values indicate that this characteristic is not well defined within *Hevea* species. The grafted crowns influence the cyanogenic potential (HCNp) of the bark of the tree trunk of the panel clones. Yet, the lack of correspondence between the HCNps of the trees of the crown clones and that of the bark of the trunk invalidate the use of the crown HCNp as a selection criterion. Further research is necessary to identify the mechanism of the effect of grafted crowns on the panel HCNp. The activity of the  $\beta$ -glicosidase enzyme was not influenced by the crown/panel arrangements, with the cyanogenic capacity (HCNc) found to be directly related to the HCNp of the barks of the trees. In rubber tree, regardless the age and species of *Hevea*, the foliar chlorophyll, N and Mn concentrations have a positive relationship to the HCNp of the young leaves and diagnosis, so they can be used in future selection processes. Under low N contents (0.8% of urea), the Mn influences the nitrogen, potassium, phosphorus, calcium, sulphur, iron and manganese uptake by rubber tree plants at nursery stage.

Keywords: cyanide, phytopathogenic fungi, *Hevea* spp., rubber plantation, manganese, nitrogen, vegetable nutrition

## 1 INTRODUÇÃO

Em 1918, um seringal foi abandonado no Suriname devido a um surto epidêmico grave de uma doença até então desconhecida, causando a perda total das folhas novas e, eventualmente, morte das plantas. Pesquisadores holandeses verificaram que o problema havia sido causado por um fungo, o qual foi denominado de *Dothidella ulei* e a enfermidade de “mal sul americano das folhas” (South American Leaf Blight – SALB). Ocorrência idêntica da doença também foi verificada na Guiana Inglesa, fazendo com que aumentasse o incentivo para produção em novas áreas de plantio, como o Sudeste Asiático.

No Brasil, desconsiderando os antecedentes, Henry Ford decidiu implantar um grande seringal às margens do rio Tapajós para escapar do monopólio inglês. Não demorou muito e foram observados ataques severos de “mal-das-folhas”, cujo agente etiológico passou a se chamar *Microcyclus ulei*. Após anos de insistência, H. Ford desistiu dos plantios e transferiu seu acesso para o Ministério da Agricultura do Brasil, ficando a continuidade das pesquisas a cargo do antigo IAN (Instituto Agrônomo do Norte), dando início aos primeiros trabalhos de enxertia de copa para o controle da doença.

Após inúmeros problemas, atualmente a enxertia de copa com clones resistentes apresenta-se como principal alternativa para a remoção do já secular impedimento do mal-das-folhas à heveicultura na Amazônia sempre úmida, dada a inviabilidade do controle químico em seringais adultos e a “quebra” da resistência dos clones produtivos com copa própria ou híbridos de *Hevea brasiliensis*.

As plantas formadas com a técnica da enxertia de copa apresentam genótipos tri-compostos, pois, inicialmente, gemas de clones de alta produção são enxertadas sobre porta-enxertos de sementes ilegítimas comuns ou selecionadas, formando plantas bi-compostas que, posteriormente, são levadas ao campo, onde se desenvolvem próximos de três metros de altura (MORAES, 1995), quando são novamente enxertadas com gemas de clones resistentes. Esta segunda enxertia feita entre a copa e o painel, dá-se o nome de enxertia de copa (BAHIA; SENA-GOMES, 1981).

Além da viabilidade de plantio em áreas epidêmicas com grande quantidade de inóculo, essa técnica pode representar ainda uma tecnologia de reserva, se o *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx ultrapassar a barreira climática existente nas “áreas de

escape”, ou ainda, em um contexto mais global, caso ocorra a introdução do patógeno no Sudeste da Ásia, principalmente, na Malásia e Indonésia, principais países produtores mundiais de borracha natural (IRSG, 2007).

As pesquisas realizadas e em andamento na Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus - Amazonas), tem como objetivos o aumento do pegamento de enxertia das copas, incremento da produtividade de borracha e a redução do período de imaturidade de novas combinações copa e painel, pela obtenção de clones de copa que não causem redução da produção do clone de painel e promova rápido crescimento do tronco, o que tornaria possível elevar o potencial atual de produção de 1.500 kg/ha/ano para 2.000 kg/ha/ano, reduzindo o prazo de retorno do capital investido.

Constatou-se anteriormente, que o efeito depressivo da produção das copas enxertadas foi devido à perda de estabilidade do látex, que pode ser causado pela liberação de cianeto com o traumatismo da sangria, devido ao contato entre a enzima  $\beta$ -glicosidase e o glicosídeo cianogênico contido nos vacúolos (MORAES; MORAES; CASTRO, 2001; MORAES; MORAES; MOREIRA, 2002). O teste dessa hipótese poderia conduzir à adoção da baixa capacidade cianogênica como critério de seleção de clones de copa.

O estudo do envolvimento do estado nutricional na formação do glicosídeo cianogênico (composto nitrogenado – TAIZ; ZEIGER, 2004) nas plantas de seringueira, a exemplo do que ocorreu com o *Sorghum bicolor* L. Moench (BUSK; MÖLLER, 2002) e com o *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell (GLEADOW; WOODROW, 2000), também acrescentará informações no aprimoramento do critério seleção, através de uma curva de calibração dos nutrientes, o que pode aumentar significativamente o sucesso do melhoramento de clones de copa visando maior produtividade e pegamento de enxertia.

Embora a heveicultura tenha migrado para a região Centro-Sul do país, a obtenção de produtividades competitivas na Amazônia tropical úmida, poderá vir a atrair empresários, visando o uso da cultura, também como espécie de reposição florestal e crédito de carbono. No curto e médio período de tempo, o público será representado pelos seringueiros e extrativistas remanescentes, principalmente, dos Estados do Acre, Pará e Amazonas, com população estimada de 42 mil famílias. Os governos desses Estados vêm implementando um programa de reativação de produção de borracha extrativa. Ocorre que a produtividade e os custos de produção do extrativismo da borracha, mesmo com o apoio das Reservas Extrativistas, não têm propiciado a

melhoria desejável do padrão de vida dos seringueiros (HOMMA, 1992; BROWN; ROSENDO, 2000).

Enquanto nos seringais nativos a média de produção varia em função da sua densidade na floresta (SCHROTH; MORAES; MOTA, 2004), acarretando, muitas vezes, em grande dispêndio de tempo em caminhadas nas trilhas para sangrar ou coletar o látex de todas as plantas sobre sua responsabilidade, em áreas de cultivo, devido o aumento da concentração de plantas por área, o rendimento do seringueiro é significativamente aumentado, além da melhor qualidade do látex.

É oportuno registrar que a borracha é um dos poucos produtos dotados de capilaridade suficiente para adaptar-se à produção em áreas remotas da Amazônia, como o demonstraram as fases do “rubber boom”, da “batalha da borracha” e dos incentivos do PROBOR, quando os picos de produção anual chegaram a atingir 40.000 toneladas. Quanto à sustentabilidade ecológica, um seringal adulto tem biomassa e produtividade primária equivalentes a 70% das da floresta primária, o que representa elevado seqüestro de carbono, adequando-se às exigências do Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL) estabelecidas no Protocolo de Quioto. Além disso, a reconstituição da fração orgânica do solo (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina) atinge após anos de introdução, o mesmo nível ou um pouco abaixo que o encontrado sob floresta primária, onde a matéria orgânica e seus componentes estão em equilíbrio dinâmico (SHORROCKS, 1965a; BI; OMONT, 1987; MONTENEY, 1989; MORAES; MOREIRA, 2003; MOREIRA; MORAES; FAGERIA, 2009).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Hevea* possui um amplo grau de dispersão na região, estando presente em praticamente toda Amazônia Legal (MORAES, 1977). Das onze espécies do gênero atualmente encontradas, a *Hevea brasiliensis* foi a que apresentou a maior capacidade produtiva e representa 99% da borracha natural produzida no Mundo, aliada à melhor qualidade do látex (GOLDTHORPE; TAN, 1996).

A borracha obtida em seringal nativo tornou-se extremamente valiosa na última parte do século 19 e início do século 20, causando um aumento significativo na exploração da borracha na Amazônia, fato esse, denominado de “Rubber Boom”. Depois de 1912, este ciclo entrou em declínio com a entrada no mercado de borracha proveniente de plantios comerciais localizados na Ásia Oriental, em especial, na Malásia e na Indonésia (WEINSTEIN, 1983; GASPAROTTO et al., 1997).

Em escala Mundial, o cultivo da seringueira abrange uma área de cerca de 10 milhões de hectares, do qual, 92% estão localizados no sudeste da Ásia (7,2 milhões toneladas, representando 78% da produção mundial). Nesta região, o cultivo da seringueira é uma das principais fontes de apoio para 20 milhões de produtores rurais, na maioria dos casos, pequenos agricultores com 0,5 a 3,0 hectares, o que corresponde a, aproximadamente, 85% da área cultivada na região (IRSG, 1999). Entre os fatores para essa expansão bem sucedida na região destaca-se a ausência do “mal das folhas”, causada pelo fungo *Microcyclus ulei*.

A pequena demanda de nutrientes e o baixo consumo de combustível fóssil para a produção de borracha natural (MORAES; MOREIRA, 2003; MOREIRA; MORAES; FAGERIA, 2009) tornam, também, o cultivo da seringueira ecologicamente compensador. Enquanto é necessário de 108 a 174 GJ para produzir uma tonelada de borracha sintética (produto finito), a produção da mesma quantidade de borracha natural é apenas 13 GJ (IRRDB, 1998). Cada tonelada de borracha natural produzida representa uma redução de 4,8 toneladas de carbono para a atmosfera. Isso, somado ao C total fixado pela parte aérea e raízes pode corresponder a 1.019 t ha<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>, como verificado por Shorrocks (1965a), em seringal de *H. brasiliensis*, com 33 anos de idade.

Produtos como preservativos, luvas cirúrgicas e pneus de avião só podem ser feitos com borracha natural (MOREIRA; MORAES; FAGERIA, 2009). Com o aumento do consumo mundial e da crescente necessidade dos países asiáticos, particularmente, da



China e da Índia, a demanda tende a ultrapassar a oferta de borracha sintética e natural. Mesmo sendo o principal centro de origem, o Brasil atualmente participa com apenas 1,1% da produção mundial de borracha natural e 2,9% de borracha sintética (Tabela 1), enquanto o consumo foi de 4,0% e 3,0%, respectivamente (IRSG, 2008).

**Tabela 1** – Produção e consumo mundial e brasileiro de borracha natural e sintética (IRSG 2008), em milhões de toneladas.

<b>Borracha natural</b>	<b>2007</b>		<b>2008</b>	
	<b>Mundo</b>	<b>Brasil</b>	<b>Mundo</b>	<b>Brasil</b>
Produção (milhões t <sup>-1</sup> )	9.707	105	9.876	110
Participação do Brasil (%)		1,1		1,1
Consumo (milhões t <sup>-1</sup> )	9.884	395	9.726	310
Participação do Brasil (%)		4,0		3,2
<b>Borracha sintética</b>				
Produção (milhões t <sup>-1</sup> )	13.442	385	12.879	445
Participação do Brasil (%)		2,9		3,5
Consumo (milhões t <sup>-1</sup> )	13.161	395	12.573	400
Participação do Brasil (%)		3,0		3,2

## 2.1 Aspectos gerais

Na Região Amazônica, a seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell.-Arg.) encontra condições climáticas favoráveis ao seu crescimento e à produção de látex durante o ano inteiro (MORAES, 1977). Porém, tais condições são também propícias a surtos epidêmicos severos do mal-das-folhas, enfermidade causada pelo fungo *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v. Arx, e considerada uma das dez doenças mais destrutivas das plantas. Tal fato tem frustrado desde o início do século passado, as tentativas do estabelecimento da heveicultura na região em plantio comercial, apesar dos esforços da pesquisa em termos de melhoramento genético e controle químico da doença (MORAES, 1997).

Após o fracasso de cultivos na região Amazônica, a heveicultura expandiu-se no Brasil nas "áreas de escape" do Centro Oeste, Sudeste e na parte sul dos estados do Pará e Maranhão, onde ocorrem pelo menos dois meses consecutivos com umidade relativa média do ar inferior a 60%, impedindo os surtos epidêmicos na fase de re-entolhamento anual. Tais vantagens acarretam em ônus, como o atraso do crescimento

e redução acentuada da produção na fase de deficiência hídrica no sul da Amazônia, ou por insuficiência térmica e hídrica no Planalto Paulista (região Sudeste), além da ocorrência crescente do ataque de ácaros e do percevejo-de-renda (*Leptopharsea hevea*).

Nas plantas desfolhadas por ácaros ou pelo percevejo-de-renda, as emissões foliares durante o período chuvoso podem ocasionar em quebra da resistência e infestação do *M. ulei*. Esta assertiva pode ser um problema grave no futuro, haja vista, que Gasparotto e Junqueira (1994) encontraram isolados capazes de esporular com apenas três horas de orvalho nas folhas ou a 16°C, podendo adaptar-se às condições encontradas nas “áreas de escape”, neste caso, a enxertia de copa pode representar uma tecnologia de reserva, caso o *M. ulei* ultrapasse a barreira climática existente nessas áreas, ou ainda, em um contexto mais global, se ocorrer a introdução dessa enfermidade no Sudeste da Ásia, atualmente a região maior produtora de borracha natural (MORAES, 1997).

Fora dessas áreas, a enxertia de copa com clones resistentes apresenta-se como uma solução disponível para a heveicultura na região tropical úmida (sul da Bahia, norte do Espírito Santo, região Amazônica e sul do Estado de São Paulo – vale do Ribeira), mesmo que estes locais não apresentem a incidência da doença (MORAES, 1997).

## **2.2 Utilização da enxertia de copa na heveicultura**

A enxertia de copa é utilizada na Malásia e na Índia no cultivo de seringueira para a solução de problemas menos graves que o mal-das-folhas, tais como suscetibilidade à quebra das copas pelo vento e outras enfermidades das folhas (TAN; LEONG, 1977; RRII, 1987). Nesses países, os clones utilizados como copas enxertadas são de *H. brasiliensis*, sendo registrados, inclusive, aumentos de produtividade com o uso de copas enxertadas (YOON, 1973). A produção de borracha do Equador é proveniente de doze mil hectares de seringais com copas enxertadas de clones de *H. brasiliensis* resistentes às raças locais de *M. ulei*, os quais foram dizimados por outras raças do fungo em cultivos localizados em outras regiões da Amazônia.

Para viabilizar o cultivo comercial na Amazônia brasileira, vários estudos foram anteriormente realizados, mas com resultados pouco animadores: o melhoramento genético visando a obtenção de clones resistentes e produtivos foi ineficaz, por causa da constante quebra da resistência ocasionada pela grande variabilidade e mutabilidade do *M. ulei* (SOUSA; MORAES, 2001). A substituição das copas susceptíveis por clones

de copa resistentes, testados desde 1942, em trabalhos iniciados nas antigas plantações da Ford (Fordlândia) (PINHEIRO et al., 1989), com clones de *H. pauciflora* e de *H. benthamiana* com baixo índice de pegamento, na época, e menor produtividade de borracha seca. Testes em plantios no sul da Bahia, com vários híbridos de copas enxertadas de *H. brasiliensis* x *H. benthamiana*, tiveram a resistência quebrada (DUNHAM; SILVA; SANTOS, 1982; MAIA, 1982).

Novas tentativas foram realizadas, como a recuperação de plantios jovens de *H. brasiliensis* na Amazônia pela enxertia de copa com clones selecionados de *H. pauciflora*, de resistência estável (SOUZA; LION, 1989). O insucesso, neste caso, se deu não pela infestação do fungo *M. ulei*, mas em razão dos baixos índices de pegamento das enxertias, com exceção de um bloco com 180 hectares da plantação da Pirelli Pneus S/A, em Ananindeua, Estado do Pará, com copa de PA 31 (SOUZA; LION, 1989).

Além dos problemas de pegamento de enxertia, fatores, como os efeitos depressivos freqüentemente verificados na produtividade de borracha seca, aliado ao aumento do custo adicional ocasionado pela adoção da técnica da enxertia, também foram fortes argumentos, na época, contra o uso de clones de copa resistentes ao mal-das-folhas (OSTENDORF, 1948; LASSCHNIT; VOLEMA, 1959; LANGFORD, 1957; RADJINO, 1969; BAHIA; SENA-GOMES, 1981). Contudo, continuaram os estudos da viabilidade dessa prática de manejo (MORAES, 1995; 1998; MORAES; MORAES, 2008).

Moraes (1998) relata que o pegamento da enxertia foi satisfatório com o uso de híbridos *H. pauciflora* x *H. brasiliensis*, mas em plantas adultas, houve a incidência severa de danos causados pelo percevejo-de-renda (*Leptopharsa heveae*) e de doenças, como a queima-do-fio (*Kolleroga noxius*) e a rubelose (*Corticium salmonicolor*), bem como, a redução do nível de resistência ao mal-das-folhas. Retrocruzamentos para *H. brasiliensis*, de híbrido *H. brasiliensis* x *H. benthamiana* (copas enxertadas de IAN 6158) foram dizimados por nova estirpe virulenta de *M. ulei* (GASPAROTTO et al., 1992), embora tenham anteriormente apresentado resistência parcial a 36 diferentes isolados, o que as havia caracterizado como dotadas de resistência do tipo horizontal.

Tais observações demonstraram a necessidade de se estabelecer novo enfoque na linha de melhoramento genético, especificamente para clones de copa, sob a premissa de que o uso dessa técnica não pode ficar limitado ao emprego dos clones

primários de *H. pauciflora*, ou de híbridos que visem à obtenção de clones resistentes e produtivos.

Após as tentativas com pouco sucesso sobre a seleção de copas de *H. Pauciflora*, uma nova linha de pesquisa foi iniciada, com novos cruzamentos, para obtenção de clones de copa de resistência estável ao *M. ulei*, com alta aptidão ao pegamento da enxertia e efeito depressivo na produtividade reduzido ou nulo (SOUSA; MORAES, 2001; MORAES; MORAES, 2008). Nessa nova linha, foram escolhidos, para hibridação com *H. pauciflora*, clones de *H. guianensis* var. *marginata* e *H. rigidifolia* (MORAES; MORAES, 2008), ambos com mesmo grau de resistência estável ao mal-das-folhas, e que apresentaram bom pegamento da enxertia e crescimento vigoroso (Figura 1).



**Figura 1** – Clones de copa de várias espécies de *Hevea* spp. enxertados sobre clones de painel produtivo (CNS AM 7905 - *Hevea brasiliensis*), apresentando excelente pegamento de enxertia de copa, resistência horizontal ao *Microcyclus ulei* e alto potencial de produtividade (MORAES; MORAES, 2008).

Atualmente, apenas o CIRAD mantém um programa de melhoramento para resistência ao mal-das-folhas, sem ter logrado sucesso e com evidências negativas do estudo dos *loci* de caracteres quantitativos (QTLs) relacionados à resistência (LESPINASE; GRIVET; TROIPONX, 2000). Por outro lado, dada a variabilidade do patógeno e o caráter poligênico da resistência (JUNQUEIRA; CHAVES; ZAMBOLIM, 1986; GASPAROTTO; JUNQUEIRA, 1994), é muito baixa a probabilidade de sucesso da obtenção de transgênicos de alta produtividade e resistência estável. A resistência de *H. pauciflora* e de *H. rigidifolia* foram documentadas desde a época das plantações da Ford no Estado do Pará e de *H. guianensis* var. *marginata*, há mais de 20 anos, em Manaus, sob alta pressão de inóculo de alta variabilidade.

### **2.3 Enxertia de copa como solução do problema do mal-das-folhas**

A pesquisa com enxertia de copa realizada na Embrapa Amazônia Ocidental (CPAA-Manaus) concentrou-se, inicialmente, na elucidação do mecanismo do efeito depressivo das copas enxertadas sobre a produção. Constatou-se que a principal alteração foi a redução da estabilidade do látex, causando forte restrição do escoamento, removida em grande parte pela estimulação com “ethefon” (ácido 2-cloroetilfosfônico) antes da sangria (MORAES; MORAES, 1995). A redução da estabilidade do látex foi devida, principalmente, à ruptura dos lutóides, partículas encontradas na fração de fundo do látex centrifugado (MOIR, 1959), cujo conteúdo pode causar gelificação, seguida de floculação ou formação de micro-coágulos (GOMEZ; YIP, 1975; GOMEZ, 1983; D’AUZAC, 1989).

Foram realizadas hibridações entre clones selecionados de *H. pauciflora* x *H. rigidifolia* e *H. pauciflora* x *H. guianensis* var. *marginata*, visando à redução do volume da copa, aumento do pegamento da enxertia e redução do efeito depressivo da produção de borracha (MORAES, 2000; MORAES; MORAES; MOREIRA, 2008; MORAES; MORAES, 2008).

No teste precoce de duração do escoamento do látex em plantas de um ano e na sangria precoce aos três anos e meio, constatou-se a superioridade dos híbridos interespecíficos quanto ao efeito sobre o escoamento e quanto à produção de borracha e incremento do caule (MORAES, 2000), confirmada em experimento de avaliação de copas com incrementos em perímetro do caule superiores em 30% a 60% aos incrementos sob copa de *H. pauciflora* (MORAES; MORAES, 2008).

Esse maior incremento do caule sob as copas de *H. pauciflora* x *H. guianensis* var. *marginata*, deve ser atribuído à maior capacidade fotossintética, em função da maior condutância estomática, uma vez que o maior crescimento do tronco corresponde a copas com estômatos maiores e de densidade média, que deve corresponder à maior condutividade estomática (SAMSUDDIN, 1980), identificada em vários clones de seringueira como determinante da taxa fotossintética (SAMSUDDIN; IMPENS, 1978).

A conexão entre a cianogênese e o efeito depressivo da produção por copas enxertadas foi encontrada no estudo de incompatibilidade de enxertia sobre o clone de painel IPA 1 (MORAES et al., 2001), o qual demonstrou ser devida ao transporte da linamarina (glicosídeo cianogênico) da copa para o caule.

## 2.4 Cianogênese em seringueira

As espécies de *Hevea* pertencem ao grande grupo de mais de 3.000 espécies que são cianogênicas e tem os mesmos glicosídeos cianogênicos da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), denominados de linamarina, encontrada em grande quantidade, e de lotaustralina, presente em menor quantidade, não ultrapassando 3% do conteúdo total de glicosídeos cianogênicos (SELMAR, 1986; LIEBEREI, 2007). Esses glicosídeos são armazenados nos vacúolos das células e, ao sofrerem injúria mecânica, são postos em contato com a linamarase, uma  $\beta$ -glicosidase não específica encontrada no apoplasto, que quebra a linamarina em glicose e acetocianohidrina que, por sua vez, é quebrada em HCN e carbonila pela atividade da  $\alpha$ -hidroxinitrilase (SELMAR, 1986; LIEBEREI, 2007). O HCN livre pode se difundir rapidamente através do tecido vegetal ou pode se ligar às carbonilas ou iminas, retardando sua liberação (LIEBEREI, 1988).

A desintoxicação pode ocorrer por fixação através da enzima  $\beta$ -cianoalanina sintase ( $\beta$ -CAS), que catalisa a reação entre o HCN e a cisteína para formar  $\beta$ -cianoalanina e sulfeto de hidrogênio –  $H_2S$  (FLOSS; HADWIGER; CONN, 1965; BLUMENTHAL et al., 1968; CASTRIC; FARNDEN; CONN, 1972). O produto  $\beta$ -cianoalanina pode ser metabolizado para asparagina, pela ação da  $\beta$ -cianoalanina hidrolase, podendo ser incorporada no metabolismo geral da planta (MILLER; CONN, 1980).

Em espécies não cianogênicas, como soja e citros, a presença da  $\beta$ -cianoalanina sintase está relacionada com o mecanismo de desintoxicação na síntese endógena de etileno, onde há formação de HCN na fase em que o ácido carboxílico

aminociclopropano (ACC) é transformado em etileno (PEISER et al., 1984; GUDEY; TITLLE; SPENCER, 1989).

Miller e Conn (1980) estudaram o metabolismo do HCN em várias espécies de plantas superiores, pertencentes a gêneros diversos, incluindo espécies cianogênicas e não cianogênicas. Esses autores encontraram uma tendência geral de relação direta entre a atividade da enzima e o potencial cianogênico das plantas.

Em *Hevea* spp., entretanto, Umbach (1989) encontrou grande variação de atividade de  $\beta$ -CAS, expressa em relação ao peso das folhas nos oito clones estudados, sem proporcionalidade com o potencial cianogênico (HCNp). Por exemplo, em *H. nitida* a atividade de  $\beta$ -CAS em folhas do estágio B<sub>1</sub> foi de 2,4 nmol de H<sub>2</sub>S g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, enquanto no clone RRIM 600, com HCNp muito mais alto, a atividade em folhas no mesmo estágio foi de apenas 0,5 nmol de H<sub>2</sub>S g<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>. Foi, entretanto, encontrada proporcionalidade entre  $\beta$ -CAS e HCNp, quando comparados os valores em folhas, caule e raízes de um mesmo clone, com níveis mais baixos de  $\beta$ -CAS e HCNp no caule e ausência de  $\beta$ -CAS nas raízes, correspondendo a um HCNp muito baixo.

Grandes quantidades de linamarina são armazenadas nos vacúolos de folíolos jovens de seringueira, sendo a possibilidade de seu transporte para outras partes da planta demonstrada por Selmar (1993), em plântulas de *Hevea*. Nesse modelo, a linamarina armazenada no endosperma da semente desempenha o papel de composto armazenador de nitrogênio (N), e é transportada para os cotilédones em desenvolvimento com o acréscimo de outra unidade de glicose à molécula da linamarina, transformando-a em linustatina, que não sofre a ação hidrolítica da linamarase. A hidrólise da linustatina é promovida por uma diglicosidase, não detectada no apoplasma, sem reconversão para linamarina (GRUHNERT; BIEHL; SELMAR, 1994).

## **2.5 Cianogênese e restrição ao escoamento do látex**

Nos estudos de incompatibilidade de enxertia com o clone IPA 1, o primeiro sintoma observado é a instabilidade do látex, restringindo o escoamento, seguido de coagulação nos laticíferos e aparecimento de faixas de necrose na casca, em enxertos de copa com três a quatro lançamentos. A coalescência das necroses leva ao anelamento da casca do caule do IPA 1 (MORAES; MORAES; CASTRO, 2001), resultando no murchamento e morte da copa enxertada (Figura 2).

Essa evolução de sintomas, que incluem acúmulo de polifenóis e taninos, aumento do número de esclereídeos, inclusão de tilosóides nos vasos laticíferos e depósito intercelular de lignina amorfa de coloração marrom acinzentada (MORAES; MORAES; CASTRO, 2001), é muito semelhante à descrita para um dos tipos de secamento de painel, denominado como “Brown Bast” (COMPAGNON; TIXIER; ROUJANSKI, 1953; FAÿ; HEBANT, 1980; FAÿ, 1988), cuja causa ainda não foi elucidada, e provocou prejuízo, na época, de 900 milhões de dólares à heveicultura mundial (IRRDB, 1999).

Como evidências adicionais, devem ser citadas a maior incidência do secamento do painel durante o novo enfolhamento, quando o HCNp é mais alto (PARAJONTHY; GOMEZ; YEANG, 1975) e a obtenção de sintomas similares aos descritos para o “Brown Bast” através da indução de secamento por retenção do cianeto na casca em puncturas fechadas (MORAES; MORAES, 2003).



**Figura 2** – Clone de copa CPAA C 13 aos seis meses após enxertia, apresentando folhas secas e quebradiças. Detalhe do caule do IPA 1, abaixo do ponto de enxertia, apresentando necrose em ampla extensão (MORAES, 2000).



A aplicação de solução de cianeto de potássio (KCN) ou de linamarina induziram os mesmos sintomas de incompatibilidade das copas enxertadas no IPA 1, porém, em prazo mais curto. A concentração mais alta de KCN ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ), sem efeito sobre a exsudação do látex do clone Fx 3864, foi 625 vezes maior que a concentração mais baixa ( $0,032 \text{ mg L}^{-1}$ ), que, no caule do IPA 1 interrompeu o escoamento do látex (MORAES; MORAES; CASTRO, 2001).

A atividade da  $\beta$ -cianoalanina sintase, que promove a reação inicial de síntese da asparagina, com utilização do cianeto liberado, é extremamente alta na casca do caule do Fx 3864, mas apenas do mesmo nível de espécies não cianogênicas no IPA 1, o que é suficiente apenas para a desintoxicação das pequenas quantidades de cianeto liberadas na síntese de etileno (PEISER, 1984).

O clone IAN 6158, de *H. brasiliensis*, e os clones de *H. nitida* CPAA C 64 e 65 são compatíveis com o IPA 1 e, particularmente os clones de *H. nitida*, têm HCNp muito baixo nos folíolos jovens, fato já evidenciado nessa espécie por Lieberei (1986), em estudos que relacionavam a resistência ao fungo *M. ulei* e o HCNp, concluindo que a capacidade de liberação de HCN está diretamente associada à susceptibilidade ao ataque do *M. ulei*, pois a germinação dos seus esporos é favorecida por altos níveis de cianeto que, por sua vez, inibem a síntese de fitoalexinas, particularmente da escopoletina, tóxica a esse patógeno.

O IPA 1 tem também HCNp alto nos folíolos jovens, mas, ao contrário dos clones incompatíveis (CPAA C 13, CPAA C 14 – *H. pauciflora* x *H. guianensis* var. *marginata* e CPAA C 06 – *H. pauciflora*), o HCNp continua alto nos folíolos maduros, o que indica ausência de transporte dos glicosídeos das folhas para o caule (MORAES; MORAES; CASTRO, 2001).

Em outros clones compatíveis, como o Fx 985 (*H. brasiliensis*), esse transporte também não ocorre. Por outro lado, os clones de copa de potencial cianogênico (HCNp) mais altos, identificados nesse estudo, são os que têm causado, sobre vários painéis, maior instabilidade do látex e maior incidência de secamento do painel de sangria (MORAES; MORAES; MOREIRA, 2002).

## 2.6 Síntese dos glicosídeos cianogênicos e nutrição mineral das plantas

Estudos recentes relatam que a reação de conversão dos aminoácidos L-valina e L-isoleucina em aglicona, passo inicial da biossíntese dos dois glicosídeos cianogênicos da mandioca, linamarina e lotaustralina, é catalisada por citocromos multifuncionais, enzimas que se encontram ligadas à membrana e são denominadas de citocromos P-450 (NIELSEN; MÖLLER, 1999; ANDERSEN et al., 2000). Em seguida, ocorre a conversão da aglicona a glicosídeo cianogênico pela ação da uridina 5'-difosfoglicose-glucosil transferase.

Processos semelhantes também ocorreram em *Sorghum bicolor* L. (Moench), com o envolvimento dos citocromos P-450 na formação do glicosídeo cianogênico durrina a partir do aminoácido L-tirosina (SIBBESEN et al., 1995; BUSK; MÖLLER, 2002). Busk e Möller (2002) estudaram o efeito da adubação na síntese da durrina bem como na atividade dos citocromos P-450 em mudas de sorgo. Segundo esses autores, a formação de aglicona a partir de L-tirosina catalisada pela ação dos citocromos P-450 é o fator limitante nesse processo.

A influência do estado nutricional no acúmulo de glicosídeo cianogênico foi também observada por Gleadow e Woodrow (2000), em plantas com seis anos de idade de *Eucalyptus cladocalyx* F. Muell., ao verificarem que a quantidade de glicosídeo cianogênico nas folhas jovens é diretamente proporcional ao teor de N na planta, exceto durante o verão, por esse período coincidir com o pico de floração para essa espécie, ocorrendo uma mobilização do glicosídeo cianogênico para prover N extra para a reprodução.

Na seringueira não há registros de estudos relacionando o potencial cianogênico e o estado nutricional das plantas. No caso das copas enxertadas, trabalhos isolados realizados por Moraes e Moraes (1997 e 2008), sobre o efeito dessa técnica de enxertia na absorção de nutrientes mostraram alta exigência de clones provenientes das combinações de *H. brasiliensis* e *H. pauciflora* na absorção de magnésio (Mg), cuja deficiência limita a biossíntese da borracha nos laticíferos.

É importante ressaltar, que o Mg, potássio (K), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) atuam também, como ativadores enzimáticos e co-fatores de reações enzimáticas, podendo os mesmos, na carência ou excesso, interferir diretamente no metabolismo das plantas (MARSCHNER, 1995; MALAVOLTA, 2006; FAGERIA, 2009).

A compreensão da influência das condições de crescimento das plantas na formação do glicosídeo cianogênico aliada ao potencial genético permitirá maior confiabilidade à adoção da baixa capacidade cianogênica como critério de seleção de clones de copa, conduzindo à proposta de obtenção de híbridos interespecíficos de baixo potencial cianogênico que deverão favorecer o escoamento do látex, agregando em um mesmo indivíduo, pela enxertia de copa, uma alta produtividade de látex e resistência ao mal-das-folhas.

### **3 HIPÓTESES**

**3.1** Clones de copa capazes de sintetizar grandes quantidades de glicosídeos cianogênicos podem transportá-los para o painel, elevando a concentração destes na casca do tronco.

**3.2** Altas concentrações de glicosídeos cianogênicos na casca do clone de painel, provenientes de copas enxertadas, reduzem a estabilidade do látex, produzindo o efeito depressivo sobre a produção, podendo evoluir para o secamento do painel de sangria do tipo “Brown Bast”.

**3.3** A quantidade de glicosídeos cianogênicos produzidos nas folhas jovens é influenciada pelo teor de nitrogênio e manganês no tecido vegetal.

### **4 OBJETIVOS**

Determinar critérios de seleção de clones de copa para a obtenção de combinações copa/painel mais produtivas, com base na avaliação das relações entre a cianogênese, a estabilidade do látex e a incidência de secamento do painel de sangria através dos seguintes estudos:

**4.1** Levantamento do potencial cianogênico (HCNp) entre os clones de copa disponíveis;

**4.2** Evidências do transporte de glicosídeos cianogênicos da copa para o tronco, como fator de variação do HCNp da casca do painel de sangria ;

**4.3** Relação entre a cianogênese e a estabilidade do látex e o secamento do painel de sangria;

**4.4** Adubação com nitrogênio e manganês na formação dos glicosídeos cianogênicos e no estado nutricional.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Local e condições climáticas

Os experimentos foram realizados no campo experimental da Embrapa Amazônia Ocidental (CPAA), localizado nas coordenadas 3°8'S e 59°52'W, no município de Manaus, Estado de Amazonas sobre um Latossolo Amarelo distrófico, textura argilosa (730 g kg<sup>-1</sup> de argila), com as seguintes características químicas (0-20 cm): pH (água) = 4,3; N total 1,55 g kg<sup>-1</sup>; P (Mehlich 1) = 2,0 mg dm<sup>-3</sup>; K (Mehlich 1) = 47,0 mg dm<sup>-3</sup>; Na (Mehlich 1) = 7,0 mg dm<sup>-3</sup>; Ca (KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>) = 0,24 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg (KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>) = 0,12 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al (KCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>) = 1,45 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; H+Al = 8,04 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; MO (matéria orgânica) = 46,89 g kg<sup>-1</sup>; Cu (Mehlich 1) = 0,25 mg dm<sup>-3</sup>; Fe (Mehlich 1) = 333 mg dm<sup>-3</sup>; Mn (Mehlich 1) = 5,15 mg dm<sup>-3</sup> e Zn (Mehlich 1) = 0,68 mg dm<sup>-3</sup>; V% = 6,3 (EMBRAPA, 1997).

O clima predominante na região é o tropical úmido, tipo Afi, pela classificação de Köppen, com chuvas relativamente abundantes durante o ano todo (média de 2.250 mm), com alta umidade relativa do ar, sendo que a quantidade, nos meses de menor precipitação, é sempre superior a 60 mm, período esse, inferior a dois meses. A temperatura média anual na região (dia e noite) é de, aproximadamente, 26°C (VIEIRA; SANTOS, 1987).

### 5.2 Levantamento do potencial cianogênico (HCNp) entre os clones de copa

Para expressar o potencial cianogênico (HCNp) entre diferentes clones de copa, esse foi determinado em folhas jovens e em folhas maduras em cinco replicatas, representadas por uma planta em cada parcela, em seringueira de seis anos e em plantas de jardim clonal.

O jardim clonal é uma estrutura importante para a produção de mudas de seringueira, pois dele são retiradas as hastes, contendo gemas que serão enxertadas nas plantas obtidas a partir das sementes, produzindo mudas de materiais de alta produtividade de látex, funcionando como estoque de clones produtivos para os plantios definitivos. As plantas nos jardins clonais encontram-se separadas de 1,0 m na linha e 50 cm entre plantas de uma mesma linha e também estão enxertadas sobre plantas obtidas através de sementes (Figura 3).



**Figura 3** – Clones de copa em jardim clonal plantado em Latossolo Amarelo distrófico de terra firme da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus – AM.

### **5.2.1 Material vegetal**

Os clones de copa foram previamente selecionados para alto pegamento de enxertia e resistência à mancha areolada, esperando-se uma correspondência entre o HCNp das plantas do mesmo clone nas duas condições estudadas (jardim clonal e plantas adultas), o que permitiria a seleção dos clones de baixo HCNp ainda na fase de jardim clonal, antes de serem enxertados como copa.

Nas plantas adultas, foram utilizados os clones da espécie *H. pauciflora* (CPAA C 06 e CBA2), *Hevea nitida* (CPAA C 65 e CPAA C 64) e clones híbridos obtidos dos cruzamentos entre as espécies *Hevea pauciflora* e *Hevea guianensis* var. *marginata* (CPAA C 01, CPAA C 11, CPAA C 13, CPAA C 14, CPAA C 15, CPAA C 17, CPAA C 18 e CPAA C 20) e *H. pauciflora* e *H. rigidifolia* (CPAA C 33) enxertados sobre o clone de painel CNS AM 7905.

As plantas de jardim clonal, além dos mesmos clones citados para as plantas adultas, também foram utilizados os clones de *Hevea nitida* (CPAA C 67 e CPAA C 69) e de *Hevea rigidifolia* (CPAA C 71, CPAA C 72, CPAA C 79, CPAA C 80 e CPAA C 81). O material vegetal utilizado na determinação do HCNp foi coletado no mesmo jardim clonal, com exceção dos clones CPAA C 01 e CPAA C 81, cujo número de plantas não foi suficiente, sendo necessário coletar o material em outras áreas de cultivo.

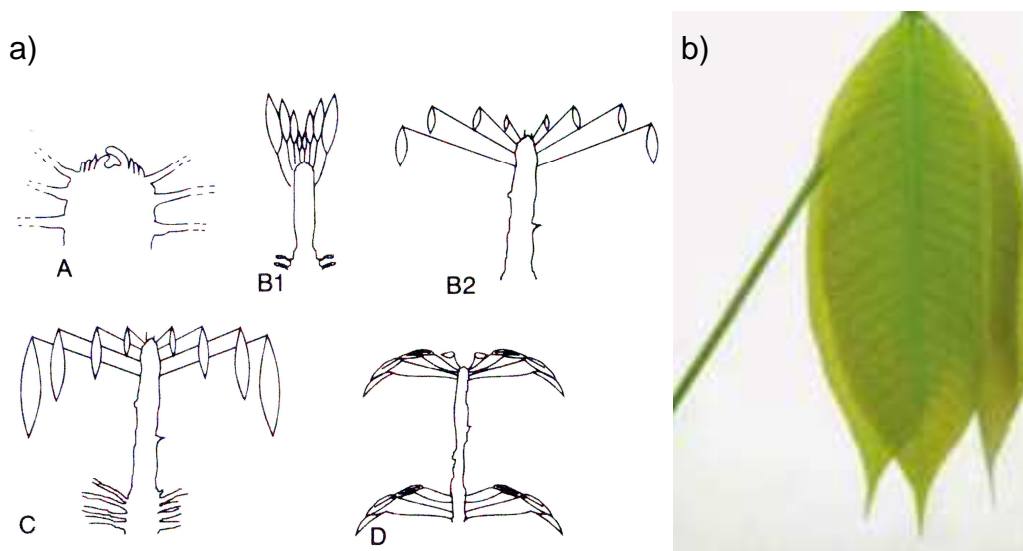
A variação nos valores de HCNp para esses dois últimos clones levou ao estudo da sua correlação com os teores de nutrientes, cujo experimento está descrito no item 5.5.1, pois, excluindo-se o fator genético, por tratar-se de clones, como causa dessa variação, uma possível explicação seria a influência do estado nutricional no acúmulo de glicosídeo cianogênico.

Os clones citados fazem parte do programa de melhoramento genético de clones de copa feito pela Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus (AM). Dentro deste programa, no processo de seleção para produção de borracha seca, foram descartados os clones CPAA C 11 e CPAA C 17, por apresentarem alto índice de secamento do painel na fase inicial do processo de sangria (MORAES, 2000).

Mesmo com esse problema observado, optou-se em incluir esses dois clones (CPAA C 11 e CPAA C 17) no processo de avaliação experimental, em decorrência da hipótese principal do trabalho, pois além da seleção de clones de copa de baixo HCNp, o estudo buscou a confirmação de que clones de copa com alto HCNp estejam relacionados ao aparecimento do secamento do painel do tipo “Brown Bast”, supondo-se que para isso, haveria uma maior quantidade de glicosídeo cianogênico transportado da copa para o painel.

### **5.2.2 Determinação do potencial cianogênico (HCNp)**

A dosagem do HCNp foi realizada segundo o método descrito por Lieberei (1986) e Selmar (1986), com as modificações de Moraes, Moraes e Moreira (2002), em extratos obtidos por maceração de 1,0 g de tecido fresco de folíolos maduros ou de folíolos no estágio C (folhas na fase final de expansão do limbo, ainda pendentes e de cor verde claro – Figura 4) em gral com pistilo pré-resfriados com a adição de 4,0 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,067 mol L<sup>-1</sup>) também pré-resfriado. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 20.000 g durante 14 minutos, entre 0°C e 6°C e o sobrenadante transferido para frascos tampados.



**Figura 4** – Esquema dos estádios foliares de seringueira (a) descritos por Hallé, Olderman e Tomlinson (1978), aspecto da folha no estágio C em fase final de expansão do limbo, ainda pendentes e de cor verde claro (b).

Para total liberação do cianeto foi acrescentado ao meio de reação, contendo 0,05 mL do sobrenadante e 0,45 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , ( $0,067 \text{ mol L}^{-1}$ ), 0,1 mL da enzima linamarase ( $\beta$ -glicosidase), extraída dos folíolos jovens da seringueira (estádio C). Para tal, os folíolos foram homogeneizados em tampão de fosfato (pH 7,3), seguido de centrifugação a 30.000 g, precipitação com sulfato de amônio, adicionado até atingir 80 % da saturação (34,4 g de sulfato de amônio para cada 100 mL de solução), nova centrifugação a 20.000 g com descarte do sobrenadante e dessalinização do precipitado por lavagem com tampão de fosfato, pH 6,5,  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , e filtrações sucessivas em membranas Milipore, tipo PTGC, sob pressão constante de 2,5 bárias, obtendo-se a enzima parcialmente purificada, cuja atividade foi determinada no meio de incubação com p-nitrofenilglucopiranosídeo (SELMAR, 1986), medida pela liberação de p-nitrofenol (p-NP). A atividade encontrada foi de  $0,24 \mu\text{mol p-NP min}^{-1}$  com resultado semelhante ao de  $0,22 \mu\text{mol min}^{-1}$  apresentado por Lieberei (1986) para  $\beta$ -glicosidase também extraída de folha jovem de seringueira e semi purificada em coluna de gel de Sephadex G 150.

Para maior segurança quanto ao desempenho da enzima extraída, fez-se um teste de sua capacidade de hidrólise com solução de linamarina na concentração de  $0,238 \text{ mg mL}^{-1}$ , correspondendo a  $25,04 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$ , obtendo-se o valor esperado com a hidrólise completa do glicosídeo pela ação da enzima adicionada ao meio de reação.



Após o período de incubação de 20 minutos, foram adicionadas ao meio de reação 0,6 mL de NaOH, ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) e 3,85 mL de água destilada, num total de 5,0 mL, e em seguida as substâncias cloramina (50 mg), ácido 2,3-dimetilbarbitúrico (34 mg) e piridina (0,1 mL). O cianeto liberado reage com a cloramina formando cloreto de cianogênio que promove a quebra do anel de piridina, levando à formação de dialdeído glutationa, o qual se une a dois moles de ácido 2,3-dimetilbarbitúrico, produzindo uma coloração azul violeta.

A absorbância pode ser medida cinco minutos após a adição dos reagentes no comprimento de onda de 585 nm, tempo necessário para o desenvolvimento da coloração, não devendo ultrapassar 15 minutos, pois após esse período a reação se altera e a coloração torna-se menos intensa. A Figura 5 traz um esquema para melhor compreensão do procedimento analítico descrito.

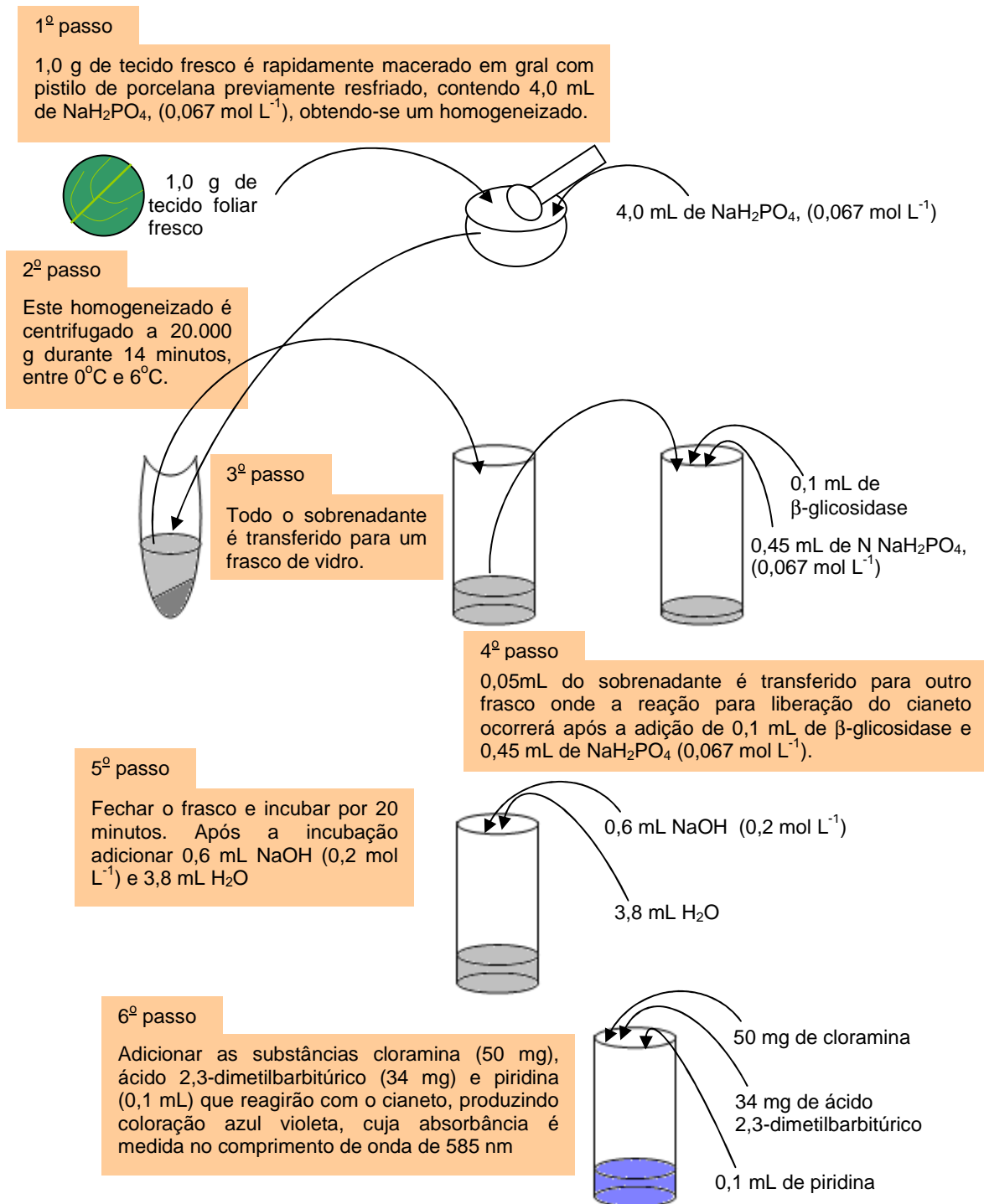
O cálculo da quantidade de cianeto liberado por grama de matéria fresca de folha de seringueira foi feito com base em curva padrão de cianeto (HCN), nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{CN}^-$ .

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, análise de variância (ANOVA), teste F e contrastes entre as médias foram determinados pelos testes de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES; GARCIA, 2002) e de agrupamento - Scott Knott, também a 5% de probabilidade (SCOTT; KNOTT, 1974). Para testar a correspondência entre os valores nas duas condições (plantas adultas e de jardim clonal) também foi feita a correlação (5%) entre esse dois grupos de valores de HCNp.

### **5.3 Evidências do transporte de glicosídeos cianogênicos da copa para o tronco como fator de variação do HCNp da casca do painel de sangria**

#### **5.3.1 HCNp na casca do tronco a diferentes distâncias do câmbio**

Valores mais altos próximos ao câmbio podem indicar transporte basípeto pelos tubos crivados ativos, situados na camada de 1,0 mm ao redor do câmbio. As amostras da casca do tronco foram retiradas a 1,2 m do solo com o auxílio de um vazador de ferro de 3,0 cm de diâmetro.



**Figura 5** – Esquema do procedimento para determinação do potencial cianogênico ( $\text{HCNp}$ ) em tecido vegetal (SELMAR, 1986; MORAES; MORAES; MOREIRA, 2002).

No laboratório, estas foram lavadas em água de torneira e enxugadas com papel absorvente. As margens esmagadas dos discos de casca foram seccionadas com canivete afiado. Em seguida, as amostras foram subdivididas em três camadas de 2,0 mm de espessura, formando as sub-amostras de 0 a 2,0 mm, 2,0 a 4,0 mm e 4,0 a 6,0 mm, a partir da camada mais próxima do câmbio para fora. O HCNp foi determinado, conforme o item 5.2.2, em 1,0 g de tecido fresco de cada sub-amostra.

Nessa avaliação, assim como nas dos itens 5.2.2, 5.3.2 e 5.4.2, optou-se por outras combinações copa/painel para que as plantas citadas no item 5.2.1, cujo clone de painel foi o CNS AM 7905, e que fazem parte de um experimento de competição de clones de copa localizado na Embrapa Amazônia Ocidental, fossem menos danificadas pelo procedimento de amostragem do tecido vegetal para determinação do HCNp no tronco das plantas.

Foram estudadas as combinações copa/painel, de 18 anos, dos clones CNS G 124/Fx 4098 e PA 31/Fx 4098 (copas de *H. pauciflora* e painel de *H. brasiliensis*). Devido à impossibilidade de obtenção de plantas adultas do clone Fx 4098 com copa própria, pela sua alta susceptibilidade ao *M. ulei*, optou-se pelo estudo do clone IAN 6323 com copa própria, sendo essas plantas de 26 anos de idade.

Cada combinação copa/painel, assim como o clone com copa própria, foi representada por cinco plantas. Os dados individuais por camada de casca, por clone da combinação copa/painel foram submetidos ao teste de normalidade, análise de variância (ANOVA) e teste F, sendo a significância dos contrastes entre as médias determinadas pelos testes de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES; GARCIA, 2002).

A confirmação da concentração do glicosídeo cianogênico nos 2,0 mm mais próximos ao câmbio condicionou a utilização dessa camada nos experimentos subsequentes com mensurações de HCNp feitas na casca.

### **5.3.2 Gradiente longitudinal de HCNp ao longo do caule do painel sob copas enxertadas e com copa própria**

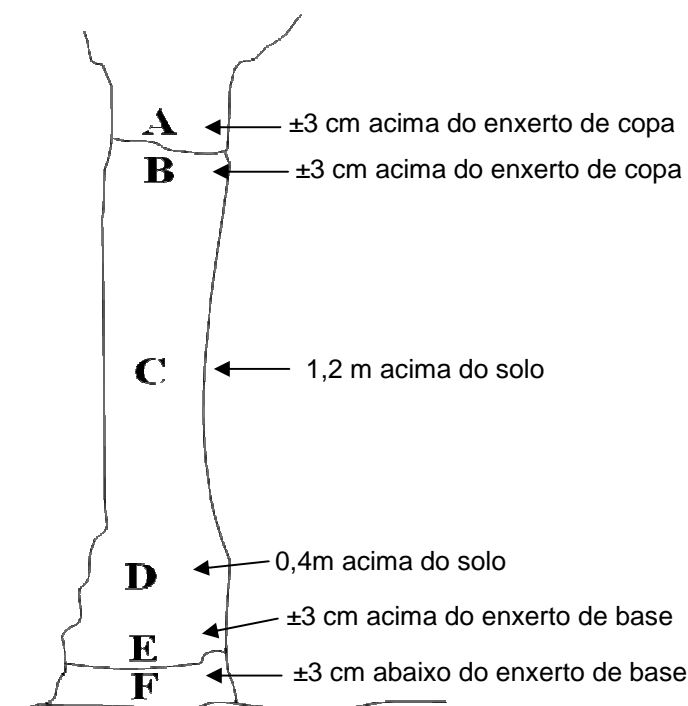
Sendo a copa fonte importante do HCNp do caule, então deve ocorrer gradiente basípeto negativo ao longo do tronco. Foi adotado o procedimento análogo ao da determinação do HCNp na casca do tronco a diferentes distâncias do câmbio, sendo as amostras reduzidas a 1,0 g de tecido fresco com a utilização apenas da camada de, aproximadamente, 2,0 mm de espessura mais próxima ao câmbio.

Para o clone IAN 6323 com copa própria, os pontos de coleta foram os seguintes: 2,0 m, 1,2 m e 0,4 m do solo e a  $\pm 3,0$  cm acima e abaixo da união do enxerto de base. As combinações copa/painel foram as mesmas do estudo anterior, acrescido da combinação CNS G 112/Fx 4098, com os seguintes pontos de coleta: a  $\pm 3,0$  cm acima e abaixo da união do enxerto de copa, 1,2 m e 0,4 m do solo e  $\pm 3,0$  cm acima e abaixo da união do enxerto de base (Figura 6).

### 5.3.3 Correlação entre o HCNp das folhas dos clones de copa e o HCNp da casca do painel sob essas copas

Sendo a copa fonte importante do HCNp do caule, este deve ser mais alto sob copas de mais alto HCNp. O estudo foi feito em plantas de seis anos compostas pelo clone de painel CNS AM 7905 (*Hevea brasiliensis*), enxertado pelas seguintes copas:

- Híbrido de *Hevea pauciflora* x *Hevea rigidifolia*: CPAA C 11;
- Híbridos de *Hevea pauciflora* x *Hevea guianensis* var. *marginata*: CPAA C 01, 13, 14, 15, 17, 18, 20 e 33;
- *Hevea pauciflora*: CPAA C 06 e CBA 2;
- *Hevea nítida*: CPAA C 64 e 65.



**Figura 6** – Esquema dos pontos de amostragem no tronco da seringueira para dosagem de potencial cianogênico (HCNp).

Os dados individuais por ponto de coleta de casca, por clone ou combinações copa/painel foram também submetidos à análise de variância (ANOVA), teste F e a comparação dos contrastes entre as médias foram determinados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES; GARCIA, 2002).

Foram utilizados os dados de HCNp das copas determinados no item 5.2 [Levantamento do potencial cianogênico (HCNp) entre os clones de copa]. O HCNp da casca do painel (CNS AM 7905) sob as respectivas copas foi determinado em cinco amostras de casca coletadas a 1,2 m do solo, cada amostra correspondendo a uma planta, cujos resultados foram também submetidos à análise de variância (ANOVA), teste F e teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi realizada com os mesmos dados, a correlação entre o HCNp da copa e o HCNp do painel.

## **5.4 Relação entre a cianogênese e a estabilidade do látex e o secamento do painel de sangria**

### **5.4.1 Potencial cianogênico (HCNp) e estabilidade do látex**

A estabilidade do látex foi avaliada pelo Índice de Ruptura dos Lutóides (IRL) de acordo com o método descritos por Ribailier (1968) e Moraes e Moraes (2004), que utiliza a atividade da fosfatase ácida, contida apenas nos lutóides intactos do látex “in situ”, não alterado pela sangria. A percentagem da atividade da fosfatase ácida proveniente dos lutóides danificados por ocasião da sangria é proporcional ao número de lutóides danificados.

O substrato utilizado é o p-nitrofenilfosfato em tampão de acetato pH 5,0 em meio isotônico de manitol, para preservar os lutóides das amostras de látex (FAL = fosfatase ácida livre) e em meio com detergente que rompe a membrana de todos os lutóides liberando o total da fosfatase ácida (FAT = fosfatase ácida total).

A reação com a fosfatase do látex foi feita diretamente no campo, logo após a coleta de duas amostras de 12 gotas de látex, sendo uma amostra incubada com o meio contendo manitol, para a fosfatase ácida livre e a outra com o meio contendo detergente, para a fosfatase ácida total. No laboratório, os coágulos de borracha foram descartados e as alíquotas do soro do látex incubado foram diluídas em água destilada e tratadas com NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, para evidenciar a coloração amarela do p-nitrofenol, cuja absorbância foi determinada a 400 nm. O Índice de Ruptura dos Lutóides foi calculado com a seguinte fórmula:

$$\text{IRL} = \frac{\text{Absorbância de FAL}}{\text{Absorbância de FAT}} \times 100$$

Nesse estudo foram utilizadas as mesmas plantas do item 5.3.3, com o emprego dos dados do HCNp obtidos na amostras da casca do clone de painel CNS AM 7905.

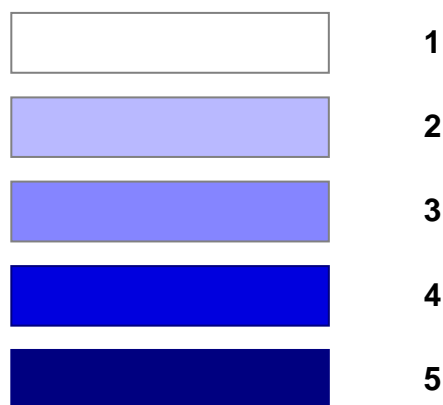
As correlações ( $p \leq 0,05$ ) entre o indicador da estabilidade do látex (IRL) e o HCNp da casca do painel forneceram elementos para o teste da hipótese da perda da estabilidade do látex (que pode evoluir para coagulação "in situ" e secamento do painel) pela intensidade da cianogênese e como fator do efeito depressivo das copas enxertadas na produção de borracha.

#### **5.4.2 Comparação semiquantitativa da liberação de HCN da casca do caule de plantas com e sem secamento de painel**

Foram estudadas plantas de 18 anos do clone de painel Fx 4098 (*Hevea brasiliensis*) enxertadas sob copas de *Hevea pauciflora* PA 31, CNS G 112 e CNS G 124, nas seguintes condições: ausência (0%) e presença (100%) de secamento do painel de sangria.

No procedimento utilizado nas análises deste experimento, o tecido vegetal não sofreu maceração total, sendo que a liberação de HCN ocorreu pela ação da enzima  $\beta$ -glicosidase presente no tecido, sem a necessidade de sua adição para a total liberação do HCN, como na determinação do HCNp, aproximando-se da liberação que ocorre pelo ferimento da sangria.

A comparação semiquantitativa da liberação de HCN da casca do caule foi feita com a utilização de uma série de 1 a 5 de intensidades de coloração de papel (Figura 7) tipo Feigl Anger [tiras de papel de filtro de 5,0 cm x 0,6 cm impregnadas com etilacetoacetato de cobre ( $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{CuO}_6$ ) de coloração branca, que em contato com o gás cianeto torna-se do azul ao púrpuro, dependendo da concentração de cianeto.



**Figura 7** – Série de 1 a 5 de intensidades de coloração de papel tipo Feigl Anger para comparação semiquantitativa da liberação de HCN da casca do caule de plantas com e sem secamento de painel.

Para a definição das cinco intensidades de coloração, foram utilizados cinco frascos de vidro de 2,3 cm de diâmetro e 7,4 cm de altura com 1, 2, 3, 4 e 5 discos de 0,7 cm de diâmetro dos folíolos no estágio C inicial do clone Fx 4098. Os discos foram macerados com areia fina (lavada com ácido clorídrico 0,2% e enxaguada com água destilada para eliminação da matéria orgânica) e bastão de vidro em pequenas cápsulas de alumínio, imediatamente transferidas para os frascos de vidro contendo uma fita de papel Feigl Anger em posição vertical, presa ao centro da tampa de plástico com fechamento hermético.

Após 25 minutos à temperatura ambiente ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ) foram retiradas as tampas de plástico com o papel Feigl Anger. As colorações obtidas foram reproduzidas em guache, pois sua permanência no papel Feigl Anger é temporária, e posteriormente, classificadas em padrões visuais de 1 a 5.

A liberação de HCN de amostras de casca coletadas a 1,2 m do solo de cinco plantas foi comparada com secamento total e cinco sem secamento do painel Fx 4098 sob cada planta das copas de *H. pauciflora* CNS G 112, CNS G 124 e PA 31 de 18 anos de idade.

Após a coleta de uma amostra por planta, com vazador de ferro de 2,0 cm de diâmetro. No laboratório, as amostras foram lavadas em água de torneira e enxugadas com papel absorvente. As margens esmagadas dos discos de casca foram seccionadas com canivete afiado, na casca macia próximo ao câmbio. Em seguida, reduzida a um disco de cerca de 2,0 mm de espessura contendo a casca macia ao redor do câmbio e seu peso ajustado para cerca de 400 mg, com retirada do excesso de casca.

As amostras foram esmagadas com alicate de pinças estriadas e imediatamente colocadas no frasco de vidro com papel Feigl Anger. As tonalidades de coloração aos 20, 40, 50, 60, 70, e 80 minutos foram classificadas por comparação visual com os padrões de guache. Os frascos contendo as amostras de casca esmagadas juntamente com o papel Feigl Anger foram mantidos a temperatura ambiente.

Para a condição de secamento total foi determinado o HCNp em amostras de casca de acordo com o procedimento descrito no item 5.2.2 na altura de 1,2 m do solo. As plantas sem secamento foram as mesmas do item 5.3.2 (Gradiente longitudinal de HCNp ao longo do caule do painel sob copas enxertadas e com copa própria) que também previa a determinação do HCNp na altura especificada acima.

Foi determinada ainda a atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase (linamarase) em amostras de casca retiradas das mesmas plantas e na mesma altura, utilizadas no teste com o papel Feigl Anger, para o cálculo da capacidade cianogênica ( $\text{HCNc} = \text{HCNp} \times \text{atividade da } \beta\text{-glicosidase}$  – SELMAR, 1986). A determinação da atividade da enzima foi feita de acordo com Selmar (1986), utilizando 1,0 g de tecido vegetal homogeneizado em gral de porcelana pré resfriado, com 4,0 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,067 mol L<sup>-1</sup>. O extrato foi decantado, após compressão do resíduo fibroso e novamente moído com 5,0 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,067 mol L<sup>-1</sup>.

O extrato final, livre da maior parte do resíduo fibroso foi centrifugado a 20.000 g por 60 minutos, entre 0°C e 6°C. O sobrenadante filtrado em membrana tipo Milipore e lavado três vezes, com filtração nas mesmas condições, com 30 mL de tampão de fosfato (pH 6,5 - 10 mmol L<sup>-1</sup>) a cada lavagem, para eliminação de pigmentos e possíveis inibidores da enzima, sendo que na última lavagem o volume final do extrato foi reduzido para 5,0 mL.

A atividade dessa enzima parcialmente purificada foi mensurada pela quantificação do p-nitrofenol liberado do substrato p-nitrofenilglicopiranosídeo no meio de incubação, com a seguinte composição inicial: 1,0 mL de solução a 10 mmol L<sup>-1</sup> de p-nitrofenilglicopiranosídeo diluído em tampão de acetato, 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 5,5; 3,9 mL de tampão de acetato; 0,1 mL de solução de  $\beta$ -glicosidase, num total de 5 mL.

O tempo de incubação foi de 10 minutos a temperatura de 30°C. Após esse período, foi transferido 0,5 mL da mistura para frasco contendo 1,0 mL de  $\text{NaCO}_3$ , 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pré-resfriado, e 2,5 mL de água destilada, para paralisar a atividade da enzima e evidenciar a coloração do p-nitrofenol liberado. As leituras da absorbância foram



efetuadas a 400 nm e o cálculo da quantidade de p-nitrofenol liberado por grama de matéria fresca de casca, por minuto, com base em curva padrão de p-nitrofenol, nas concentrações de 0,02; 0,04; 0,08 e 0,10 mmol L<sup>-1</sup>.

A atividade da enzima β-cianoalanina sintase (β-CAS) foi determinada na casca do caule dos clones com três repetições. A homogeneização das amostras foi realizada em gral com pistilo resfriados com 1,0 g de casca do caule em 2,0 mL de tampão tris/HCl 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,2, também resfriado. Esse homogeneizado foi centrifugado por uma hora a 20.000 g, entre 0°C e 6°C.

Transferiu-se 1,0 mL do sobrenadante para frasco de vidro com capacidade para 30 mL, e adicionou-se 0,5 mL de KCN, 50 mmol L<sup>-1</sup>, diluído em tampão tris 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,2, e em seguida, 0,5 mL de L-cisteína, 10 mmol L<sup>-1</sup>, diluída no mesmo tampão. Incubou-se por 30 minutos a 3°C. Em seguida acrescentou-se a mistura 0,5 mL de N-N-dimetil-p-fenilenodiamina 20 mmol L<sup>-1</sup>, em HCl 7,2 N, e 0,5 mL de FeCl<sub>3</sub>, 30 mmol L<sup>-1</sup>, em HCl 1,2 N, obtendo-se um volume final de 3 mL. Após repouso de 20 minutos a 30°C, foi feita a centrifugação a 1.000 g por 10 minutos.

As leituras de absorbância a 650 nm, foram comparadas com curva padrão de Na<sub>2</sub>S, de 0,04 mmol L<sup>-1</sup> a 0,167 mmol L<sup>-1</sup>, a partir de solução estoque de Na<sub>2</sub>S, 0,1 mol L<sup>-1</sup>, titulada por iodometria, após precipitação do sulfeto com cloreto de zinco amoniacal, (SCOTT, 1939).

O tiosulfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, para dosagem do excesso de iodo, na titulação do Na<sub>2</sub>S 0,1 N, foi titulado com permanganato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, titulado, por sua vez, com oxalato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (MORITA; ASSUMPÇÃO, 1990). Como branco foram utilizados, separadamente, 1,0 mL do extrato da enzima diluído em 2,0 mL do tampão tris e o mesmo volume das soluções dos quatro reagentes (0,5 mL de cada), com 1,0 mL do tampão tris. A média das absorbâncias dos dois brancos foi subtraída dos resultados das amostras.

Os dados de HCNp, β-glicosidase, HCNc e β-cianoalanina sintase foram submetidos ao teste de normalidade, análise de variância (ANOVA), teste F e comparação dos contrastes entre as médias pelos testes de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES; GARCIA, 2002) e de agrupamento (HCNp) por Scott Knott a 5% de probabilidade (SCOTT; KNOTT, 1974).

### **5.4.3 Indução de secamento do painel de sangria com KCN e linamarina**

Soluções de KCN ( $1.250 \text{ mg L}^{-1}$ ) e linamarina ( $750 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram aplicadas em sulcos verticais, com 5,0 a 7,0 mm de profundidade, feitos com a faca de sangria na casca do tronco de cinco plantas de cada um dos clones Fx 4098 (*H. brasiliensis*) e Fx 3899 (*H. benthamiana* x *H. brasiliensis*), ambos sob o clone de copa PA 31, e que não apresentavam secamento do painel.

As soluções foram retidas nos sulcos com placa de massa de modelar aderida à casca. As aplicações repetidas em dias alternados até a detecção dos sintomas do secamento do painel de sangria. Foram feitas determinações de HCNp na casca do tronco dos dois clones em amostras retiradas a 1,2 m do solo antes da aplicação da solução de linamarina e após a detecção do secamento, e em plantas com secamento total do painel conforme procedimento detalhado no item 5.2.2.

As plantas do clone de painel Fx 4098, sob copa PA 31, que receberam a aplicação de solução de linamarina foram as mesmas utilizadas no experimento apresentado no item 5.3.2 (Gradiente longitudinal de HCNp ao longo do caule do painel sob copas enxertadas e com copa própria), com o emprego dos dados do HCNp obtidos na amostras da casca retiradas a 1,2 m do solo para representar a condição antes da aplicação de linamarina.

No caso da aplicação de KCN, a determinação de HCNp antes e após a aplicação da solução não foi realizada, pois, apesar deste provocar danos às células com as quais entra em contato, a sua degradação é muito rápida, dificultando a sua quantificação nos tecidos.

Antes do início da aplicação das soluções de linamarina e KCN e após a detecção do secamento, foi medida a pressão de turgência dos laticíferos no período da manhã e antes da sangria, com manômetros de capilar de vidro (MILBURN; RANASINGHE, 1996), uma vez que a redução da pressão de turgência é uma condição para a formação de tilosóides nos laticíferos, os quais são formados por invaginações de células contíguas do parênquima, constituindo um dos sintomas característicos do secamento do tipo “Brown Bast”, de ocorrência mais generalizada.

Os valores obtidos de HCNp e pressão de turgência também foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste F e a comparação dos contrastes entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (PIMENTEL GOMES; GARCIA, 2002).

## **5.5 Adubação com nitrogênio (N) e manganês (Mn) na formação dos glicosídeos cianogênicos**

### **5.5.1 Correlação entre o HCNp e o estado nutricional dos clones de copa**

Nos folíolos jovens da seringueira (estádio C) e a folha diagnóstica (folíolos recém maduros do terço superior da planta) dos clones de copa CPAA C 01 (n = 12) e CPAA C 81 (n = 11) coletados ao acaso em diferentes jardins clonais foram feitas as análises foliares [N, fósforo (P), K, cálcio (Ca), magnésio (Mg), S (enxofre), B (boro), Cu, Fe, Mn e Zn]. Os teores foliares obtidos foram correlacionados com os valores de HCNp do folíolo no estágio C.

As análises químicas tiveram o seguinte procedimento: amostras das folhas foram secas em estufa a 65°C, moídas e levadas ao laboratório. O N total foi extraído por digestão sulfúrica e determinado pelo método micro-Kjeldahl. Os teores de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn extraídos por digestão nitroperclórica, sendo que o P e S foram determinados por espectrofotométrica e turbidimetria, respectivamente. O teor foliar de B foi feito por incineração a 500°C e determinado com reagente colorimétrico Azometina-H, enquanto os demais nutrientes foram quantificados por espectrofotometria de absorção atômica (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Devido a obtenção de correlações significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os teores foliares de N ( $r = 0,70$ ) e Mn ( $r = 0,72$ ) das plantas de jardim clonal com o potencial cianogênico (folha diagnóstica e folíolo C), optou-se em realizar outro experimento com doses de N e Mn em condições de viveiro a céu aberto (item 5.5.2), a fim de verificar as prováveis interações entre esses dois nutrientes com o HCNp.

### **5.5.2 Nitrogênio e manganês no potencial cianogênico (HCNp) em plantas de seringueira**

#### **5.5.2.1 Obtenção de plantas gêmeas de seringueira para o experimento de viveiro em condições de campo**

A obtenção de plantas gêmeas foi necessária para que ocorresse a menor variabilidade genotípica, para isso utilizou-se a técnica de Ramaer (MEYER, 1938), com modificações realizadas por Moraes e Moraes (2006), que consistiu na separação em duas metades longitudinais da radícula de sementes pré-germinadas da seringueira, no

estádio denominado como “pata de aranha” (Figura 8) (GONÇALVES et al., 2001), com seccionamento do epicótilo acima das duas gemas cotiledonares, que deram origem ao caule das plantas gêmeas. Essas sementes foram de *H. brasiliensis* provenientes de cruzamentos ao acaso e que são utilizadas como porta enxerto de clones de painel de alta produtividade.

As sementes foram postas para germinar em serragem curtida, e após as incisões da pivotante e do epicótilo foram transferidas para copos de plástico de 500 mL, com paredes perfuradas, contendo como substrato areia e vermiculita na proporção 3:1, previamente autoclavadas por uma hora (Figura 9).

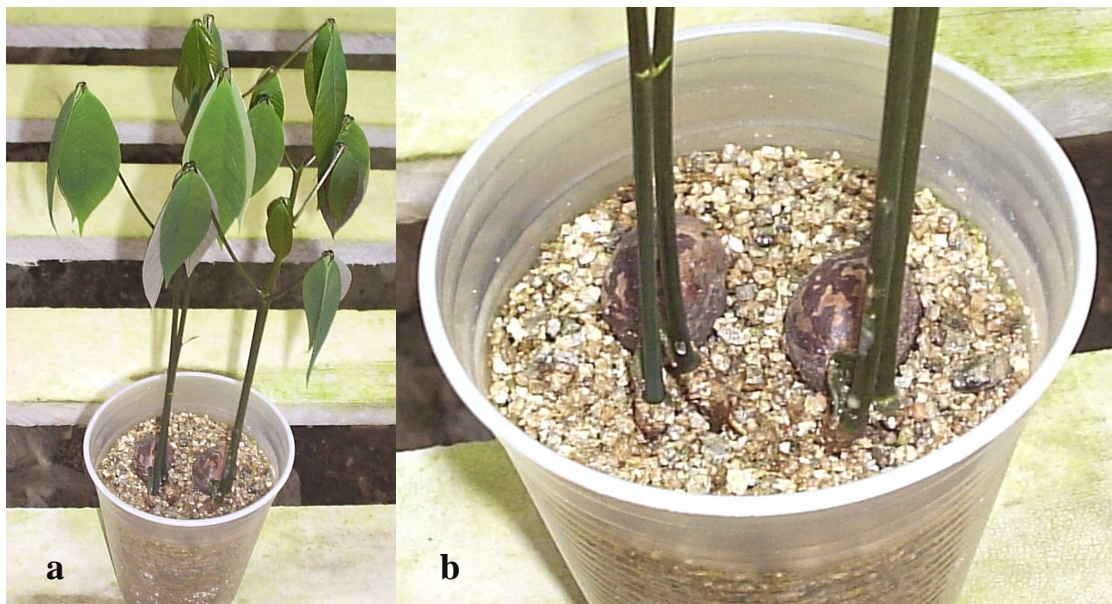


**Figura 8** – Semente de seringueira no estágio “pata de aranha”, utilizadas para a formação das plantas gêmeas.

#### **5.5.2.2 Repicagem para sacos de plástico a pleno sol**

Os pares de plântulas com o segundo lançamento maduro foram repicados para sacos de plástico, com 4,5 litros de capacidade, enchidos com terra peneirada e adubada. A adubação foi feita com adição de 280 g de superfosfato simples (20% de  $P_2O_5$ ), 50 g de cloreto de potássio (54% de  $K_2O$ ) e 100 g de calcário dolomítico (PRNT = 85%) para cada 100 litros do substrato (PEREIRA; PEREIRA, 1986; MORAES; MORAES; MOREIRA, 2008). Os sacos de terra ficaram encubando por trinta dias, e após este período, e antes da aplicação dos tratamentos apresentou as seguintes características químicas: pH (água) = 4,3; N total  $2,62 \text{ g kg}^{-1}$ ; P =  $214,0 \text{ mg dm}^{-3}$ ; K =  $189,0 \text{ mg dm}^{-3}$ ; Na =  $2,0 \text{ mg dm}^{-3}$ ; Ca =  $2,91 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; Mg =  $0,71 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ; Al =  $0,51$

$\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{H+Al} = 10,78 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{MO} = 52,47 \text{ g kg}^{-1}$ ;  $\text{Cu} = 0,84 \text{ mg dm}^{-3}$ ;  $\text{Fe} = 175 \text{ mg dm}^{-3}$ ;  $\text{Mn} = 4,34 \text{ mg dm}^{-3}$  e  $\text{Zn} = 0,84 \text{ mg dm}^{-3}$ ;  $\text{V}\% = 27,6$  (EMBRAPA, 1997).



**Figura 9** – a) Dois pares de plantas gêmeas formadas a partir da separação da radícula; b) detalhe do desenvolvimento das plantas gêmeas formadas pela técnica da separação da radícula em duas partes iguais proposta por Moraes e Moraes (2006).

Os sacos ficaram dispostos em quatro fileiras duplas de dez plantas em canaletas cavadas no solo a 10 cm, com largura suficiente para dois sacos. Entre cada fileira dupla foi deixada uma rua de 0,8 m. Os pares de plantas gêmeas foram colocados lado a lado e identificados com etiquetas de alumínio para determinação dos tratamentos.

### **5.5.2.3 Nitrogênio, manganês e teor de clorofila**

Após três meses de transplantadas e antes da aplicação dos tratamentos (primeiro lançamento), foram retiradas amostras de folhas recém maduras de todas as plantas gêmeas e agrupadas em oito amostras compostas para avaliação do estado nutricional (item 5.5.1), nos quais apresentaram, na média, os seguintes teores:  $\text{N} = 29,18 \pm 2,48 \text{ g kg}^{-1}$ ,  $\text{P} = 2,07 \pm 0,20 \text{ g kg}^{-1}$ ,  $\text{K} = 5,56 \pm 0,53 \text{ g kg}^{-1}$ ,  $\text{Mg} = 1,86 \pm 0,20 \text{ g kg}^{-1}$ ,  $\text{S} = 2,01 \pm 0,30 \text{ g kg}^{-1}$ ,  $\text{B} = 24,47 \pm 3,34 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $\text{Cu} = 26,02 \pm 7,79 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $\text{Fe} = 63,41 \pm 7,53 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $\text{Mn} = 75,85 \pm 7,32 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $\text{Zn} = 25,42 \pm 2,66 \text{ mg kg}^{-1}$ , clorofila =  $125,78 \pm 9,82 \mu\text{g cm}^{-2}$ .

### **a) Nitrogênio**

As doses de N foram definidas pela intensidade de aplicação de uréia (440 g L<sup>-1</sup> de N) e colocadas após o terceiro lançamento, partindo-se de uma dose base de 150 mL/saquinho de uma solução de uréia a 0,2%. Assim, o tratamento A<sub>1</sub> recebeu uma aplicação quinzenal da solução e o tratamento A<sub>2</sub> duas aplicações de N no mesmo período distribuída de forma eqüidistante. Em ambos os tratamentos, as aplicações das doses foram realizadas por um período de dois meses, perfazendo quatro aplicações no tratamento A<sub>1</sub> (0,8%) e oito aplicações no tratamento A<sub>2</sub> (1,6%).

### **b) Manganês**

No caso do Mn, este foi aplicado em dose única após o terceiro lançamento. Foram estudadas quatro doses de manganês (0, 10, 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup> – fonte: MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O), aplicadas dentro das duas doses de uréia (0,8 e 1,6% de N).

### **c) Clorofila**

Seis meses após o terceiro lançamento das folhas, foi determinada unidade SPAD nos três folíolos no estágio C (Figura 4). As leituras foram feitas no período da manhã com o clorofilômetro (SPAD - Minolta 502), valor esse, convertido em teor de clorofila (µg cm<sup>-2</sup>) (GUIMARÃES et al., 1999).

#### **5.5.2.4 Análise foliar e delineamento estatístico**

Após as leituras da unidade SPAD, os três folíolos no estágio C e a folha diagnóstico (MALAVOLTA, 1992) foram coletados para determinação do estado nutricional (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn), conforme Malavolta et al. (1997). Em decorrência dos baixos teores de HCNp verificados na folhas diagnóstico no experimento do item 5.2, a determinação do HCNp foi realizada apenas nos folíolos no estágio C (HALLÉ; OLDERMAN; TOMLINSON, 1978).

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4 [duas doses de N (uréia) x quatro doses de Mn], com cinco repetições. De acordo com o delineamento proposto, os resultados foram analisados estatisticamente através do teste de normalidade, análise de variância (ANOVA), teste F, correlações e regressões a 1% e 5% de significância (PIMENTEL GOMES; GARCIA, 2002).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Levantamento do potencial cianogênico (HCNp) entre os clones de copa

As Tabelas 2 e 3 mostram as variações significativas ( $p \leq 0,05$ ) dos valores de HCNp entre clones de copa das espécies *Hevea nítida*, *Hevea rigidifolia* e *Hevea pauciflora* e dos híbridos *Hevea pauciflora* x *Hevea rigidifolia* e *Hevea pauciflora* x *Hevea guianensis* var. *marginata*.

**Tabela 2** – Potencial cianogênico (HCNp) em  $\mu\text{g}$  de  $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$  massa fresca determinado na folha (estádio C) de clones de copa enxertados sobre o clone de painel CNS AM 7905, plantas de seis anos.

Clones	Espécie ou cruzamento	HCNp ( $\mu\text{g}$ de $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$ massa fresca) <sup>(1)</sup>
CPAA C 01	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	652,17 a <sub>1</sub>
CPAA C 06	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	410,63 a <sub>2</sub>
CPAA C 33	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. rigidifolia</i>	383,77 a <sub>2</sub>
CBA 2	<i>H. pauciflora</i>	328,22 a <sub>3</sub>
CPAA C 20	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	309,77 a <sub>3</sub>
CPAA C 17	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	273,76 a <sub>4</sub>
CPAA C 14	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	220,62 a <sub>5</sub>
CPAA C 15	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. rigidifolia</i>	209,72 a <sub>5</sub>
CPAA C 11	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	206,09 a <sub>5</sub>
CPAA C 13	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	152,43 a <sub>6</sub>
CPAA C 18	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	109,42 a <sub>7</sub>
CPAA C 64	<i>H. nítida</i>	75,85 a <sub>8</sub>
CPAA C 65	<i>H. nítida</i>	72,71 a <sub>8</sub>
CV %	7,83	
DMS	47,66	

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott. Média de cinco repetições.

Verificou-se que dos clones de copas enxertados, apenas 31% apresentaram valores de HCNp abaixo de  $200 \mu\text{g}$  de  $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$  de massa fresca, representados principalmente pela espécie *H. nítida*, cujos baixos valores de HCNp já foram observados por Lieberai (1988). O restante distribuiu-se em 54% para valores entre 200 e  $400 \mu\text{g}$  de  $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$  de massa fresca e 15 % para valores acima de  $400 \mu\text{g}$  de  $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$

de massa fresca (Tabela 2). No jardim clonal, essa proporção foi de 26, 48 e 26%, respectivamente (Tabela 3).

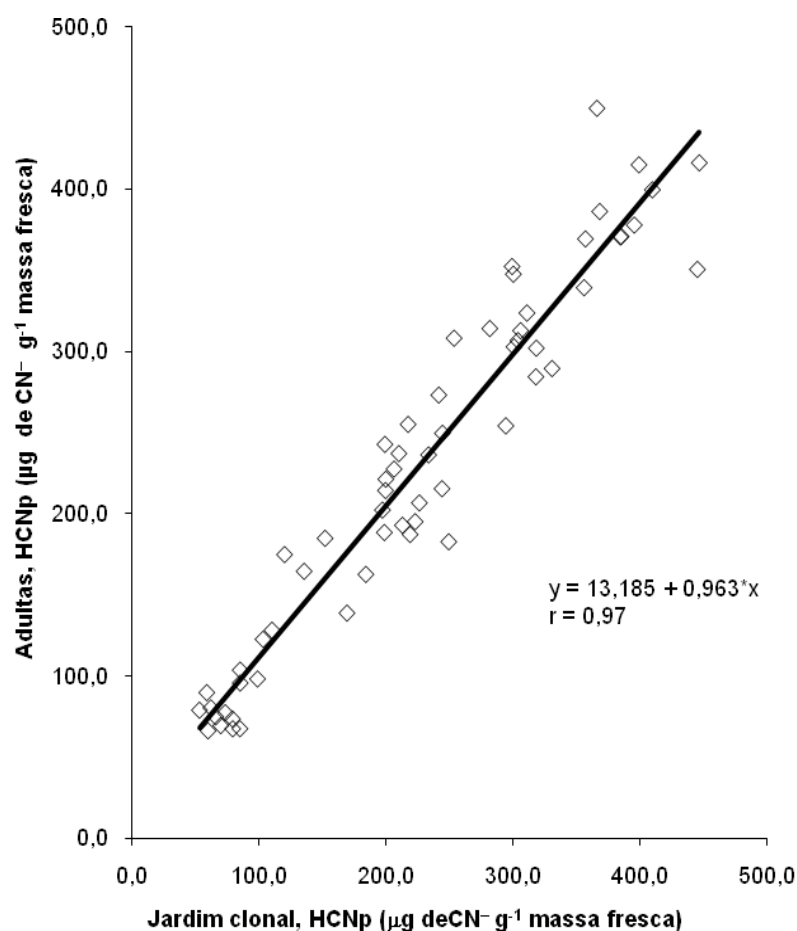
**Tabela 3** – Potencial cianogênico (HCNp) em  $\mu\text{g de CN}^- \text{g}^{-1}$  massa fresca determinado na folha (estádio C) de clones de copa resistentes ao mal-das-folhas mantidos em jardim clonal.

Clones	Espécie ou cruzamento	HCNp ( $\mu\text{g de CN}^- \text{g}^{-1}$ massa fresca) <sup>(1)</sup>
CPAA C 79	<i>H. rigidifolia</i>	780,07 a <sub>1</sub>
CPAA C 72	<i>H. rigidifolia</i>	638,86 a <sub>2</sub>
CPAA C 71	<i>H. rigidifolia</i>	503,51 a <sub>3</sub>
CPAA C 80	<i>H. rigidifolia</i>	500,43 a <sub>3</sub>
CPAA C 06	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. rigidifolia</i>	417,08 a <sub>4</sub>
CPAA C 33	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. rigidifolia</i>	381,01 a <sub>5</sub>
CBA 2	<i>H. pauciflora</i>	318,59 a <sub>6</sub>
CPAA C 69	<i>H. nítida</i>	313,58 a <sub>6</sub>
CPAA C 20	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	303,31 a <sub>6</sub>
CPAA C 67	<i>H. nítida</i>	291,56 a <sub>7</sub>
CPAA C 17	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	270,56 a <sub>7</sub>
CPAA C 14	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	221,66 a <sub>8</sub>
CPAA C 15	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. rigidifolia</i>	217,52 a <sub>8</sub>
CPAA C 11	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	209,78 a <sub>8</sub>
CPAA C 77	<i>H. rigidifolia</i>	196,53 a <sub>8</sub>
CPAA C 13	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	164,92 a <sub>9</sub>
CPAA C 18	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	96,78 a <sub>10</sub>
CPAA C 64	<i>H. nítida</i>	71,26 a <sub>10</sub>
CPAA C 65	<i>H. nítida</i>	66,60 a <sub>10</sub>
CV %	8,14	
DMS 5%	65,01	

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott. Média de cinco repetições

Observou-se que dentro dos clones que apresentaram correspondência entre as plantas adultas e o jardim clonal (CBA 2, CPAA C 06, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 33, 64 e 65), estes tiveram coeficiente de correlação altamente significativo ( $r = 0,97$ ) (Figura 10), indicando a possibilidade de seleção precoce de clones de seringueira com baixo HCNp.





**Figura 10** – Correlação ( $p \leq 0,05$ ) entre o potencial cianogênico (HCNp) em  $\mu\text{g de CN}^- \text{g}^{-1}$  massa fresca determinado na folha (estádio C) de clones de copa resistentes ao mal-das-folhas mantidos em jardim clonal HCNp e na folha dos mesmos clones enxertados sobre o clone de painel CNS AM 7905.

Apesar desta alta correlação, no jardim clonal, indivíduos idênticos dentro dos clones CPAA C 01 (*H. pauciflora* x *H. guianensis* var. *marginata*) e CPAA C 81 (*H. rigidifolia*) também apresentaram grande variação do HCNp ( $478,00 \pm 140,18$  e  $437,36 \pm 169,80$ , respectivamente), levando à exclusão desses dois clones do grupo de clones avaliados na condição de jardim clonal. A hipótese de que as condições nutricionais podem influenciar na formação dos glicosídeos cianogênicos foi testada (itens 5.5.1 e 5.5.2) através de correlações entre os valores de HCNp e os teores dos macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S) e dos micronutrientes (B, Cu, Fe, Mn e Zn) nas folhas desses mesmos clones coletadas em diferentes jardins clonais.

Embora as plantas do jardim clonal se encontrem em solos homogêneos, caracterizados pela elevada acidez e baixos teores de nutrientes, típicos da Amazônia

tropical úmida (MOREIRA; FAGERIA, 2008), os diferentes jardins clonais receberam manejos distintos, o que pode ter alterado o estado nutricional das plantas. Nesse caso, além do fato acima citado, pode ainda ter havido a contribuição da variabilidade genética do porta-enxerto de base, por serem oriundos de sementes ilegítimas (cruzamentos ao acaso), podendo apresentar diferentes capacidades para absorver os nutrientes, como observado por Fochesato et al. (2006), em porta-enxerto de citros.

Além da seleção de clones de baixo HCNp, esperava-se a confirmação que clones de copa com altas concentrações de glicosídeo cianogênico nas folhas estivessem relacionados ao aparecimento do secamento do painel de sangria do tipo “Brown Bast”, supondo-se que haveria uma maior quantidade de glicosídeo cianogênico transportados da copa para o painel.

No entanto, clones como o CPAA C 11 ou CPAA C 17, que apresentam alto índice de secamento do painel (MORAES, 2000) alcançaram valores médios de HCNp (Tabelas 2 e 3). Esses resultados indicaram que o secamento do painel observado sob estas copas podem ter sido influenciados por outros fatores e não apenas ao transporte de grandes quantidades de glicosídeos cianogênicos da copa para o painel, embora sintomas extremamente similares aos do secamento do tipo “Brown Bast” tenham sido reproduzidos no caule de plantas jovens do clone de painel IPA 1 com aplicação de KCN ou linamarina, principal glicosídeo cianogênico do gênero *Hevea*, e também, em menor intensidade no clone Fx 4098 (MORAES; MORAES; CASTRO, 2001).

Copas de médio HCNp como o CPAA C 13, quando enxertadas sobre o IPA 1 também provocaram os mesmos sintomas, sendo a extrema sensibilidade do IPA 1 ao cianeto explicada pela baixa atividade da enzima desintoxicante  $\beta$ -cianoalanina sintase, que neste clone apresentou-se nos mesmos níveis de espécies não cianogênicas. (MORAES; MORAES; CASTRO, 2001). A ação desintoxicante se dá pela conversão de cianeto livre em cianoalanina catalisada pela  $\beta$ -cianoalanina sintase, convertida posteriormente, para asparagina pela  $\beta$  cianoalanina hidrolase (CASTRIC; FARNDEN; CONN, 1972).

Os valores de HCNp nas folhas maduras apresentaram grande redução em todos os clones estudados, variando de 11,54 a 82,14  $\mu\text{g}$  de  $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$ , indicando a possibilidade de transporte dos glicosídeos cianogênicos da copa para outras partes da planta. Esses resultados são semelhantes aos de Moraes, Moraes e Moreira (2002), que observaram a ocorrência de dois grupos de clones: um com grande e outro com quase ausência de redução de HCNp nas folhas maduras. Os clones resultantes de

cruzamentos com *H. brasiliensis* foram os que apresentaram quase ausência de redução, o oposto ocorreu com os clones pertencentes a outras espécies de *Hevea*, tais como verificado no presente trabalho. Kongsawadworakul et al. (2009), no estudo da cianogênese em plantas com copa própria de *H. brasiliensis* também encontraram pequena redução de HCNp nas folhas maduras.

## **6.2 HCNp na casca do tronco a diferentes distâncias do câmbio**

Os valores mais altos de HCNp foram encontrados nos 2,0 mm próximos ao câmbio (Tabela 4), tanto no clone com copa própria (IAN 6323) como nos clones enxertados de copa (combinação copa/painel PA 31/Fx 4098 e CNS G 124/ Fx 4098), indicando que os glicosídeos cianogênicos na casca do tronco estão concentrados nessa camada, confirmando a observação de que espécies cianogênicas apresentam altas concentrações desses compostos em tecidos de crescimento ativo (CONN, 1980). Verificou-se ainda, a influência da copa nos valores de HCNp na casca do clone do painel Fx 4098 sob as copas CNS G 124 e PA 31, que diferiram estatisticamente entre si (Tabela 4).

Os experimentos subseqüentes mostraram que a localização da maioria do glicosídeo cianogênico muito próximo ao câmbio não está relacionada com o simples transporte destes compostos da copa para o painel como previsto, mas, certamente relaciona-se com a alta incidência do secamento do painel de sangria como será discutido a seguir, juntamente com outras evidências do papel da cianogênese no estabelecimento desse distúrbio.

A confirmação da concentração do glicosídeo cianogênico nos 2,0 mm mais próximos ao câmbio (Tabela 4) foi fundamental na definição da utilização dessa camada como padrão nos procedimentos experimentais posteriores feitos com mensurações de HCNp na casca.

## **6.3 Gradiente longitudinal de HCNp ao longo do caule do painel sob copas enxertadas e com copa própria**

A determinação do gradiente de HCNp ao longo do tronco foi feita para a confirmação da copa como fonte principal de glicosídeos cianogênicos para o tronco, esperando-se um gradiente basípeto negativo destes compostos, com gradual diluição do ápice para a base. No entanto, os resultados mostraram aumento do HCNp do ápice para a base (gradiente basípeto positivo), atingindo valores elevados acima da união do

enxerto de base, tanto para o clone Fx 4098 sob as três copas enxertadas, PA 31, CNS G 124 e CNS G 112, como para o clone IAN 6323 com copa própria (Tabela 5).

**Tabela 4** – Potencial cianogênico (HCNp) em  $\mu\text{g}$  de  $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$  de massa fresca determinado na casca do tronco a diferentes distâncias do câmbio dos clones IAN 6323 com copa própria e Fx 4098 sob as copas CNS G 124 e CNS G 112. Amostras coletadas a 1,2 m do solo<sup>(1)</sup>. Média de três repetições.

Distância do câmbio (mm)	Clones de copa		
	IAN 6323	PA 31	CNS G 124
	----- HCNp ( $\mu\text{g}$ de $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$ massa fresca) -----		
0 – 2	93,44 aB	148,65 aA	104,82 aB
2 – 4	6,11 bA	6,47 bA	7,06 bA
4 – 6	4,44 bA	4,99 bA	3,96 bA
CV%	20,87		

<sup>(1)</sup>Letras distintas minúsculas na mesma coluna e maiúscula na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Também foi observada a influência da copa sobre o HCNp do painel, com os valores mais altos alcançados sob a copa PA 31, diferindo estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) das demais. A não ocorrência do gradiente basípeto positivo foi um indício importante de que tal influência não se deve ao transporte dos glicosídeos cianogênicos da copa para o painel.

Valores elevados de HCNp no tecido acima da união do enxerto de base também foram encontrados por Nandris et al. (2004), que interpretaram esse acúmulo como resultante de um impedimento ao transporte do glicosídeos cianogênicos através do tecido de união. No caso de fotoassimilados, o transporte através do tecido de união é livre, não havendo relatos de uma baixa taxa de crescimento radial do porta-enxerto, sendo que o oposto ocorre com frequência, resultando na formação de um calo pronunciado que separa fisicamente, em duas seções distintas, o enxerto do porta-enxerto. Essa deformação é conhecida como “pata de elefante”, devido a um rápido crescimento abaixo do tecido de união (MAY; GONÇALVES; MARTINS, 2006).

Nas combinações estudadas e no clone de copa própria, os valores de HCNp mensurados abaixo do tecido de união, ou seja, na casca do porta-enxerto, foram os mesmos ou ligeiramente acima dos apresentados na medição feita a  $\pm 3,0$  cm acima do

tecido de união, indicando a não existência de um bloqueio no transporte dos glicosídeos cianogênicos, como sugerido por Nandris et al. (2004).

**Tabela 5** – Gradiente longitudinal do potencial cianogênico (HCNp) em  $\mu\text{g}$  de  $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$  de massa fresca, ao longo do tronco do clone de painel Fx 4098 sob as copas PA 31, Fx 112 e Fx 124 (plantas de 18 anos) e ao longo do tronco do clone Fx 6323 com copa própria (plantas de 26 anos)<sup>(1)</sup>.

Altura da amostragem	Clones de copa			
	PA 31	CNS G 112	CNSG 124	IAN 6323
	----- HCNp ( $\mu\text{g}$ de $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$ massa fresca) -----			
$\pm 3$ cm acima <sup>(a)</sup>	266,38bA	254,88aAB	232,75aB	–
$\pm 3$ cm abaixo <sup>(a)</sup>	154,98cA	172,76cA	156,98bA	99,44dB
120 cm	144,16cA	100,98dB	96,90cB	125,45dAB
40 cm	172,43cA	148,67cB	118,47bcB	192,09cA
$\pm 3$ cm acima <sup>(b)</sup>	257,72bA	212,90bB	202,59aB	274,93bA
$\pm 3$ cm abaixo <sup>(b)</sup>	324,77aB	292,17aC	210,75aD	398,20aA
DMS 5% linha = 31,60				
DMS 5% coluna = 38,60				
CV % = 10,69				

<sup>(1)</sup>Letras distintas minúsculas na mesma coluna e maiúscula na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. <sup>(a)</sup>Enxerto de copa, <sup>(b)</sup>Enxerto de base.

Uma possível explicação para o aumento do HCNp na base do tronco seria a presença de compostos supridos pelas raízes dos porta-enxertos que promovessem a síntese de glicosídeos cianogênicos. Nesse caso, a valina seria o composto mais apropriado, por este aminoácido ser o substrato na síntese de linamarina (NIELSEN; MÖLLER, 1999), levando-se em conta que o transporte de N na forma de aminoácido em plantas tem sido observado em várias espécies (RENTSCH; SCHMIDT; TEGEDER, 2007).

Assim, as raízes dos porta-enxertos que fornecessem mais valina promoveriam um aumento na síntese desse glicosídeo cianogênico, podendo alcançar níveis mais elevados no tronco do clone de painel, caso a sua capacidade de síntese de linamarina excedesse à capacidade do porta-enxerto, o que consistiria numa hipótese alternativa ao bloqueio ao transporte apresentada por Nandris et al. (2004).

**Tabela 6** – Potencial cianogênico (HCNp) em  $\mu\text{g}$  de  $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$  massa fresca na casca do tronco do clone de painel CNS AM 7905 sob diferentes clones de copa. Amostras coletadas a 1,2 m do solo.

Clones	Espécie ou cruzamento	HCNp
		( $\mu\text{g}$ de $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$ massa fresca) <sup>(1)</sup>
CPAA C 17	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	445,24 a <sub>1</sub>
CPAA C 13	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	228,87 a <sub>2</sub>
CPAA C 11	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	200,39 a <sub>3</sub>
CBA 2	<i>H. pauciflora</i>	145,76 a <sub>4</sub>
CPAA C 20	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	132,13 a <sub>5</sub>
CPAA C 06	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. rigidifolia</i>	115,45 a <sub>6</sub>
CPAA C 01	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	109,09 a <sub>6</sub>
CPAA C 18	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	93,12 a <sub>7</sub>
CPAA C 65	<i>H. nítida</i>	92,75 a <sub>7</sub>
CPAA C 33	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. rigidifolia</i>	82,83 a <sub>8</sub>
CPAA C 14	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. guianensis</i> var. <i>marginata</i>	79,64 a <sub>8</sub>
CPAA C 64	<i>H. nítida</i>	78,38 a <sub>8</sub>
CPAA C 15	<i>H. pauciflora</i> x <i>H. rigidifolia</i>	77,72 a <sub>8</sub>
CV %	9,90	
DMS 5%	31,54	

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott.

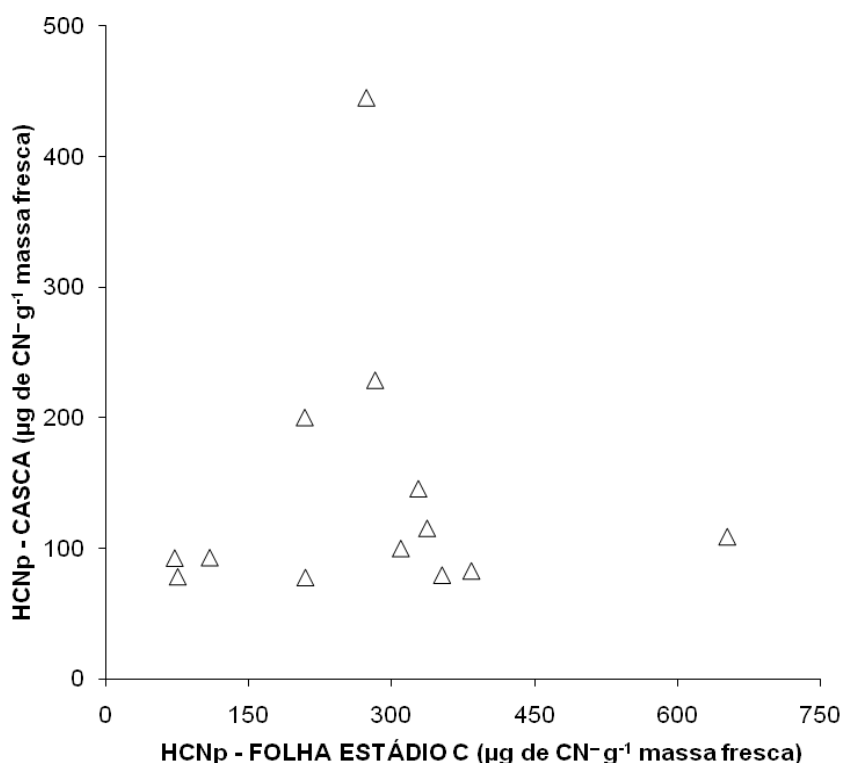
#### **6.4 Correlação entre o HCNp das folhas dos clones de copa e o HCNp da casca do painel sob essas copas**

A Tabela 6 contém os valores de HCNp nas amostras da casca do tronco do clone de painel CNS AM 7905 sob diferentes clones de copa, cujos valores de HCNp também foram determinados em amostras de folhas no estágio C (Tabela 2). A análise dos dados mostrou que a correlação entre o HCNp da copa (folhas) e o da casca do tronco não foi significativa (Figura 11).

Este resultado é um indicativo que as copas não é a principal fonte dos glicosídeos cianogênicos encontrados na casca do tronco. Em estágio inicial de desenvolvimento de plantas de seringueira (plântulas), o transporte de glicosídeos cianogênicos do endosperma da semente para os folíolos em desenvolvimento foi demonstrado em experimentos realizados por Selmar (1993).

As evidências que glicosídeos cianogênicos podem ser transportados no sentido inverso, da copa enxertada para o caule do porta-enxerto, foi relatada por Moraes, Moraes e Castro (2001) e Moraes, Moraes e Moreira (2002), que observaram incompatibilidade de plantas jovens do clone de painel IPA 1 (*H. brasiliensis*) quando enxertadas com clones de copa com alto a médio HCNp.

A incompatibilidade pode ter sido causada por quantidades não muito altas de cianeto, não só pela extrema sensibilidade do IPA 1 devido à baixa atividade da enzima desintoxicante  $\beta$ -cianoalanina sintase (MORAES; MORAES; CASTRO, 2001; MORAES; MORAES; MOREIRA, 2002), como já mencionado anteriormente, mas também, devido ao reduzido diâmetro do caule de plantas jovens, que impossibilitaria um efeito de diluição, que pode ocorrer no tronco de plantas adultas.



**Figura 11** – Correlação não significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os valores de potencial cianogênico (HCNp) em  $\mu\text{g de CN}^- \text{g}^{-1}$  massa fresca, na folha (estádio C) dos clones de copa e na casca do tronco do clone de painel CNS AM 7905 (amostras coletada a 1,2 m do solo) sob essas copas.

A ausência de correlação entre o HCNp da copa e do painel (Figura 9), não elimina a possibilidade de que em plantas adultas também ocorra o transporte dos

glicosídeos cianogênicos da copa para o tronco, porém, demonstra não ser a copa a fonte principal dos glicosídeos cianogênicos do tronco.

Os mecanismos pelo qual os clones de copas com diferentes HCNp quando enxertados sobre um mesmo clone de painel promovem variações de HCNp na casca deste permanecem não elucidados e demandam futuras pesquisas baseadas em novas hipóteses que envolvam substâncias ou sinais químicos, que quando liberados pela copa possam induzir ou inibir a síntese "in situ" de glicosídeos cianogênicos na casca do tronco.

### **6.5 Potencial cianogênico (HCNp) e estabilidade do látex**

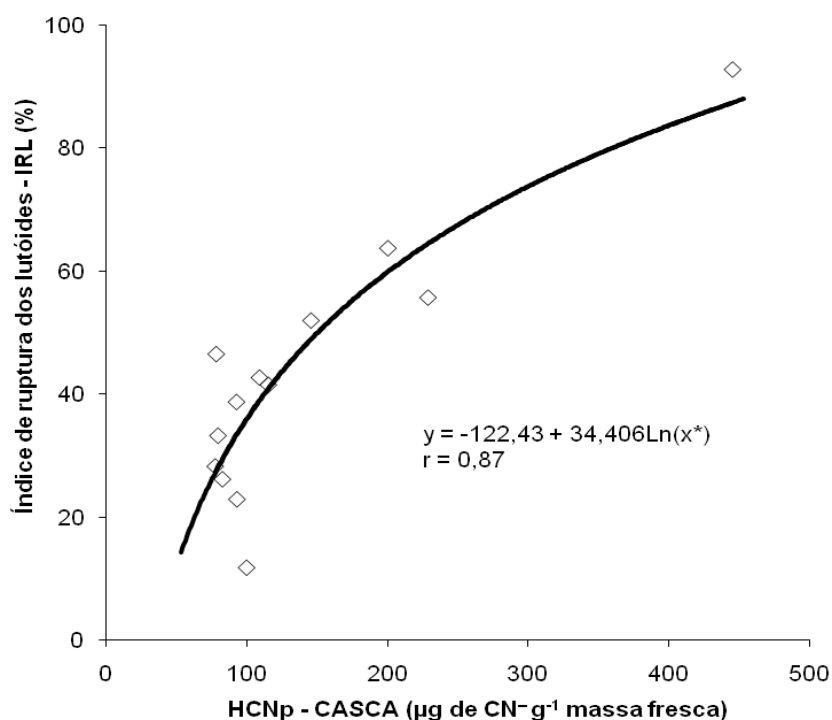
A estabilidade do látex foi medida através do Índice de Ruptura dos Lutóides (IRL), que indica a percentagem de lutóides danificados (D'AUZAC; JACOB, 1989). Os lutóides são partículas encontradas no látex e consideradas como vacúolos polidispersos, cujo conteúdo de cátions bivalentes e enzimas hidrolíticas podem desestabilizar o látex, causando gelificação, floculação e eventualmente microcoágulos (D'AUZAC; JACOB, 1989). Uma moderada dispersão do conteúdo dos lutóides é um mecanismo normal de prevenção de um fluxo excessivo de látex durante a sangria.

A correlação entre o HCNp e o Índice de Ruptura dos Lutóides (IRL) foi significativa –  $p \leq 0,05$  (Figura 12), demonstrando forte evidência de que a redução da estabilidade do látex, fator mais importante do efeito depressivo dos clones de copa sobre a produção (MORAES; MORAES, 1995), seja devida à liberação de cianeto pelo ferimento mecânico da casca durante a sangria. Essa redução da estabilidade do látex também foi obtida "in vitro" com baixas concentrações de cianeto aplicado na forma de KCN (MORAES; MORAES; CASTRO, 2001).

### **6.6 Comparações semiquantitativas da liberação de HCN da casca do caule de plantas com e sem secamento de painel**

Nas plantas de Fx 4098 com secamento total sob as três copas enxertadas (CNS G 112, CNS G 124 e PA 31), a intensidade máxima de coloração do papel Feigl Anger (padrão 5) foi atingida aos 50 ou 60 minutos após a colocação das amostras de casca esmagada (Tabelas 7, 8 e 9).





**Figura 12** – Correlação ( $p \leq 0,05$ ) entre o potencial cianogênico (HCNp) em  $\mu\text{g de CN}^- \text{g}^{-1}$  massa fresca na casca do tronco do clone de painel CNS AM 7905 enxertado com diferentes clones de copa (amostras coletada a 1,2 m do solo) e o Índice de Ruptura dos Lutóides do látex determinado nesses troncos.

Entre as plantas sem secamento (Tabelas 7, 8 e 9), apenas uma amostra da combinação copa/painel CNS G 112/Fx 4098 atingiu, aos 70 minutos, a coloração máxima. As demais plantas, sob as três copas, não desenvolveram a coloração azul marinho (Figura 7).

A maior diferença de resultados entre plantas com secamento total e sem secamento foi encontrada em amostras de casca da combinação CNS G 124/Fx 4098, com três amostras atingindo o máximo de coloração no padrão 3, uma amostra no padrão 2 e outra permanecendo no padrão 1 (Tabela 9). Os resultados evidenciaram maior atividade cianogênica nas plantas com secamento total do painel.

**Tabela 7** – Teste da liberação de HCN com papel Feigl Anger. Combinação de clones copa/painel PA 31/Fx 4098. Casca coletada a 1,2 m do solo.

Amostras	Minutos após contato com o papel Feigl Anger					
	20	40	50	60	70	80
ST1	1	3	4	5	-	-
ST2	2	4	5	-	-	-
ST3	2	4	5	-	-	-
ST4	1	3	5	-	-	-
ST5	1	2	4	5	-	-
SS1	1	2	3	4	4	-
SS2	1	2	3	3	4	4
SS3	1	2	3	4	4	-
SS4	1	2	3	3	4	4
SS5	0	1	2	3	3	-

ST - Plantas com secamento total. SS - Plantas sem secamento.

**Tabela 8** – Teste da liberação de HCN com papel Feigl Anger. Combinação de clones copa/painel CNS G 112/Fx 4098. Casca coletada a 1,2 m do solo.

Amostras	Minutos após contato com o papel Feigl Anger					
	20	40	50	60	70	80
ST1	2	4	5	-	-	-
ST2	1	3	5	-	-	-
ST3	1	3	4	5	-	-
ST4	2	4	5	-	-	-
ST5	1	3	4	5	-	-
SS1	1	2	3	4	4	-
SS2	1	2	2	3	3	-
SS3	1	2	4	4	5	-
SS4	1	2	3	4	4	-
SS5	1	2	3	4	4	-

ST - Plantas com secamento total. SS - Plantas sem secamento.

**Tabela 9** – Teste da liberação de HCN com papel Feigl Anger. CNS G 124 /Fx 4098. Casca coletada a 1,2 m do solo.

Amostras	Minutos após contato com o papel Feigl Anger					
	20	40	50	60	70	80
ST1	1	3	5	-	-	-
ST2	1	2	4	5	-	-
ST3	1	2	4	5	-	-
ST4	1	2	4	5	-	-
ST5	1	3	5	-	-	-
SS1	1	2	2	3	3	3
SS2	0	1	1	2	2	3
SS3	1	2	2	3	3	3
SS4	0	1	1	2	2	2
SS5	0	0	1	1	1	1

ST - Plantas com secamento total. SS - Plantas sem secamento.

Comparando-se os valores do HCNp nas condições com e sem secamento, observou-se diferenças estatísticas ( $p \leq 0,05$ ) sob as três copas (Tabela 10), corroborando os resultados com o teste do papel Feigl Anger. Na média geral dos valores de HCNp da casca do painel entre as três copas, pode-se observar nítida influência da copa sobre a cianogênese do painel, sendo os valores mais altos alcançados sob a copa PA 31 (Tabela 10).

A atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase (linamarase) não foi influenciada pelas combinações copa/painel (Figura 13), estando os valores dentro das faixas encontradas por Moraes, Moraes e Moreira (2002) para este mesmo clone de painel (Fx 4098) e por Kongsawadworakul et al. (2009), para os clones RRIM 600, RRIT 251, PR 107 e PB 217. Nos dois experimentos, os clones eram de *H. brasiliensis*. No caso da capacidade cianogênica – HCNc (Figura 13), esta apresentou a mesma tendência observada no HCNp (Tabela 10), haja vista, que a enzima não foi alterada pelas diferentes copas de seringueira utilizadas (PA 31, CNS G 112 e CNS G 124).

A enzima  $\beta$ -CAS também não foi influenciada significativamente ( $p \leq 0,05$ ) pelas copas, variando de 0,13 a 0,17 nmol H<sub>2</sub>S s<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>, valores semelhantes aos de Moraes, Moraes e Moreira (2002), com os clones Fx 4098 e Fx 3864 e acima dos encontrados por Kongsawadworakul et al. (2009), com o clone PB 260.

**Tabela 10** – Potencial cianogênico (HCNp) em  $\mu\text{g}$  de  $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$  de massa fresca, na casca do tronco do clone de painel Fx 4098 sob as copas PA 31, CNS G 124 e CNS G 112 nas condições com secamento e sem secamento. Amostras coletadas a 1,2 m do solo<sup>(1)</sup>.

<b>Copas</b>	<b>Com secamento</b>	<b>Sem secamento</b>	<b>Média</b>
----- HCNp ( $\mu\text{g}$ de $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$ massa fresca) -----			
PA 31	363,09 aA	144,16 aB	253,62
CNS G 112	242,15 bB	96,90 bB	196,53
CNS G 124	245,31 bA	100,98 bB	173,14
Média	283,52	114,01	
DMS 5% (coluna) = 36,79			
DMS 5% (linha) = 30,44			
CV % = 11,23			

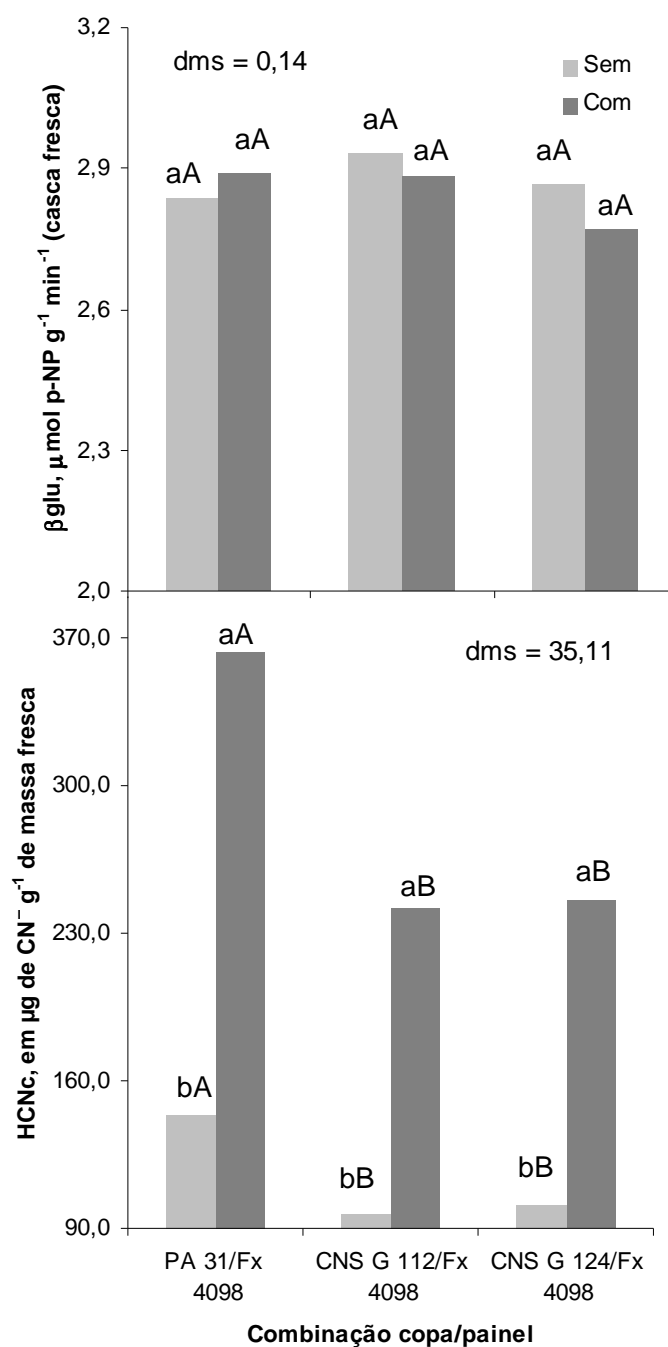
<sup>(1)</sup>Letras distintas minúsculas na mesma coluna e maiúscula na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

## **6.7 Indução de secamento do painel de sangria com KCN e linamarina**

Observou-se a ocorrência de secamento do painel de sangria dos clones de painel Fx 4098 e Fx 3899 após a aplicação da terceira dose das soluções de KCN ( $1250 \text{ mg L}^{-1}$ ) e linamarina ( $750 \text{ mg L}^{-1}$ ), indicando que a cianogênese desempenha papel importante no estabelecimento da doença.

Os valores de HCNp nas três condições estudadas: a) com secamento total do painel, b) sem secamento e c) com secamento induzido por linamarina apresentaram diferenças significativas (Tabela 11). O HCNp mais elevado nas plantas que receberam aplicação de linamarina demonstram haver a penetração do glicosídeo cianogênico nos tecidos do tronco, o que fortalece a hipótese de que os sintomas observados são devido à liberação do cianeto pela ação da enzima  $\beta$ -glicosidase.

Moraes e Moraes (2003) relatam indução de secamento de painel através de puncturas feitas com agulhas e em seguida seladas na casca do tronco dos clones de painel Fx 4098 e Fx 3899. Os autores verificaram que o ferimento causado pelas puncturas liberava HCN, sugerindo que a cianogênese pode ser a provável causa do secamento induzido, o que também explicaria os resultados de secamento do painel obtidos por Sivakumaran e Pakianathan (1983) com puncturas seladas.



**Figura 13** – Atividade da  $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ -glu) e capacidade cianogênica (HCNc) nas combinações copa/painel PA 31/Fx 4098, CNS G 112/Fx 4098 e CNS G 124/Fx 4098 nas condições com e sem secamento de painel. Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na comparação dos tratamentos com e sem secamento e maiúsculas na comparação entre as combinações diferem entre si a 5% de probabilidade.

**Tabela 11** – Potencial cianogênico (HCNp) em  $\mu\text{g}$  de  $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$  de massa fresca, na casca do tronco dos clones de painel Fx 4098 sob a copa PA 31, nas condições com secamento, sem secamento e com secamento induzido pela aplicação de linamarina. Amostras coletadas a 1,2 m do solo<sup>(1)</sup>.

Copas	Com secamento	Sem secamento	Secamento induzido	Média
----- HCNp ( $\mu\text{g}$ de $\text{CN}^- \text{g}^{-1}$ massa fresca) -----				
Fx 4098	363,09 aB	144,16 aC	605,19 aA	370,81
Fx 3899	254,59 bB	106,50 bC	485,55 bA	382,24
Média	308,84	125,36	114,01	
DMS 5% (coluna) = 33,06				
DMS 5% (linha) = 39,95				
CV % = 7,78				

<sup>(1)</sup>Letras distintas minúsculas na mesma coluna e maiúscula na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A redução da pressão de turgência dos laticíferos verificada após a aplicação das soluções de KCN e linamarina nos clones de painel testados (Tabela 12) é uma evidência adicional da confirmação do envolvimento da cianogênese no desenvolvimento do secamento do painel, anteriormente evidenciado por Moraes, Moraes e Castro (2001), no estudo de incompatibilidade de enxertia de clones de copa sobre o clone de painel IPA 1, uma vez que a invaginação de células contíguas do parênquima nos vasos laticíferos, formando os tilosóides, é um dos sintomas característicos do secamento do tipo “Brown Bast”, e a redução da pressão de turgência é condição para sua ocorrência .

O secamento do painel de sangria, conhecido como *Tapping Panel Dryness* (TPD), foi observado desde o início da introdução da seringueira no Extremo Oriente (BOBILIOFF, 1919; RANDS, 1921; KEUCHENIUS, 1924), e tem sido estudado há décadas sem que sua causa tenha sido completamente elucidada. No entanto, dois tipos principais de secamento do painel são identificados, o que ocorre pelo excesso de estímulo da produção, através da aplicação de etileno e o tipo “Brown Bast” (FAÏ, 1988; GRUHNERT; BIEHL; SELMAR, 1994; JACOB; PRÉVÔT; LACROTTE, 1994).

Em ambos os casos, o secamento é precedido pela coagulação do látex nos laticíferos, sendo que o primeiro pode ser reversível e o segundo, além de ser irreversível, está associado a uma série de alterações anatômicas e bioquímicas que

incluem a presença de tilosóides nos laticíferos e necrose do floema (FAÏ; HÉBANT, 1980; FAÏ, 1988; FAÏ; JACOB, 1989).

Inicialmente, a ocorrência do “Brown Bast” foi atribuída a uma exaustão das reservas minerais e orgânicas devido à excessiva exploração do látex (RANDS, 1921). Porém, a sua ocorrência em plantas no início da exploração enfraqueceu essa hipótese (FAÏ; JACOB, 1989).

**Tabela 12** – Pressão de turgência (bárias) dos laticíferos antes da aplicação dos tratamentos e seis dias após o início das aplicações de KCN 1.250 mg L<sup>-1</sup> e linamarina 750 mg L<sup>-1</sup>. Medições feitas no período da manhã, antes da realização das sangrias<sup>(1)</sup>.

Clones	Linamarina		
	Antes	Depois	Média
----- Pressão de turgência (bárias) -----			
Fx 3899	12,58 aA	7,78 aB	10,18
Fx 4098	11,18 bA	7,56 aB	9,37
Média	11,88	7,67	
CV %	6,26		
DMS 5%	0,82		
Clones	KCN		
	Antes	Depois	Média
----- Pressão de turgência (bárias) -----			
Fx 3899	12,38 aA	8,14 aB	10,26
Fx 4098	11,32 bA	8,14 aB	9,73
Média	11,85	8,14	
CV %	4,82		
DMS 5%	0,64		

<sup>(1)</sup>Letras distintas minúsculas na mesma coluna e maiúscula na mesma linha diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Redução da pressão com linamarina: Fx 3899: 37,8%; Fx 4098: 37,2%.

Redução da pressão com KCN: Fx 3899: 31,0%; Fx 4098: 27,8%.

Na estimulação excessiva com etileno a coagulação do látex decorre de danos aos lutóides causados por uma produção elevada de radicais livres, iniciando com a produção de superóxidos pela NAD(P)H oxidase localizada na membrana dos lutóides (CHRESTIN, 1984), já no secamento do tipo “Brown Bast”, o aparecimento deste

sintoma ainda não está esclarecido, sendo que os resultados obtidos sugerem a cianogênese como a principal causa não somente da redução da estabilidade do látex e conseqüente coagulação, mas, também, de promover a redução da pressão de turgência, o que leva à formação dos tilosídeos.

No látex foi observada a presença de  $\beta$ -glicosidase compartimentalizada nos lutóides (PURJANISCLE, 1966; SUNDERASAN; WARD; YEANG, 2002), mas, total ausência de glicosídeos cianogênicos (LIEBEREI, 1986). O rompimento das células pelo corte produzido na casca pela ocasião da sangria libera o conteúdo de glicosídeos cianogênicos isolado nos vacúolos das células do parênquima (LIEBEREI, 1986), permitindo o seu contato com a  $\beta$ -glicosidase presente no apoplasto, resultando na produção de HCN. Possivelmente, grande parte do HCN deve ser volatilizada, mas, certamente, uma parte deve ser retida e rapidamente transportada para os laticíferos, reduzindo a estabilidade do látex e para as células do floema, ocasionando a necrose.

Nas células do floema, o efeito tóxico do cianeto liberado, causando a sua necrose, foi considerado por Nandris et al. (2004), Sookmark et al. (2004) e Pellegrini et al. (2006). Esses autores relatam a ocorrência de plantas, com os sintomas idênticos aos do “Brown Bast”, porém denominado pelos mesmos, de “Bark Necrosis”, que apresentavam valores elevados de HCNp na base do tronco, próximo ao tecido de união do enxerto de base, e também a necrose do floema, que se espalhava para cima, em direção do painel de sangria.

Nandris et al. (2004) observaram que plantas, quando ainda estavam na fase inicial do estabelecimento da doença, podiam reverter os sintomas pela aplicação de hipoclorito de sódio (NaClO). Para esses autores, este fato é mais um indício do envolvimento da cianogênese no secamento do painel, e explicam que a cloração promove a oxidação parcial do cianeto para cianato ou total para dióxido de carbono e nitrogênio, impedindo sua ação tóxica.

Os resultados sugerem fortemente o envolvimento da cianogênese no estabelecimento do secamento do painel de sangria do tipo “Brown Bast”, no entanto, o modelo proposto inicialmente de que as copas de alto HCNp são a fonte de altos HCNp encontrados no tronco de algumas combinações copa/painel, não foi confirmado, inviabilizando, em parte, a utilização do HCNp nas folhas dos clones de copa como critério de seleção destes.



## 6.8 Estado nutricional na cianogênese em plantas de jardim clonal de clones de copa de seringueira

Os nutrientes analisados nas folhas jovens (estádio C) dos clones CPAA C 01 e CPAA C 81, tiveram grande variação das amostras – mínimo e máximo (Tabela 13), com teores distintos dos considerados adequados por Shorrocks (1965b), Boardman et al. (1997) e Malavolta, Vitti e Oliveira (1997) para *Hevea brasiliensis*. Essas diferenças, possivelmente, se devam aos estádios de desenvolvimento das folhas analisadas e das usadas como referência, grau de mobilidade dos nutrientes, além das características distintas (tamanho de folha, ausência de senescência, etc.) das espécies de *Hevea* estudadas (CPAA C 01 - *Hevea pauciflora* x *Hevea. guianensis* var. *marginata* e CPAA C 81 - *Hevea rigidifolia*).

**Tabela 13** – Estatística descritiva dos teores foliares de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn e as correlações com o HCNp das folhas - clones CPAA C 01 e CPAA C 81. n = 23

Variavel	N	P	K	Ca	Mg	S
----- g kg <sup>-1</sup> -----						
Média	44,6	4,7	25,7	1,4	2,5	2,0
Mediana	45,2	5,0	25,2	1,4	2,7	2,1
Mínimo	28,5	5,2	19,6	1,1	1,6	1,6
Máximo	60,5	5,5	31,0	1,8	3,1	2,6
Desvio padrão	9,1	0,9	4,0	0,3	0,5	0,4
CV (%)	20,3	18,5	15,6	18,5	21,8	15,2
HCNp	*	NS	NS	NS	NS	NS
Teores <sup>(1)</sup>	26,0 – 35,0	1,6 – 2,3	10,0 – 14,0	7,6 – 8,2	1,7 – 2,4	1,8 – 2,6
	B	Cu	Fe	Mn	Zn	
----- mg kg <sup>-1</sup> -----						
Média	22,9	10,9	103,9	43,1	70,0	
Mediana	23,9	9,9	106,6	40,3	77,0	
Mínimo	14,5	7,0	78,3	21,7	21,0	
Máximo	30,5	14,5	128,3	86,9	122,0	
Desvio padrão	5,2	2,9	18,3	16,0	31,7	
CV (%)	22,8	26,4	17,6	37,1	45,3	
HCNp	NS	NS	NS	*	NS	
Teores <sup>(1)</sup>	20 – 70	10 – 15	70 – 90	15 – 40	20 – 30	

\* e <sup>NS</sup> Significativo e não significativo a 5% de probabilidade.

<sup>(1)</sup>Teores adequados por Shorrocks (1965b), Boardman et al. (1997) e Malavolta et al. (1997) – *H. brasiliensis*.

Independente da folha amostrada, os problemas de usar os níveis considerados adequados dos nutrientes para *H. brasiliensis* no estudo de clones de enxertia de copa já tinham sido relatados por Moraes e Moraes (2008). Segundo esses autores, não existem faixas adequadas dos nutrientes para essas espécies e para esses cruzamentos de clone de copa utilizados. Estudos de calibração para esses materiais são necessários para definir o nível crítico adequado dos nutrientes, a fim de se obter o máximo potencial de crescimento e de produção de borracha.

No caso do HCNp, a correlação significativa observada entre o teor de N na folha e o potencial cianogênico (Figura 14) também foi encontrada por Gleadow e Woodrow (2000) em estudos com eucalipto (*Eucalyptus cladocalyx* F. Muell.), porém, esse resultado não é regra geral, haja vista, que trabalhos realizados com mandioca por Cardoso Júnior et al. (2005) e Talatala e Loreto (2008), não encontraram interações entre essas duas variáveis.

Busk e Möller (2002) estudaram o efeito da adubação nitrogenada na síntese da durrina bem como na atividade dos citocromos P-450 em mudas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) e constataram o aumento da atividade das enzimas acompanhado pelo aumento do conteúdo de durrina na presença de  $\text{KNO}_3$  a partir da dose de 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ . Segundo esses autores, a formação de aglicona a partir de L-tirosina catalisada pela ação dos citocromos P-450 mostra ser o fator limitante nesse processo de biossíntese.

Nielsen e Möller (1999) e Andersen et al., (2000) mostraram que a reação de conversão dos aminoácidos L-valina e L-isoleucina em aglicona (passo inicial da biossíntese dos dois glicosídeos cianogênicos da mandioca, linamarina e lotaustralina) são catalisadas por citocromos P-450, sendo esses os mesmos glicosídeos encontrados no gênero *Hevea* por Liberei (2007). Processo semelhante também foi observado em sorgo, com o envolvimento dos citocromos P-450 na formação do glicosídeo cianogênico durrina, a partir do aminoácido L-tirosina (SIBBESEN et al., 1995; BUSK; MÖLLER, 2002).

Também foi observada correlação ( $p \leq 0,05$ ) do HCNp com o Mn (Figura 14). O Mn pode estar atuando na fase inicial da biossíntese dos glicosídeos cianogênicos, que é catalisada por citocromos multifuncionais, enzimas que estão ligadas à membrana e são denominadas de citocromos P-450, cujo aumento da concentração foi observado

em plantas superiores na presença de Mn (REICHARDT et al., 1979; REICHHART et al., 1980).

Plantas que se multiplicam por enxertia, como a seringueira, os mecanismos de tolerância a Mn são localizados nos ramos e governados pela interação porta-enxerto x enxerto de genótipos tolerantes e não tolerantes, sendo o genótipo do enxerto quem determina a tolerância da planta a altas concentrações desse nutriente no substrato e nas folhas (MARSCHNER, 1995). A julgar pelas caracterizações visuais dos efeitos tóxicos do Mn descritas por Foy (1976), as concentrações ( $43,1 \pm 16,0$  mg de Mn  $\text{kg}^{-1}$ ) encontradas nas plantas de seringueira no jardim clonal não determinaram sintomas de toxidez ou de deficiência indicadas por Shorrocks (1964).

### 6.9 Interações entre N, Mn e teor de clorofila com o HCNp nas mudas de seringueira

As interações entre as doses de N e Mn com os teores foliares, clorofila e HCNp são mostradas na Tabela 14 e na Figura 15. A análise de variância demonstra significância nos teores de N, Mn e HCNp nas folhas jovens com aumento dos teores de N em função das doses de N, o mesmo foi observado com os teores de Mn, havendo neste caso, interação entre esses dois tratamentos (Tabela 14). Com relação à clorofila, também houve influência no teor em razão das doses de Mn e da interação N e Mn. No caso do HCNp, as interações verificadas com as doses de N e Mn estão de acordo com os resultados observados no jardim clonal com os clones de copa de (*H. pauciflora* x *H. guianensis* var. *marginata*) (CPAA C 01) e (*H. rigidifolia*) CPAA C 81 (Figura 15).

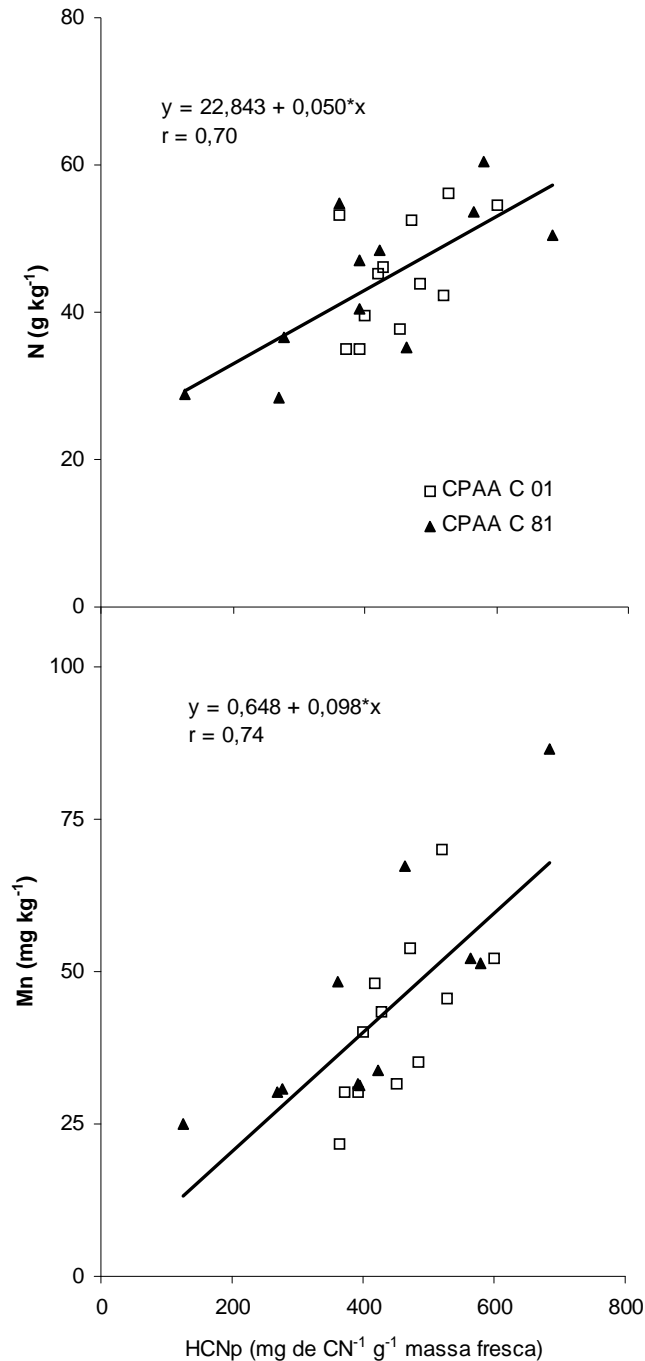
**Tabela 14** – Esquema de análise variância e valores do teste F sobre o efeito da aplicação de nitrogênio e manganês sobre os teores de N, Mn, clorofila e HCNp nas folhas jovens de mudas de seringueira<sup>(1)</sup>.

Variável	Grau de liberdade	N	Mn	Clorofila	HCNp
Nitrogênio (a)	1	7,93*	20,74**	0,91 <sup>NS</sup>	41,77**
Manganês (b)	3	2,49 <sup>NS</sup>	22,82**	23,38**	51,35**
a x b	3	4,69*	3,62*	4,21*	5,45*

\*\* e <sup>NS</sup> Significativo a 1% e 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente.

Esses resultados indicam que, independente da espécie, os tecidos capazes de sintetizar glicosídeos cianogênicos sofrem influência dos teores de N e Mn. Assim, os excessos desses elementos podem levar a um aumento de sua síntese também na

casca do tronco, no qual, como citado anteriormente, altas concentrações de glicosídeos cianogênicos podem predispor as plantas ao secamento de painel (NANDRIS et al., 2004; PEYRARD et al., 2006) e causar efeito depressivo da produção das copas enxertadas (MORAES; MORAES; MOREIRA, 2002).



**Figura 14** – Correlações ( $p \geq 0,05$ ) entre o HCNp nas folhas jovens dos clones CPAA C 01 e CPAA C 81 com os teores de N e Mn no tecido vegetal.

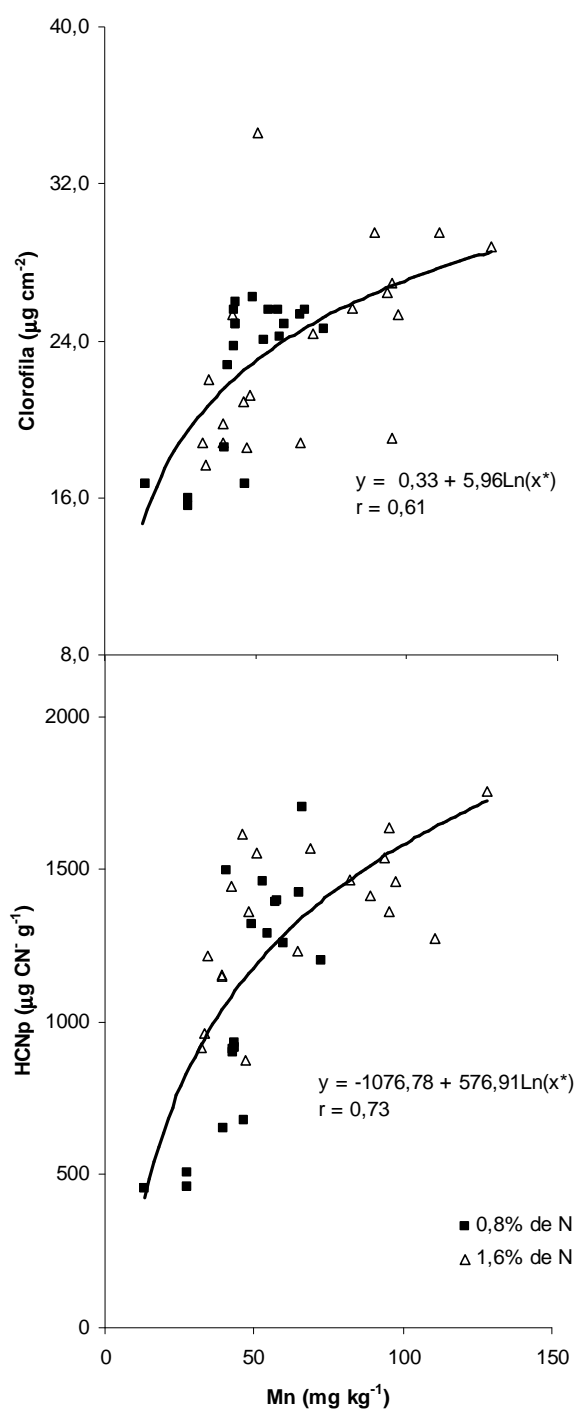
Dentro das doses de N, os teores de N, P, K, Cu e Mn (0,8% de N) e Mn (1,6% de N) apresentaram correlações significativas ( $p \leq 0,05$ ) com o HCNp (Tabela 15), o que está de acordo com as observações de Miller e Conn (1980), haja vista, que esses nutrientes participam de forma direta ou indireta em reações bioquímicas que atuam na síntese do glicosídeo cianogênico.

Os teores de HCNp nas plantas do viveiro apresentaram correlação significativa com os teores de N e Mn nas folhas diagnóstico [ $\hat{y} = 21,465 + 0,006x$ ,  $r = 0,54$  e  $\hat{y} = 19,025 + 0,076x$ ,  $r = 0,61$  ( $p \leq 0,05$ )]. Os demais nutrientes analisados, como verificados no jardim clonal, também não apresentaram interações com o potencial cianogênico das plantas. Deve se salientar, que tais resultados indicam a possibilidade de uso dos teores de N e Mn da folha diagnóstico no monitoramento do HCNp, fato esse, que pode contribuir nos trabalhos futuros sobre secamento de painel e na incompatibilidade de combinações de clones nos estudos de enxertia de copa.

**Tabela 15** – Valores de F entre as correlações do HCNp com o teor de nutrientes nas folhas novas de mudas de seringueira cultivadas nas condições de viveiro<sup>(1)</sup>.

Nutrientes	Doses de N (%)	
	0,8	1,6
N	(+)13,459**	(+)0,025 <sup>NS</sup>
P	(+)8,461**	(-)0,008 <sup>NS</sup>
K	(+)6,462*	(-)1,474 <sup>NS</sup>
Ca	(-)3,641 <sup>NS</sup>	(+)2,661 <sup>NS</sup>
Mg	(+)1,010 <sup>NS</sup>	(+)0,002 <sup>NS</sup>
S	(+)1,799 <sup>NS</sup>	(+)1,500 <sup>NS</sup>
B	(-)0,333 <sup>NS</sup>	(-)1,679 <sup>NS</sup>
Cu	(+)4,911*	(-)0,245 <sup>NS</sup>
Fe	(+)3,357 <sup>NS</sup>	(+)0,012 <sup>NS</sup>
Mn	(+)32,170**	(+)10,308**
Zn	(+)1,131 <sup>NS</sup>	(+)0,006 <sup>NS</sup>

(1)\*\*, \* e <sup>NS</sup> significativo a 1% e 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente. Entre parênteses a tendência de inclinação da reta.



**Figura 15** – Correlações entre os teores de Mn com os teores de clorofila e HCNp nas folhas novas de seringueira (*H. brasiliensis*) dentro das doses de N. \*significativo a 5% de probabilidade.

Exceto os clones de *Hevea rigidifolia* (copa CPAAC 72 e CPAAC 79) do jardim clonal, as mudas de *Hevea brasiliensis* usadas no experimento em condições de viveiro, apresentaram, na média, os maiores teores de HCNp nas folhas no estágio C antes do

início do experimento ( $\text{HCNp} = 719,22 \pm 130,26 \mu\text{g de CN}^- \text{g}^{-1}$ ) e 60 dias após a aplicação das doses de N e Mn (0,8% de N =  $1063,05 \pm 380,61 \mu\text{g de CN}^- \text{g}^{-1}$  e 1,6% de N =  $1347,23 \pm 247,15 \mu\text{g de CN}^- \text{g}^{-1}$ ) do que os clones de *Hevea pauciflora*, *Hevea nítida* e dos cruzamentos de *H. pauciflora* x *H. guianensis* do jardim clonal (Tabela 3 e Figura 16). Esse resultado demonstra a impossibilidade de extrapolar os teores de HCNp obtidos em uma espécie para outra de *Hevea*, havendo, neste caso, a necessidade de estudos de curva de calibração para cada espécie.

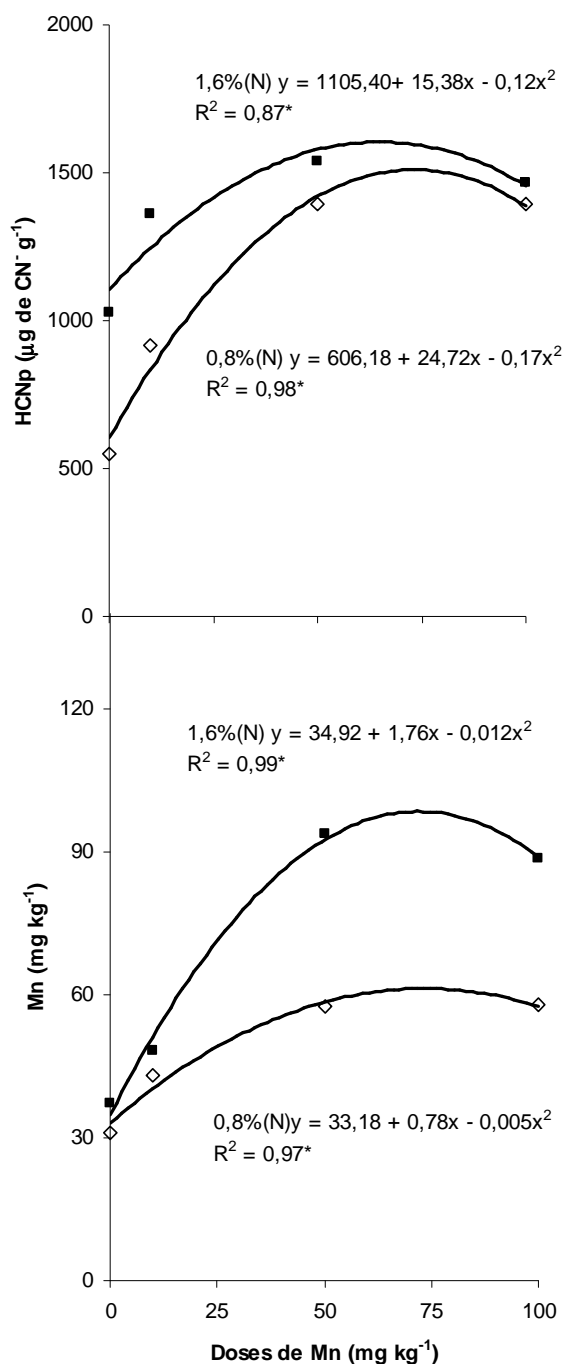
### **6.10 Avaliação do estado nutricional (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn) e teor de clorofila em função das doses de N e Mn em mudas de seringueira (folhas novas e diagnóstico)**

Na dose 0,8% de N, a aplicação de Mn influenciou ( $p \leq 0,05$ ) os teores de N, P, K, Ca, S, Cu, Fe e Mn, enquanto na dose 1,6% de N, somente o teor de Mn apresentou significância (Tabelas 16 e 17). De acordo com a caracterização feita por Shorrocks (1964), não foram observados sintomas visuais de deficiência ou toxidez de N ou Mn nas plantas de seringueira. O Mn é um nutriente essencial (HUMPHRIES et al., 2007), participando como constituinte ou ativador enzimático, porém, sua absorção pode ser influenciada pela competição interiônica com Ca, Mg, Cu, Fe e Zn (CLARKSON, 1988) ou por problemas nos processos metabólicos, como a fotossíntese, respiração e a síntese de proteínas (CAMPBELL; NABLE, 1988; MARSCHNER, 1995; MALAVOLTA, 2006; FAGERIA, 2009).

Um provável motivo da ausência de significância das doses de Mn dentro da dose 1,6% de N se deve ao alto teor de matéria orgânica do solo ( $52,47 \text{ g kg}^{-1}$ ) utilizado no experimento. A aplicação de altas concentrações de N na forma de uréia deve ter aumentado mineralização da MOS e diminuído o pH do solo com incremento na disponibilidade de alguns nutrientes para as plantas, em especial os micronutrientes. Segundo Malavolta (2006), a disponibilidade da maioria dos nutrientes está diretamente relacionado com o pH do solo.

Na folha diagnóstico das mudas de *H. brasiliensis*, independente dos tratamentos, apresentou os seguintes teores: N =  $28,73 \pm 3,88 \text{ g kg}^{-1}$ , P =  $1,76 \pm 0,29 \text{ g kg}^{-1}$ , K =  $6,99 \pm 0,98 \text{ g kg}^{-1}$ , Ca =  $7,80 \pm 1,98 \text{ g kg}^{-1}$ , Mg =  $2,28 \pm 0,42 \text{ g kg}^{-1}$ , S =  $1,87 \pm 0,53 \text{ g kg}^{-1}$ , B =  $48,85 \pm 10,06 \text{ mg kg}^{-1}$ , Cu =  $18,34 \pm 5,27 \text{ mg kg}^{-1}$ , Fe =  $80,60 \pm 34,10 \text{ mg kg}^{-1}$ , Mn =  $104,56 \pm 40,59 \text{ mg kg}^{-1}$  -  $\hat{y} = 49,821 + 0,619x$ ,  $R^2 = 0,47$  ( $p \leq 0,05$ ), Zn =  $23,10 \pm 6,53 \text{ mg kg}^{-1}$  e clorofila =  $150,84 \pm 41,45 \mu\text{g cm}^{-2}$ . Exceto o teor de clorofila, cuja faixa adequada

ainda não foi definida para a seringueira, os teores foliares de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn, obtidos nas doses de N e Mn, ficaram próximos ou dentro das faixas consideradas adequadas por Shorrocks (1965b) e Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), para plantas adultas, e por Moreira, Moraes e Castro (2006), exceto o Mn, em mudas cultivadas em viveiro nas mesmas condições edafoclimáticas.



**Figura 16** – Efeito das doses de Mn nas duas doses de N (0,8 e 1,6%) sobre o teor de HCNp e Mn nas folhas novas de seringueira (*H. brasiliensis*). \*significativo a 5% de probabilidade.



No Estado do Amazonas (local do experimento), os solos são caracterizados pela acidez elevada, baixa fertilidade e altos teores de Al trocável (MOREIRA; FAGERIA, 2009). A fim de verificar o seu efeito sobre o desenvolvimento da cultura, Bueno et al. (1989) realizaram um experimento em solução nutritiva avaliando a influencia do alumínio sobre a concentração e o acúmulo de Mn em seringueira (*Hevea brasiliensis*), e verificaram que o Al aumenta a concentração de Mn independente da dose, enquanto o acúmulo desse micronutrientes é afetado a partir de 20 mg kg<sup>-1</sup> de Al na solução.

**Tabela 16** – Efeito das doses de Mn dentro das doses de N sobre o teor de macronutrientes na folhas novas de seringueira<sup>(1)</sup>.

Doses		N	P	K	Ca	Mg	S
N (%)	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	----- g kg <sup>-1</sup> -----					
0,8	0	32,65	3,94	14,64	3,67	2,47	2,29
	10	37,74	4,18	14,33	3,12	3,02	2,07
	50	40,79	5,12	17,20	3,82	2,71	2,53
	100	39,79	4,91	16,11	2,15	2,65	2,84
$\beta_0$		35,44	4,13	14,77	3,66	2,74	2,26
$\beta_1$		0,058	0,010	0,020	-0,012	-0,001	0,007
$R^2$		0,269*	0,290*	0,263*	0,342*	0,004 <sup>NS</sup>	0,24*
1,6	0	44,78	4,83	17,96	2,43	3,00	2,01
	10	36,85	4,15	16,26	2,74	2,76	2,23
	50	40,16	4,37	15,18	4,88	3,12	2,27
	100	45,16	4,83	15,35	3,23	2,93	2,68
$\beta_0$		40,35	4,44	17,05	2,91	2,93	2,06
$\beta_1$		0,035	0,003	-0,022	0,010	0,001	0,006
$R^2$		0,053 <sup>NS</sup>	0,023 <sup>NS</sup>	0,189 <sup>NS</sup>	0,130 <sup>NS</sup>	0,002 <sup>NS</sup>	0,161 <sup>NS</sup>

<sup>(1)</sup>\* e <sup>NS</sup> significativo e não significativo a 5% de probabilidade, respectivamente.

Porém, os resultados obtidos por Bueno et al. (1989) com *H. brasiliensis* não podem ser extrapolados para as outras espécies de *Hevea*, haja vista, que em Belém (PA), tem se verificado que híbridos de *H. pauciflora* são sensíveis à deficiência de Mn (VIÉGAS; CARVALHO; FRAZÃO, 2000). A concentração média de Mn nas folhas deficientes de *H. pauciflora* foi de 21 mg kg<sup>-1</sup>, teor abaixo do encontrado na testemunha com 0,8% de N (Tabela 17). Segundo Viégas, Carvalho e Frazão (2000), na Amazônia, os teores médios de Mn em folhas normais de plantas em produção ou em crescimento

foram de 68,0 mg kg<sup>-1</sup> a 311,5 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto para Moreira, Moraes e Castro (2006) foram de 193,0 mg kg<sup>-1</sup> a 240,0 mg kg<sup>-1</sup> em mudas de seringueira na fase de viveiro.

**Tabela 17** – Efeito das doses de Mn dentro das doses de N sobre o teor de micronutrientes na folhas novas de seringueira<sup>(1)</sup>.

N (%)	Doses	B	Cu	Fe	Mn	Zn
	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	----- mg kg <sup>-1</sup> -----				
0,8	0	39,74	9,95	53,06	31,11	49,08
	10	49,25	10,24	38,21	43,20	50,17
	50	47,32	12,94	52,34	57,44	59,10
	100	32,48	12,36	79,04	57,82	54,31
$\beta_0$		46,36	10,31	42,78	37,69	50,71
$\beta_1$		-0,104	0,027	0,322	0,243	0,061
R <sup>2</sup>		0,095 <sup>NS</sup>	0,214*	0,401**	0,474**	0,074 <sup>NS</sup>
1,6	0	39,81	18,82	124,42	37,23	50,19
	10	40,71	11,29	100,39	48,11	57,24
	50	36,02	14,35	118,59	93,64	53,71
	100	31,16	16,06	73,27	88,71	60,04
$\beta_0$		40,75	15,030	119,69	45,46	52,62
$\beta_1$		-0,096	0,003	-0,388	0,537	0,067
R <sup>2</sup>		0,132 <sup>NS</sup>	0,001 <sup>NS</sup>	0,078 <sup>NS</sup>	0,568**	0,055 <sup>NS</sup>

<sup>(1)</sup>\* e <sup>NS</sup> significativo e não significativo a 5% de probabilidade, respectivamente.

## 7 CONCLUSÕES

O potencial cianogênico (HCNp) apresenta ampla faixa de variação dentro das espécies estudadas como clones de copa, com os valores mais baixos obtidos com os clones de *Hevea nítida* e os mais altos com os de *H. rigidifolia*. Porém, a ocorrência de indivíduos de *H. nítida* com valores médios de HCNp e *H. rigidifolia* com valores baixos indicam que essa característica ainda não se encontra bem definida dentro das espécies de *Hevea*.

As copas enxertadas exercem influência sobre o potencial cianogênico (HCNp) da casca do tronco dos clones de painel. No entanto, a ausência de correspondência entre os HCNps das folhas dos clones de copa e o da casca do tronco invalida a utilização do HCNp da copa como critério de seleção destas. Futuras pesquisas são necessárias para identificar o mecanismo do efeito das copas enxertadas sobre o HCNp do painel.

Clones de painel que apresentam valores elevados de HCNp na casca do tronco sob certos clones de copa apresentam látex com alto valores de Índice de Ruptura dos Lutóides (IRL), resultando em baixa produção, devido a uma curta duração do escoamento do látex durante a sangria. Esse fato explica o efeito depressivo das copas enxertadas, encontrado em muitas combinações copa/painel.

A liberação de HCN nos tecidos do tronco causa a redução da estabilidade do látex, resultando na coagulação deste nos laticíferos, iniciando o desenvolvimento de um dos tipos de secamento do painel de sangria denominado “Brown Bast”.

As atividades das enzimas  $\beta$ -glicosidase (linamarase) e  $\beta$ -cianoalanina sintase ( $\beta$ -CAS) não foram influenciadas pelas combinações copa/painel, estando a capacidade cianogênica (HCNc) diretamente relacionada ao potencial cianogênico (HCNp) das cascas das plantas.

Na seringueira, independente da idade e da espécie de *Hevea*, os teores foliares de nitrogênio (N), manganês (Mn) e clorofila apresentam correlação positiva com o HCNp das folhas novas e diagnóstico, podendo os mesmos ser utilizados em futuros processos de seleção.

Em baixas concentrações de N (0,8%), o Mn influencia a absorção de nitrogênio, potássio, fósforo, cálcio, enxofre, ferro e manganês pelas plantas de seringueira (*Hevea brasiliensis*), na fase de viveiro.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, M.D.; BUSK, P.K.; SVEBDSEN, I.; MOLLER, B.L. Cytochromes P-450 from cassava (*Manihot sculenta* Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.275, p.19966-19975, 2000.
- BAHIA, D.B.; SENA-GOMES, A.R. Painel versus copa em alguns clones de seringueira (*Hevea* spp.). **Revista Theobroma**, Itabuna, v.11, p.203-228, 1981.
- BI, T.T.; OMONT, H. Étude des sols de parcelles d'hévéa en basse Côte-d'Ivoire. **Révue Générale des Caoutchoucs et Plastiques**, Paris, v.64, p.111-116, 1987.
- BLUMENTHAL, S.G.; HENDRICKSON, H.R.; ABROL, Y.P.; CONN, E.E. Cyanide metabolism in higher plants. III. The biosynthesis of  $\beta$ -cyanoalanine. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.243, p.5302-5307, 1968.
- BOBILIOFF, W. The causes of Brown Bast disease of *Hevea Brasiliensis*. **Archief von de Rubbercultuur in Nederlandsch Indië**, Djakarta, v. 3, p.172-178, 1919.
- BOARDMAN, M.J.; LAMBERT, M.J.; WEBB, M.; CROMER, R.N. Forest plantations. In: REUTER, D.J.; ROBINSON, J.B. (Ed.). **Plant analysis; an interpretation manual**. Collingwood: CSIRO, 1997. 503-566.
- BROWN, K.; ROSENDO, S. Environmentalists, rubber tappers and empowerment: the politics and economics of extractive reserves. **Development and Change**, The Hague, v.31, p.201-237, 2000.
- BUENO, N.; HAAG, H.P.; PEREIRA, J.P.; VIÉGAS, I.J.M. Nutrição mineral de seringueira (*Hevea* spp). X. Quantidade de Al no substrato afetando a concentração e o acúmulo de Fe, Mn e Zn. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, v.46, p.275-293, 1989
- BUSK, P.K.; MÖLLER, B.L. Dhurrin synthesis in sorghum is regulated at the transcriptional level and induced by nitrogen fertilization in older plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, p.1222-1231, 2002.
- CAMPBELL, L.C.; NABLE, R.O. Physiological functions of manganese in plants. In: GHAMAM, R.D.; HANNAM, R.J.; UREN, N.C. (Ed.). **Manganese in soils and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1988. p.139-154.
- CARDOSO JÚNIOR, N.S.; VIANA, A.E.S.; MATSUMOTO, S.N.; SEDIYAMA, T.; AMARAL, C.L.F.; VIEIRA, A.J.P.; RAMOS, P.A.S. Efeito do nitrogênio sobre o teor de ácido cianídrico em plantas de mandioca. **Acta Scientiarum. Agronomia**, Maringá, v.27, p.603-610, 2005.

CASTRIC, P.A.; FARNDEN, K.J.F.; CONN, E.E. Cyanide metabolism in higher plants. V. The formation of asparagine from  $\beta$ -cyanoalanine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.152, p.62-69, 1972.

CHRESTIN, H. Biochemical basis of bark dryness. In: COLLOQUE PHYSIOLOGIE-EXPLOITATION DE L'*HEVEA*, 1984, Montpellier, France. **Compte Rendu...** Montpellier: IRRDB; CIRAD, 1984. p.273-293.

CLARKSON, D.T. The uptake and translocation of manganese by roots. In: GHAMAM, R.D.; HANNAM, R.J.; UREN, N.C. (Ed.). **Manganese in soils and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1988. p.101-111.

COMPAGNON, P.; TIXIER, P.; ROUJANSKI, G. Contribution a l'étude des accidents physiologiques de saignée. **Archief von de Rubbercultuur in Nederlandsch Indië**, Djakarta, n. especial, p.54-69, 1953.

CONN, E.E. Cyanogenic compounds. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.31, p.433-451, 1980.

D'AUZAC, J. Factors involved in the stopping of flow after tapping. In: D'AUZAC, J. JACOB, J.L.; CHRESTIN, H. (Ed.). **Physiology of rubber tree latex**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.257-280.

D'AUZAC, J.; JACOB, J.L. The composition of latex from *Hevea brasiliensis* as a laticiferous cytoplasm. In: D'AUZAC, J.; JACOB, J.L.; CHRESTIN, H. (Ed.). **Physiology of rubber tree latex**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.59-96.

DUNHAM, R.J.; SILVA, E.R.; SANTOS, A.G. Relatório preliminar sobre o desenvolvimento da enxertia de copa da *Hevea brasiliensis* na Fazenda Três Pancadas. In: SEMINÁRIO SOBRE ENXERTIA DE COPA DE SERINGUEIRA, 1., 1981, Brasília. **Anais...** Brasília: SUDHEVEA, 1982. p.92-134.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análises de solo**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1997. 212p.

FAGERIA, N.K. **Use of nutrients in crop plants**. New York: CRC Press, 2009. 430p.

FAÏ, E. Ethylene stimulation of *Hevea*, bark dryness and brown blast. **Journal of Natural Rubber Research**, Kuala Lumpur, v.3, p.201-209, 1988.

FAÏ, E.; HÉBANT, C. Étude histologique des écorces d'*Hevea brasiliensis* atteint de la maladie des encoches sèches. **Compte Rendu a l'Academie de Sciences de Paris. Serie D. Sciences Naturelles**, Paris, v.291, p.865-868, 1980.

FAÏ, E.; JACOB, J.L. Anatomical organization of the laticiferous system in the bark. In: D'AUZAC, J.; JACOB, J.L.; CHRESTIN, H. (Ed.). **Physiology rubber tree latex**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p.15-30.

FLOSS, H.G.; HADWIGER, L.; CONN, E.E. Enzymatic formation of  $\beta$ -cyanoalanine from cyanide. **Nature**, London, v.208, p.1207-1208, 1965.

FOCHESATO, M.L.; SOUZA, P.V.D.; SCHÄFER, G.; MACIEL, H.S. Produção de mudas cítricas em diferentes porta-enxertos e substratos comerciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, p.1397-1403, 2006.

FOY, C.D. Differential aluminum and manganese tolerance of plant species and varieties in acid soils. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.28, p.150-155, 1976.

GASPAROTTO, L.; ARAUJO, A.E.; LIMA, M.I.P.M.; SANTOS, A.F. Surto do mal-das-folhas (*Microcyclus ulei*) em seringal com copa do clone IAN 6158. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, p.192-192, 1992.

GASPAROTTO, L.; JUNQUEIRA, N.T.V. Ecophysiological variability of *Microcyclus ulei*, casual agent of rubber tree leaf blight. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.505-511, 1994.

GASPAROTTO, L.; SANTOS, A.F.; PEREIRA J.C.R.; FERREIRA, F.A. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação e Produção, 1997. 168p.

GLEADOW, R.M.; WOODROW, I.E. Temporal and spatial variation in cyanogenic glycosides in *Eucalyptus cladocalyx*. **Tree Physiology**, Victoria, v.20, p.591-598, 2000.

GOLDTHORP, C.C.; TAN, I.I. A review of environmental issues in natural rubber production. **The Planter**, Tokyo, v.72, p.123-128, 1996.

GOMEZ, J.B. **Physiology of latex (rubber) production**. Kuala Lumpur: Malaysian Rubber Research and Development Board, 1983. 115p.

GOMEZ, J.B.; YIP, E. Stability of fresh *Hevea* latex in relation to vessel plugging. In: INTERNATIONAL RUBBER CONFERENCE, 1975, Kuala Lumpur. **Proceedings...** Kuala Lumpur: Rubber Research Institute of Malaysia, 1975. p.68-80.

GONÇALVES, P.S.; BATAGLIA, O.C.; ORTOLANI, A.A.; FONSECA, F.S. **Manual de heveicultura para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2001. 78p.

GRUHNERT, C.; BIEHL, B.; SELMAR, D. Compartmentation of cyanogenic glucosides and their degrading enzymes. **Planta**, Berlin, v.195, p.36-42, 1994.

GUDEY, J.S.; TITTLE, F.R.; SPENCER, M.S. A role for ethylene in the metabolism of cyanide by higher plant. **Plant Physiology**, Rockville, v.74, p.1306-1310, 1989.

GUIMARÃES, T.G.; FONTES, P.C.R.; PEREIRA, P.R.G.; ALVAREZ VENEGAS, V.H.; MONNERAT, P.H. Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivados em dois tipos de solo. **Bragantia**, Campinas, v.58, p.209-216, 1999.

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

HOMMA, A.R.D. The dynamics of extraction in Amazon: a historical perspective, **Advances in Economic Botany**, New York, v.9, p.23-32, 1992.

HUMPHRIES, J.M.; STANGOULIS, J.C.R.; GRAHAM, R.D. Manganese. In: BARKER, A.V.; PILBEAM, D.J. (Ed.). **Handbook of Plant Nutrition**. Boca Raton: Taylor & Francis. 2007. p.351-374.

IRRDB. International Rubber Research and Development Board. **Annual Report. IRRDB**. Kuala Lumpur, 1998. 24p.

IRRDB. Biotechnology in plantation crops research. **International Rubber Research and Development Board Information Quarterly**, Kuala Lumpur, v.3, p.1-3, 1999.

IRSG. International Rubber Study Group. **Rubber Statistical Bulletin**, Wembley, v.53, p.53-53, 1999.

IRSG. International Rubber Study Group. **Rubber Statistical Bulletin**, Wembley, v.61, p.61-61, 2007.

IRSG. International Rubber Study Group. **Rubber Statistical Bulletin**, Wembley, v.62, p.52-52, 2008.

JACOB, J.L.; PRÉVÔT, J.C.; LACROTTE, R. L'encoche sèche chez *Hevea brasiliensis*. **Plantations, Recherche et Développement**, Paris, v.1, p.15-24, 1994.

JUNQUEIRA, N.T.V.; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIM, L. Variabilidade fisiológica de *Microcyclus ulei*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, p.210-214, 1986.

KEUCHENIUS, P.E. Consideration on Brown Bast Disease. **Archief von de Rubbercultuur in Nederlandsch Indië**, Djakarta, v.8, p.803-816, 1924.

KONGSAWADWORAKUL, P.; VIBOONJUN U.; ROMRUENSUKHAROM, P.; CHANTUMA, P.; RUDERMAN, S.; CRESTIN, H. The leaf, inner bark and latex cyanide potential of *Hevea brasiliensis*: Evidence for involvement of cyanogenic glucosides in rubber yield. **Phytochemistry**, Oxford, v.70, p.730-739, 2009.

LANGFORD, M.H. The status of *Hevea* rubber planting material for use in tropical America. **Turrialba**, Turrialba, v.7, p.104-110, 1957.



LASSCHNIT, J.A.; VOLLEMA, J.S. De meadow-resistant cloon LCB 870. **Bergcultures**, Djakarta, v.21, p.257-261, 1959.

LESPINASE, D.; GRIVET, L.; TROIPONX, V. Identification of QTL's involved in the resistance to South American Leaf Blight in the rubber tree. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.100, p.975-84, 2000.

LIEBEREI, R. Cyanogenesis of *Hevea brasiliensis* during infection with *Mycrocyclus ulei*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.115, p.134-146, 1986.

LIEBEREI, R. Relationship of cyanogenic capacity (HCNc) of the rubber tree *Hevea brasiliensis* to susceptibility to *Microcyclus ulei*, the agent of South American Leaf Blight. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.115, p.54-67, 1988.

LIEBEREI, R. South American leaf blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): New steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. **Annals of Botany**, Oxford, v.100, p.1125-1142, 2007.

MAIA, F.Z. Experiência da Cultrosa com a enxertia de copa. In: SEMINÁRIO SOBRE A ENXERTIA DE COPA DE SERINGUEIRA, 1., 1981, Brasília. **Anais...** Brasília: SUDHEVEA, 1982. p.65-81.

MALAVOLTA, E. **ABC da análise de solos e folhas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992. 124p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2006. 638p.

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

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition on higher plants**. New York: Academic Press, 1995. 889p.

MAY, A.; GONÇALVES, P.S.; MARTINS, A.L. A importância do porta-enxerto na cultura da seringueira. **Borracha Atual**, São Paulo, p.18-26, 2006.

MEYER, W.H. Eenige opmerking over het splijten van *Hevea* kiemplanten. **Le Bergcultures**, Djakarta, v.12, p.1797-1801, 1938.

MILBURN, J.A.; RANASINGHE, M.S. A comparison of methods for studying pressure and solute potentials in xylem and also in phloem laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.47, p.135-143, 1996.

MILLER, J.M.; CONN, E.E. Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.65, p.1199-1202, 1980.

MOIR, G.F.J. Ultracentrifugation and staining of *Hevea* latex. **Nature**, London, v.21, p.1626-1628, 1959.

MONTENEY, B.A. Primary productivity of a *Hevea* forest in the Ivory Coast. **Annales des Sciences Forestieres**, Nancy, v.46, p.502-505, 1989.

MORAES, L.A.C. **Incompatibilidade por translocação em enxertos de clones de copa de seringueira e o clone de painel IPA 1**. Testes da hipótese do efeito do potencial cianogênico dos clones de copa. 2000. 51p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

MORAES, L.A.C.; MORAES, V.H.F. Modificação da técnica de Ramaer para obtenção de plantas gêmeas de seringueira. **Bragantia**, Campinas, v.64, p.559-561, 2006.

MORAES, L.A.C.; MORAES, V.H.F.; CASTRO, P.R.C. Aplicação de KCN e linamarina e a incompatibilidade de enxertia por translocação no clone de seringueira IPA 1. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, p.717-729, 2001.

MORAES, L.A.C.; MORAES, V.H.F.; MOREIRA, A. Efeito da cianogênese na incompatibilidade entre clones de copa de seringueira e o clone de painel IPA 1. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p.925-932, 2002.

MORAES, V.H.F. **Altura da enxertia de copa em seringueira. Efeitos sobre o crescimento e o custo da enxertia**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 1995. 6p.

MORAES, V.H.F. Rubber. In: ALVIM, P.T.; KOSLOWSKI, T.T. (Ed.). **Ecophysiology of tropical crops**. New York: Academic Press, 1977. p.315-331.

MORAES, V.H.F. **Sumário das pesquisas sobre enxertia de copa da seringueira no CPAA**. Manaus: EMBRAPA, CPAA, 1997. 25p.

MORAES, V.H.F. **Técnicas de enxertia de copa da seringueira**. Manaus: EMBRAPA, CPAA, 1998. 8p.

MORAES, V.H.F. Avaliação preliminar de clones de copa de seringueira. **Agrotrópica**, Itabuna, v.12, p.41-44, 2000.

MORAES, V.H.F.; MORAES, L.A.C. Diagnóstico do látex em sangria precoce de seringueira com copas enxertadas. Possibilidade de emprego na seleção precoce de clones de copa e de painel. **Agrotrópica**, Itabuna, v.7, p.49-62, 1995.

MORAES, V.H.F.; MORAES, L.A.C. Efeito de copas enxertadas de seringueira (*Hevea* spp.) sobre o teor de magnésio e a regeneração do látex no painel Fx 3899. **Agrotrópica**, Itabuna, v.9, p.59-66, 1997.

MORAES, V.H.F.; MORAES, L.A.C. A possible role of cyanogenesis in the onset of tapping panel dryness of rubber (*Hevea brasiliensis*). **Agrotrópica**, Itabuna, v.15, p.65-68, 2003.

MORAES, V.H.F.; MORAES, L.A.C. Características fisiológicas do látex do clone de *Hevea brasiliensis* Fx 4098, sob diferentes copas enxertadas de *H. pauciflora*. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, n.42, p.92-107, 2004.

MORAES, V.H.F.; MORAES, L.A.C. Desempenho de clones de copa de seringueira resistentes ao mal-das-folhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.45, p.852-858, 2008.

MORAES, V.H.F.; MORAES, L.A.C.; MOREIRA, A. **Cultivo da seringueira com copas enxertadas resistentes ao mal-das-folhas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 30p.

MORAES, V.H.F.; MOREIRA, A. **Potencial de contribuição da seringueira para conservação do ambiente no trópico úmido**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2003. 18p.

MOREIRA, A.; FAGERIA, N.K. Potential of Brazilian Amazon soils for food and fiber production. **Dynamics Soil, Dynamics Plant**, London, v.2, p.82-88, 2008.

MOREIRA, A.; FAGERIA, N.K. Soil chemical attributes of Amazonas State, Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.40, p.2912-2925, 2009.

MOREIRA, A.; MORAES, L.A.C.; FAGERIA, N.K. Potential of rubber plantations for environmental conservation in Amazon region. **Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability**, London, v.3, p.1-5, 2009.

MOREIRA, A.; MORAES, V.H.F.; CASTRO, C. Fontes e doses de boro em porta-enxertos de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.1291-1298, 2006.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes & solventes**. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 1990. 627p.

NANDRIS, D.; PELLEGRIN, F.; MOREAU, R.; ABINA, J.; ANGUI, P.; CHRETIN, J. Etiology, epidemiology and environmental investigations as the causal factors of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) bark necrosis: A physiological trunk disease caused by an accumulation of stresses. In: TAPPING PANEL DRYNESS MEETING, 2004, Kunning. Kuala Lumpur: IRRDB, 2004. 19p.

NIELSEN, J.S.; MÖLLER, B.L. Biosynthesis of cyanogenic glucosides in *Triglochin maritime* and the involvement of cytochrome P450 enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.368, p.121-130, 1999.

OSTENDORF, F.W. Twee proeven met meervondigige *Hevea* oculaties. **Archief van de Rubbercultuur in Nederlandsch Indië**, Djakarta, v.26, p.27-43, 1948.

PARAJONTHY, K.; GOMEZ, J.B.; YEANG, H.Y. Physiological aspects of brown bast development. In: INTERNATIONAL RUBBER CONFERENCE, Kuala Lumpur, 1975. **Proceedings**, Kuala Lumpur: RRIM, 1975. p.181-202.

PEISER, G.D.; WANG, T.T.; HOFFMAN, N.E.; YANG, S.F.; LIU, H.W.; WALSH, C.T. Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.81, p.3059-3063, 1984.

PELLEGRIN, F.; DURAN-VILA, D.; VAN MUNSTER, M.; NANDRIS, D. Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) trunk phloem necrosis: a etiological investigations failed to confirm any biotic causal agent. **Forest Pathology**, Malden, v.37, p.9-21, 2006.

PEREIRA, A.V.; PEREIRA, E.V.C. **Adubação de seringais de cultivo na Amazônia (primeira aproximação)**. Manaus: EMBRAPA, CPAA, 1986. 32p.

PEYRARD, N.; PELLEGRIN, F.; CHADOEUF, J.; NANDRIS, D. Statistical analysis of the spatio-temporal dynamics of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) trunk phloem necrosis: no evidence of pathogen transmission. **Forest Pathology**, Malden, v.36, p.360-371, 2006.

PIMENTEL GOMES, F.; GARCIA, C.H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 309p.

PINHEIRO, E.; LIBONATI, V.F.; CASTRO, C.; PINHEIRO, F.S.V. A enxertia de copa na formação de seringais de cultivo nos trópicos úmidos da Amazônia. In: SEMINÁRIO SOBRE ENXERTIA DE COPA DA SERINGUEIRA, 1989, Manaus. **Anais...** Brasília: EMBRAPA; SUDHEVEA, 1989. p.63-81.

PUJARNISCLE, S. Etude preliminaire sur l'activite enzymatique des lutoides du latex d'*hevea brasiliensis* distribution de la phosphatase acide, de la  $\beta$ -glicosidase et de la cathepsine dans le latex. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v.262, p.923-925, 1966.

RADJINO, A.J. Effect of *Oidium* and *Dothidella* resistant crowns on growth and yield of *Hevea brasiliensis*. **Journal of Rubber Research**, Kuala Lumpur, v.21, p.56-63, 1969.

RANDS, R.D. Brown bast disease of plantation rubber: its cause and prevention. **Archief van de Rubbercultuur in Nederlandsch Indië**, Djakarta, v.5, p.223-240, 1921.

REICHHART, D.; SALAÜN, J.P.; BENVENISTE, I.; DURST, F. Induction by manganese, ethanol, phenobarbital and herbicides of microsomal cytochrome P-450 in higher plant tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.1996, p.301-303, 1979.

REICHHART, D.; SALAÜN, J.P.; BENVENISTE, I.; DURST, F. Time course of induction of cytochrome P-450, NADPH-Cytochrome *c* reductase, and cinnamic acid hydroxylase by phenobarbital, ethanol, herbicides, and manganese in higher plant microsomes. **Plant Physiology**, Rockville, v.66, p.600-604, 1980.

RENTSCH, D.; SCHMIDT, S.; TEGEDER, M. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. **Plant Transporters and Channels**, Amsterdam, v.581, p.2281-2289, 2007.

RIBAILLIER, D. Action "in vitro" de certains ions minéraux et composés organiques sur l'stabilité du latex. **Révue Générale des Caoutchoucs et Plastiques**, Paris, v.45, p.1395-1398, 1968.

RRII. RUBBER RESEARCH INSTITUTE OF INDIA. Crown budding of susceptible high yielding clones with resistant/tolerant clones. In: RUBBER RESEARCH INSTITUTE OF INDIA. **Annual report 1986/87**. Kerala: RRII, 1987. p.37-38.

SAMSUDDIN, Z. Differences in stomatal density, dimensions and conductance to water vapor in seven species of *Hevea*. **Biologia Plantarum**, Praha, v.22, p.154-156, 1980.

SAMSUDDIN, Z.; IMPENS, I. Water vapors and carbon dioxide diffusion resistances of four *Hevea brasiliensis* clonal seedlings. **Experimental Agriculture**, London, v.14, p.173-177, 1978.

SCHROTH, G.; MORAES, V.H.F.; MOTA, M.S.S. Increasing the profitability of traditional planted rubber forest at the Tapajós river, Brazilian Amazon. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, Amsterdam, v.102, p.319-339, 2004.

SCOTT, W.W. **Standard methods of chemical analysis**. New York: D. van Nostand Company, 1939. 2617p.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v.30, p.507-512, 1974.

SELMAR, D. **Cyanogenese in Hevea. Zwei wege zur metabolisierung cyanogener glucoside**. 1986. 187p. Thesis (Doctoral) - Technische Universität Carolus Wilhelmina zur Braunschweig, 1986.

SELMAR, D. Transport of cyanogenic glucosides: linustatin uptake by *Hevea* cotyledons. **Planta**, Berlin, v.191, p.191-199, 1993.

SHORROCKS, V.M. **Mineral deficiencies in *Hevea* and associated cover plants.** Birmingham: Kyoch Press, 1964. 76p.

SHORROCKS, V.M. Mineral nutrition, growth and nutrient cycle of *Hevea brasiliensis*. I. Growth and nutrient content. **Journal of Rubber Research**, Kuala Lumpur, v.19, p.32-42, 1965b.

SHORROCKS, V.M. Mineral nutrition, growth and nutrient cycle of *Hevea brasiliensis* IV – Clonal variation in girth with reference to shoot dry weight and nutrient requirements. **Journal of Rubber Research**, Kuala Lumpur, v.19, p.93-97, 1965a.

SIBBESEN, O.; KOCH, B.; HALKIER, B.A.; MOLLER, B.L. Cytochrome P-450TYR is a multifunctional heme-thiolate enzyme catalyzing the conversion of L-tyrosine to p-hydroxyphenylacetaldehyde oxime in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurriin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.270, p.3506-3511, 1995.

SIVAKUMARAN, S.; PAKIANATHAN, S.W. Studies on tree dryness, I – A simple and rapid method of inducing dryness in *Hevea* tree. **Journal of Rubber Research**, Kuala Lumpur, v.31, p.88-101, 1983.

SOOKMARK, U.; PERRET, B.; BITEAU, F.; MORRIN, D.; PELLEGRIN, F.; NANDRIS, D.; CHRESTIN, H. Is cyanide metabolism involved in rubber tree bark necrosis? In: TAPPING PANEL DRYNESS MEETING, 2004, Kunning. Kuala Lumpur: IRRDB, 2004. p.66–72.

SOUSA, N.R.; MORAES, V.H.F. Recursos genéticos de *Hevea*. In: SOUSA, N.R.; SOUZA, A.G.C. (Ed.). **Recursos fitogenéticos na Amazônia Ocidental**; conservação, pesquisa e utilização. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. p.189-199.

SOUZA, M.I.R.; LION, A. Observações de campo na Guamá Agro-Industrial (Grupo Pirelli). In: EMBRAPA. **Enxertia de copa da seringueira**. Manaus: SUDHEVEA, 1989. p.21-27. (EMBRAPA, CNPSD. Documentos, 7).

SUNDERASAN, E.; WARD, M.A.; YEANG, H.Y. Isolation and characterization of latex cyanogenic glicosidase in *Hevea brasiliensis*, **Journal of Rubber Research**, Kuala Lumpur, v.5, p.244-252, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TALATALA, R.L.; LORETO, M.T.P. **Cyanide content of cassava cultivars at different fertility levels and stages of maturity**. Laguna: Department of Science and Technology of Philippines University, 2008. 2p.

TAN, H.; LEONG, W. Crown budding results of a survey of estates in Northern peninsular Malaya. In: PLANTER'S CONFERENCE, 1977, Kuala Lumpur. **Proceedings**. Kuala Lumpur: RRIM, 1977. p.45-57.

UMBACH, H.  **$\beta$ -cyanoalanin synthase in *Hevea* species**. Braunschweig: Technische Universität Carolus Wilhelmina zur Braunschweig, 1989. 76p.

VIÉGAS, I.J.M.; CARVALHO, J.G.; FRAZÃO, D.A.C. Desordens nutricionais na cultura da seringueira: critérios de diagnose para o solo e plantas e correção de deficiência. In: VIÉGAS, I.J.M.; CARVALHO, J.G. (Ed.). **Seringueira: nutrição e adubação no Brasil**. Brasília: Embrapa, 2000. p.123-173.

VIEIRA, L.S.; SANTOS, P.C.T.C. **Amazônia**; seus solos e outros recursos naturais. São Paulo: Agronômica Ceres, 1987. 416p.

WEINSTEIN, B. **The Amazon rubber boom, 1850-1920**. Stanford: Stanford University Press, 1983. 356p.

YOON, P.K. Further progress in crown budding. In: PLANTER'S CONFERENCE, 1971, Kuala Lumpur. **Proceedings...** Kuala Lumpur: RRIM, 1973. p.143-153.