



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS (UEA)
ESCOLA NORMAL SUPERIOR (ENS)
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

YASMIN VERÇOSA KRAMER

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOBILIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS
DURANTE A GERMINAÇÃO E PÓS-GERMINAÇÃO DE *Hevea* spp.**

Manaus – AM

2022

YASMIN VERÇOSA KRAMER

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOBILIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS
DURANTE A GERMINAÇÃO E PÓS-GERMINAÇÃO DE *Hevea* spp.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade do Estado do Amazonas (UEA) como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

Coorientador: Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves

Manaus – AM

2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

K89cc Kramer, Yasmin Verçosa
Caracterização morfológica e mobilização de ácidos graxos durante a germinação e pós-germinação de *Hevea* spp. / Yasmin Verçosa Kramer. Manaus : [s.n], 2022.
43 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.
Inclui bibliografia
Orientador: Hector Henrique Ferreira Koolen
Coorientador: José Francisco de Carvalho Gonçalves

1. Seringueira. 2. Morfologia do estabelecimento inicial. 3. Mobilização de reservas. 4. Reservas lipídicas.
I. Hector Henrique Ferreira Koolen (Orient.). II. José Francisco de Carvalho Gonçalves (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Caracterização morfológica e mobilização de ácidos graxos durante a germinação e pós-germinação de *Hevea* spp.

YASMIN VERÇOSA KRAMER

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOBILIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS
DURANTE A GERMINAÇÃO E PÓS-GERMINAÇÃO DE *Hevea* spp.**

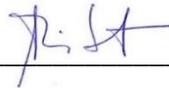
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Estado do Amazonas (UEA) como parte
dos requisitos necessários à obtenção do título de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Manaus, 05 de maio de 2022.

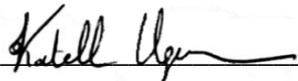
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen (Orientador/UEA)



Prof.^a Dr.^a Maria Astrid Rocha Liberato (Membro Avaliador/UEA)



Prof.^a Dr.^a Katell Uguen (Membro Avaliador/UEA)

*À minha mãe e à nossa estrelinha que
descansa em paz,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Hector Koolen, por ter sido um professor tão inspirador e solícito, e pela paciência e encorajamento nos meus momentos de fragilidade e dificuldade.

Ao meu coorientador Dr. José Francisco, por ter me acolhido em um momento delicado da minha primeira iniciação científica e por ter acreditado no meu potencial.

À Dr.^a Josiane Celerino, pelo auxílio infindável no desenvolvimento desse trabalho, e também pela parceria, conselhos de vida e da pesquisa, pela confiança, mas, principalmente, pela paciência de lidar comigo no dia a dia e me ajudar a melhorar como pessoa e como futura pesquisadora.

À Dr.^a Giovana Bataglion, pelo auxílio nas análises cromatográficas e pela paciência infindável ao lidar comigo e com a minha ignorância no assunto.

À toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV/Inpa), em especial à doutoranda Ana Cláudia e às futuras mestrandas Katharine Duarte, Antônia Ferreira e Hívina Dorzane, pela paciência, companheirismo no desenvolvimento das atividades do laboratório e pelas conversas nos momentos de descontração.

Ao grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas da Universidade do Estado do Amazonas pela paciência e pelo constante compartilhamento de informação e conhecimento.

Ao Laboratório de Microbiologia do Solo do Inpa pelo espaço cedido na realização dos experimentos.

À banca avaliadora, pelas contribuições ao trabalho.

Aos professores que lecionaram no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Escola Normal Superior (ENS/UEA). Todos do corpo de docentes que tive contato auxiliaram na minha formação acadêmica e na minha formação como humana, e deixo um agradecimento especial a Dr.^a Larissa Kirsch, Dr. Jair Maia, Dr.^a Katell Uguen, Dra. Maria Astrid que, além de professores queridos, os tenho como inspiração.

Aos meus amigos, que permaneceram ao meu lado nos momentos difíceis e sempre apoiaram minhas estripulias. Deixo um agradecimento especial ao Elson Gustavo pelo apoio, pelo carinho e pela compreensão em meus momentos de crise, e por nunca ter descreditado de mim, à Mylla Dimas pela parceria acadêmica e mais ainda por todo companheirismo e confiança, à Paula Dantas pela paciência e parceria, ao Matheus Numata pela confiança, por todas as conversas e pelo apoio em todos os momentos de dificuldade, à Nicole Ingrid por ser

minha parceira de crime e me apoiar nas pequenas conquistas, além de me suportar nos piores dias.

À minha prima Fernanda Luísa, à minha tia Carla Denise, à minha avó Cecília Maria, e à minha mãe Rosana Cláudia pela minha criação, pela paciência pelo apoio nos meus sonhos e por me aceitarem do jeito que sou. Não sei o que seria de mim sem vocês.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e com o meu desenvolvimento pessoal.

E a mim, por ter me dado uma segunda chance.

Muito obrigada!

“O medo mora perto das ideias loucas.”

(Danni Carlos – Coisas Que Eu Sei)

Kramer YV. Caracterização morfológica e mobilização de ácidos graxos durante a germinação e pós-germinação de *Hevea* spp. [trabalho de conclusão de curso]. Manaus: Escola Normal Superior, Universidade do Estado do Amazonas; 2020.

RESUMO

As espécies de *Hevea* fornecem o látex, cujas propriedades físico-químicas não são replicáveis sinteticamente. Grande parte dos estudos relacionados às seringueiras, especialmente envolvendo *H. brasiliensis*, estão voltados para o melhoramento genético em função do aumento da produção de látex, e investigação das suas propriedades físico-químicas e biológicas. São escassos os estudos que envolvam sementes e plântulas deste gênero, assim como seu potencial biotecnológico. Compreender a morfofisiologia de sementes poderá não somente elucidar sobre as características botânicas, mas também fornecer informações que possam ser aproveitadas para o melhoramento genético das espécies e para a produção de sementes certificadas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi investigar a morfologia do estabelecimento inicial das plântulas e a mobilização de ácidos graxos durante a germinação e pós-germinação de *H. brasiliensis*, *H. guianensis* e *H. spruceana*. Sementes de *H. brasiliensis* foram coletadas no Inpa/Campus I e III, enquanto as de *H. guianensis* foram coletadas na Reserva Florestal Adolfo Ducke e em fragmento florestal de propriedade privada localizada no Bairro Tarumã. Por sua vez, sementes de *H. spruceana* foram coletadas no Parque Zoobotânico e Embrapa Rio Branco. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV/Inpa). A assepsia se deu por lavagem em água corrente seguida por imersão em hipoclorito de sódio a 1,5% durante cinco minutos e tripla lavagem em água destilada. A biometria das sementes quiescentes foi realizada com auxílio de paquímetro digital. Para a caracterização morfológica da germinação das três espécies e avaliação da mobilização da reserva lipídica, foram escolhidas as fases de semente quiescente (SQ), emissão da radícula (ER), raízes (RS) e eófilos (EO). Para extração dos óleos foi utilizado hexano como solvente na proporção de 3 mL para 100 mg de farinha em lavadora ultrassônica, seguida de centrifugação durante cinco minutos em 200 x g a 27 °C. As amostras foram esterificadas através da adição de 2 mL de solução de cloreto de acetila e metanol a 2% e mantidas em estufa durante seis horas a 45 °C. Para análise dos ésteres, foram realizadas diluições 1:100 em hexano e injetadas em cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas. A massa média das sementes foi de 3,14 g para *H. brasiliensis*, 1,7 g para *H. guianensis* e 5,2 g para *H. spruceana*. O estabelecimento inicial das plântulas de *H. brasiliensis*, *H. guianensis* e *H. spruceana* pode ser classificado como hipógeo-criptocotiledonar com cotilédones de absorção. O ácido graxo de maior concentração foi o ácido linoleico para as três espécies. *H. brasiliensis* e *H. guianensis* demonstraram padrão de mobilização semelhante, indicando maior demanda energética na fase de EO. Não foi verificada mobilização significativa dos ácidos graxos para *H. spruceana* nas últimas fases, diferindo das demais espécies. Portanto, conclui-se que apesar da semelhança quanto à germinação e desenvolvimento da plântula, *H. spruceana* possui estratégia de mobilização de reservas lipídicas mais discreta que *H. brasiliensis* e *H. guianensis*. À parte disso, a mobilização de lipídeos está relacionada com desenvolvimento final da plântula.

PALAVRAS-CHAVE: seringueira; morfologia do estabelecimento inicial, mobilização de reservas; reservas lipídicas.

Kramer YV. Morphological characterization and fatty acids mobilization during germination and post-germination of *Hevea* spp. [undergraduate thesis]. Manaus: Normal Higher School, State University of Amazonas; 2020.

ABSTRACT

Hevea species provide latex, whose physicochemical properties are not synthetically replicable. Most of the studies related to rubber trees, especially involving *H. brasiliensis*, are focused on genetic improvement increase latex production and investigation of its physicochemical and biological properties. There are few studies involving seeds and seedlings of this genus, as well as its biotechnological potential. Understanding the morphophysiology of seeds can not only elucidate the botanical characteristics, but also provide information that can be used for the genetic improvement of the species and for the production of certified seeds. Therefore, the objective of this work was to investigate the morphology of the initial establishment of seedlings and the mobilization of fatty acids during germination and post-germination of *H. brasiliensis*, *H. guianensis* and *H. spruceana*. Seeds of *H. brasiliensis* were collected at Inpa/Campus I and III, while those of *H. guianensis* were collected at Reserva Florestal Adolfo Ducke and in a privately owned forest fragment located in Bairro Tarumã. In turn, *H. spruceana* seeds were collected at the Zoobotanical Park and Embrapa Rio Branco. The experiments were performed at the Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry (LFBV/Inpa). Asepsis was carried out by washing in running water followed by immersion in 1.5% sodium hypochlorite for five minutes and triple washing in distilled water. The biometry of the quiescent seeds was done with the aid of a caliper. For the morphological characterization and evaluation of the mobilization of the lipid reserve experiments, the phases of quiescent seed (QS), radicle emission (RE), roots (RS) and eophylls (EO) were chosen. To the oil extraction, hexane was used as a solvent in the proportion of 3 mL for 100 mg of flour in an ultrasonic washer, followed by centrifugation for five minutes at 200 x g at 27 °C. The samples were esterified by adding 2 ml of 2% acetyl chloride and methanol solution and kept in an oven for six hours at 45 °C. For the analysis of the esters, 1:100 dilutions were performed in hexane and injected into a gas chromatograph coupled to a mass detector. The mean seed weight was 3.14 g for *H. brasiliensis*, 1.7 g for *H. guianensis* and 5.2 g for *H. spruceana*. The initial establishment of *H. brasiliensis*, *H. guianensis* and *H. spruceana* seedlings can be classified as hypogenous-cryptocotyledonar with absorption cotyledons. The fatty acid with the highest concentration was linoleic acid for the three species. *H. brasiliensis* and *H. guianensis* showed a similar pattern of mobilization, indicating greater energy demand in the EO phase. There was no significant mobilization of fatty acids for *H. spruceana* in the last stages, differing from the other species. Therefore, it is concluded that despite the similarity in terms of germination and seedling development, *H. spruceana* has a more discreet lipid reserve mobilization strategy than *H. brasiliensis* and *H. guianensis*. Besides that the lipid mobilization is related to final development of the seedling.

KEYWORDS: rubber tree; morphology of the initial establishment, mobilization of reserves; lipid reserves.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapas das áreas de coleta de <i>H. brasiliensis</i> , <i>H. guianensis</i> e <i>H. spruceana</i>	24
Figura 2 – Experimento de caracterização morfológica do estabelecimento inicial.	25
Figura 3 – Morfologia dos eventos da germinação e pós-germinação.	29
Figura 4 – Cromatogramas de ésteres metílicos de diferentes fases germinativas de <i>Hevea</i> spp.	30
Figura 5 – Visão geral da mobilização de ácidos graxos durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas de diferentes espécies de <i>Hevea</i>	32
Figura 6 – Padrão de mobilização dos ácidos palmítico, linoleico, oleico e esteárico durante a germinação e pós-germinação das sementes de <i>Hevea</i> spp.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Biometria e massa das sementes das espécies de <i>Hevea</i>	27
Tabela 2 – Composição de ácidos graxos para sementes de <i>H. brasiliensis</i> (SQ) em comparação com outras espécies da família Euphorbiaceae.	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.2 O GÊNERO <i>Hevea</i>	14
2.2.1 <i>Botânica</i>	14
2.2.2 <i>Contexto histórico, econômico e biotecnológico</i>	15
2.3 SEMENTES DE SERINGUEIRA	17
2.3.1 <i>Perfil bioquímico</i>	18
2.3.2 <i>Germinação</i>	19
2.3.3 <i>Mobilização de reservas primárias</i>	20
2.2.4 <i>Eventos pós-germinativos</i>	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 GERAL.....	23
3.2 ESPECÍFICOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 MATERIAL VEGETAL	23
4.2 BIOMETRIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO ESTABELECIMENTO INICIAL DAS SEMENTES DE <i>Hevea</i> spp.....	25
4.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS FIXOS	26
4.4 ANÁLISE DO PERFIL E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS	26
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 BIOMETRIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO ESTABELECIMENTO INICIAL DAS SEMENTES DE <i>Hevea</i> spp.....	27
5.2 PERFIL E MOBILIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DURANTE ESTÁGIOS GERMINATIVOS DE SEMENTES DE <i>Hevea</i> spp.....	30
6. CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Hevea* compreende 11 espécies que ocorrem naturalmente na região Amazônica (SECCO; BIGIO, 2022). Assim como outros representantes da família Euphorbiaceae, as espécies de *Hevea* são latescentes (com exceção de *Hevea pauciflora*) e fornecem à humanidade o látex. Embora seja nativa da região Amazônica, países do oriente como Malásia e Indonésia detêm mais de 70% da produção mundial de borracha natural (KRICKL; TOURAUD; KUNZ, 2017; NAIR, 2021).

Esse fato está intrinsecamente relacionado com o primeiro Ciclo da Borracha, na Região Norte do Brasil. Ainda que a extração do látex na época tenha provido desenvolvimento econômico e arquitetônico da região, as dificuldades enfrentadas pelos seringueiros além da presença do mal-das-folhas corroboraram com a decadência da atividade extrativista. Wickham, ao exportar cerca de 2.800 plântulas sem a presença aparente do mal-das-folhas para a Inglaterra, possibilitou o avanço da domesticação de *H. brasiliensis*, iniciando o processo de melhoramento genético (GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990; SAMPAIO; LACERDA 2015).

A obtenção de clones é realizada principalmente através da enxertia, limitando o uso de sementes apenas para obtenção de porta-enxertos. Grande parte dos estudos relacionados à seringueira estão voltados para aumento da produção do látex, sendo limitado o conhecimento acerca da germinação e pós-germinação de sementes de *Hevea*. Essas informações são ainda mais escassas para as demais espécies do gênero que não possuem impacto econômico internacional relevante (GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990). Portanto, além do pouco controle do mal-das-folhas na região Amazônica, a falta de sementes melhoradas, denotam uma barreira na expansão da produção de látex no Brasil (GONÇALVES; MONTEIRO, 2007; PRABPREE *et al.*, 2016).

As sementes representam a capacidade de propagação sexual de uma espécie e de fixação em uma população (EL-MAAROUF-BOUATEAU, 2022). É na germinação que muitos aspectos morfofuncionais das plantas adultas são definidos, sendo eles em resposta à regulação do DNA e da mobilização de reservas primárias durante o estabelecimento da plântula (BEWLEY *et al.*, 2013; EL-MAAROUF-BOUATEAU, 2022).

Alguns estudos têm caracterizado a composição dos óleos fixos de sementes de *H. brasiliensis* na perspectiva de produção de biodiesel e biolubrificantes. Na sua composição tem-se alto teor de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, sendo eles os ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e, em menor quantidade, o α -linolênico (C18:3) (ROSCHAT *et al.* 2017).

Sabe-se ainda que a síntese de jasmonatos está intimamente relacionada com a oxidação dos ácidos linoleico e α -linolênico (BACH; FAURE, 2010; IZQUIERDO *et al.*, 2017; HE; DING, 2020), o que pode indicar correlação entre a presença em grande quantidade desses ácidos na semente e a formação e desenvolvimento dos vasos laticíferos durante o estabelecimento inicial das plântulas.

Portanto, compreender a morfofisiologia de sementes poderá não somente elucidar sobre as características botânicas, mas também fornecem informações que podem ser aproveitadas para o melhoramento genético da espécie e para a produção de sementes certificadas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.2 O GÊNERO *Hevea*

2.2.1 Botânica

O gênero *Hevea* pertence à família Euphorbiaceae, que comporta 11 espécies sendo elas *H. benthamiana*, *H. brasiliensis*, *H. carmagoana*, *H. camporum*, *H. guianensis*, *H. microphylla*, *H. nitida*, *H. paludosa*, *H. pauciflora*, *H. rigidifolia* e *H. spruceana* (SECCO; BIGIO, 2022). As espécies são nativas da Região Amazônica, ocorrendo entre Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Suriname e Venezuela (NAIR, 2021). Portanto, são espécies bem adaptadas aos solos ligeiramente ácidos da região e ao clima equatorial úmido com pluviosidade anual superior à 3000 mm (tipo A pela classificação de Koppen-Geiger) (JALANI; RAMLI, 2003).

Os hábitos podem variar entre arbustivo (*H. camporum* e *H. carmagoana*) e arbóreo (demais espécies), assim como a distribuição das espécies varia entre áreas de terra firme e várzeas (*H. spruceana* e *H. carmagoana*, principalmente). As espécies demonstram possuir floração assíncrona, cujo tende a ocorrer entre Julho e Outubro, sendo de Dezembro a Maio a dispersão das sementes na região amazônica (ROCHA *et al.*, 2004; LIBERATO, 2010; ALEIXO, 2014). Excetuando *H. pauciflora*, as demais espécies possuem registro de produção de látex em maior ou menor quantidade e qualidade (GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990).

As espécies compartilham alguns caracteres morfológicos tais como folhas compostas por folíolos trilanceolados, inflorescência em panículas e flores pistiladas com ovário trilobular. Por sua vez, as inflorescências polinizadas geram frutos do tipo tricoca, com deiscência explosiva e sementes ovóides contendo testa que varia de coloração entre marrom claro e

escuro, podendo apresentar ou não perfil marmoreado. As sementes também apresentam parte ventral levemente achatada e presença de hilo (SCHULTES, 1977; GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990; JALANI; RAMLI, 2003; NAIR, 2021). Embora o gênero seja facilmente diferenciado de demais grupos, a identificação das espécies pode ser difícil à primeira vista devido à semelhança morfológica. Além disso, devido à falta de barreiras reprodutivas, é inferida a existência de áreas de hibridização putativa (SCHULTES, 1977; GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990; NAIR, 2021).

2.2.2 Contexto histórico, econômico e biotecnológico

As espécies de maior produtividade, em especial *H. brasiliensis*, foram de grande importância entre 1879 e 1912, período denominado como Primeiro Ciclo da Borracha. A exploração do látex incentivou a migração e colaborou socioeconomicamente com desenvolvimento da Região Norte do Brasil através da instalação de grandes indústrias como Ford e Firestone (PONTES, 2014). Entretanto, para geração de recursos, a extração do látex demandava grande força de trabalho para desenvolvimento das atividades rotineiras e desbravamento da floresta. Além disso, a baixa resiliência dos migrantes às doenças da região, em específico à malária, configurava outra barreira para a atividade (GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990; SAMPAIO; LACERDA, 2015).

Outro fator que contribuiu com o declínio da soberania brasileira na produção de borracha natural foi a presença do mal-das-folhas na região Amazônica, causado pelo fungo *Pseudocercospora ulei*. Esse fitopatógeno reduz o potencial fotossintético das plantas adultas (influenciando negativamente na produção de látex) e impede o desenvolvimento de plântulas antes do quarto lançamento foliar (GASPAROTTO; PEREIRA 2012; HORA JÚNIOR *et al.*, 2014). A alta dificuldade de controle do patógeno associado aos sintomas e mortalidade reduziram drasticamente o sucesso da implementação de plantios puros na região (GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990).

Em paralelo à atividade extrativista na Região Amazônica, Wickham obteve sucesso na obtenção de 2.800 plantas livres do mal-das-folhas a partir de 70 mil sementes que foram contrabandeadas em 1876. As mudas foram enviadas para Inglaterra e distribuídas entre o Jardim Botânico do Ceilão (Sri Lanka), Jardim Botânico de Singapura (Malásia) e Indonésia. Isso deu início ao processo de domesticação, hibridização de *H. brasiliensis* visando maior produção de látex e resistência a patógenos, e melhoria da técnica da sangria. Hoje, essas

regiões detêm a maior parte da produção mundial de borracha natural (GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990; JALANI; RAMLI, 2003; NAIR, 2021).

O Brasil voltou aos holofotes durante a Segunda Guerra Mundial como fonte de borracha natural, uma vez que os países do Eixo detinham a produção asiática, especialmente da Malásia (PONTES, 2015). A criação do Programa de Incentivo à Produção de Borracha Natural (PROBOR) resultou na busca por áreas consideradas de “escape” da doença, visando a expansão do plantio de seringueira no Brasil. Além disso, estimulou a ação de instituições nacionais, como Instituto Agrônomo do Norte (IAN) e o Instituto Agrônomo (IAC), com foco na geração de clones de alta performance com resistência ao mal-das-folhas (COSTA; GONÇALVES; ARRUDA, 2001; HORA JÚNIOR *et al.*, 2014). Nesse contexto, estudos demonstram certa aptidão climática das seringueiras para as Regiões Sul e Sudeste, entretanto, a produção de borracha natural no Brasil ainda é limitada (GONÇALVES; MONTEIRO, 2007).

O melhoramento genético de *Hevea* gira em torno do aumento da produção do látex, resistência a novos patógenos e redução da largura de copa, melhorando o uso efetivo do espaço de plantio (GO *et al.*, 2021). Além disso, modelos preditivos vêm sendo desenvolvidos visando a seleção precoce de progênies (PRIYADARSHAN, 2022).

O sucesso no cultivo *in vitro* tem sido relatado desde meados de 1970. Nestes estudos foram utilizadas anteras imaturas (JAYASREE *et al.*, 1999), explantes de raízes (ZHOU *et al.*, 2010), embriões zigóticos (CARVALHO *et al.*, 2021), meristema apical e seguimentos nodais (ANTWI-WIREDU *et al.*, 2018). O usos desse explantes demonstram a possibilidade de rejuvenescimento de matrizes/bancos de germoplasma através da embriogênese somática (GHORBANI; MIGNON; WERBROUCK *et al.*, 2018).

Em contrapartida aos avanços da micropropagação, a principal forma de produção de clones continua sendo via enxertia, com o uso de sementes (provenientes de polinização aberta) para a obtenção de porta-enxertos (PRABPREE *et al.*, 2016). Neste contexto, as sementes de *Hevea brasiliensis* (selvagens e clonais) têm sido foco de estudos envolvendo óleos fixos para desenvolvimento de biolubrificantes e biocombustível (SALIMON; ABDULLAH; SALIH, 2012; ONOJI; IYUKE; IGBAFE, 2016; ROSCHAT *et al.*, 2017). Há também estudos que visam a investigação da citotoxicidade e atividade antioxidante para a produção de cosméticos (CHAIKUL; LOURITH, KANLAYAVATTANAKUL, 2017; LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL; CHAIKUL, 2021; OLEINIK *et al.*, 2022; RAKNAM; PINSUWAN; AMNUAIKIT, 2020), entretanto, poucos estudos concentraram-se no entendimento metabólico das sementes de *Hevea*.

Embora grande parte dos estudos estejam voltados para aumento da produção de látex, pouco se sabe acerca da ontogenia dos vasos laticíferos. Nesse contexto, sabe-se da influência ácido jasmônico como indutor da diferenciação citoplasmática para formação dos vasos laticíferos. Além disso, esse ácido orgânico atua como ativador do ciclo do metileritritol-fosfato (MEP) e da via do mevalonato (MEV), relacionados com a síntese de compostos isoprênicos, terpenos e indutores da síntese de ácido jasmônico (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2006). Nesse contexto, supõe-se que o mecanismo seja associado à defesa do vegetal e possa estar presente (ainda que de forma rudimentar) desde o momento da protusão da radícula (HAO; WU, 2000; TAN *et al.*, 2017). Portanto, a germinação das sementes de *Hevea* é um dos pontos-chave para o desenvolvimento biotecnológico e melhoramento genético envolvendo o gênero.

2.3 SEMENTES DE SERINGUEIRA

Quanto a morfologia, as sementes das espécies de *Hevea* possuem testa e tégmen que atuam na proteção do embrião contra choques mecânicos, endosperma como principal tecido de reserva, cotilédones finos associados à absorção e transferência de nutrientes, e o embrião (NAIR, 2021). Em contrapartida, o tamanho das sementes pode variar consideravelmente entre as espécies: *H. guianensis* possui a menor semente do gênero enquanto *H. spruceana* possui uma semente grande e alongada, adaptada à hidrocoria (dispersão pela água) (GONÇALVES; CARDOSO; ORTOLANI, 1990).

As sementes podem ser diferenciadas pelo tipo de reservas: são intituladas amiláceas quando utilizam como principal fonte energética o amido, enquanto sementes que utilizam proteínas são ditas proteicas, e sementes que utilizam lipídeos são consideradas oleaginosas (TAIZ, 2017). O consumo desses recursos está associado à supressão das necessidades fotossintéticas e desenvolvimento da plântula (BEWLEY *et al.*, 2013).

Compreende-se que a dispersão foi bem sucedida ao ser verificado o alcance de condições mínimas adequadas para a germinação da semente quiescente, entretanto, o início da germinação depende ainda da presença ou ausência de dormência (CARRERA-CASTAÑO *et al.*, 2020). Esse fator é caracterizado pela existência de uma barreira: i) exógena, podendo ser física (quando há impedimento da penetração da água ou difusão do oxigênio), química (presença de inibidores nos tecidos externos), ou mecânica (devido à rigidez do tegumento, impedindo o desenvolvimento do embrião e protusão das estruturas primárias); ii) endógena, sendo de ordem fisiológica (presença de fator inibidor do processo de reparação e replicação

do DNA), morfológica (embrião subdesenvolvido) ou morfofisiológica; ou ainda iii) combinada (exógena e endógena) (BASKIN; BASKIN, 2014).

A dormência é um mecanismo de defesa associado manutenção da viabilidade do embrião (CARRERA-CASTAÑO *et al.*, 2020). Esse mecanismo pode ser superado através de diferença de temperatura, regimento de fogo, escarificação física ou química (através dos ácidos gástricos dos animais que deglutiram a semente), hipóxia e/ou lixiviação (BASKIN; BASKIN, 2014; EL-MAAROUF-BOUTEAU, 2022).

Além da presença ou ausência da dormência, as sementes podem ser classificadas em ortodoxas, quando possuem tolerância a dissecação, ou recalcitrantes, quando não resistem à dissecação (BEWLEY *et al.*, 2013; TAIZ, 2017; EL-MAAROUF-BOUTEAU, 2022). É registrado que *H. brasiliensis* e *H. spruceana* germinam em torno de 10 dias (CARVALHO, 2017; LIBERATO, 2010), não apresentando dormência. Para sementes de *H. brasiliensis* afirma-se que níveis de água inferiores 15-20% inviabilizam o crescimento do embrião, sendo classificada como recalcitrante (SHUIB *et al.*, 2018).

2.3.1 Perfil bioquímico

Nos tecidos de reserva estão contidos todos os recursos que serão utilizados até que a plântula obtenha competência fotossintética. As reservas primárias são compostas por macro e micronutrientes, carboidratos, proteínas e lipídeos, em que suas concentrações variam de acordo com o genótipo, fatores nutricionais e de estresse hídrico da planta-mãe (TAIZ, 2017).

Em sementes de *H. brasiliensis*, é registrado que lipídeos podem compor até 60% das reservas primárias, sendo considerada como uma semente oleaginosa. Dos minerais, é registrada a presença de potássio, nitrogênio, cálcio, magnésio, zinco, ferro e manganês (CARVALHO, 2017; EKA; TAJUL ARIS; WAN NADIAH, 2010; OYEKUNLE; OMODE, 2008). Além disso, estima-se que proteínas totais correspondam à 20,1% das reservas totais, seguido por 4,4% de amido, 3,1% de açúcares totais e redutores, e 0,02% de aminoácidos livres (ALENCAR, 2003; MOREIRA, 2009). Para *H. spruceana* o quantitativo de lipídeos se demonstra inferior, ao qual foi registrado até 20% de conteúdo lipídico (LIBERATO, 2010).

Nos óleos fixos é documentada a predominância de ácidos graxos tais como palmítico (0,23 a 13,85%), palmitolênico (0,23 a 0,25%), esteárico (5,69 a 16,82%), oleico (12,7 a 64,11%), linoleico (39,6 a 52,84%), α -linolênico (2,38 e 26%), araquidônico (0,66 e 0,97%) e erudico (cerca de 5,22%) (ONOJI; IYUKE; IGBAFE, 2016; RAKNAM; PINSUWAN; AMNUAIKIT, 2020; ROSCHAT *et al.*, 2017). A presença desses ácidos graxos é comum em

outras espécies com sementes oleaginosas da família Euphorbiaceae, como *Jatropha curcas* (SOOD; CHAUHAN, 2015; YEBOAH *et al.*, 2021).

É registrada ainda a presença, em menor proporção, de flavonoides e compostos fenólicos, ácido fítico, taninos, ácido prússico e glicosídeos cianogênicos (KADOW *et al.*, 2012; OLEINIK *et al.*, 2022; RAVINDRAN; RAVINDRAN, 1988).

2.3.2 Germinação

O conceito *stricto sensu* de germinação compreende na ativação do metabolismo e expansão do eixo embrionário, visando a protusão da radícula e posterior desenvolvimento da plântula (BEWLEY *et al.*, 2013, NONOGAKI; CHEN; BRADFORD, 2018). É a partir da embebição da semente quiescente que há efetivação da germinação. Em condições ideais, esse processo pode ser dividido em fase de rápida absorção, fase *lag* e fase de finalização da germinação (BEWLEY *et al.*, 2013; TAIZ, 2017; NONOGAKI; CHEN; BRADFORD, 2018; EL-MAAROUF-BOUTEAU 2022).

Na fase de absorção rápida, há penetração da água nos tecidos internos da semente gerando turgor e, por conta da diferença osmótica a rápida de entrada de água, há dano de embebição e início da quebra de reservas primárias. A fase *lag* consiste na condução do equilíbrio osmótico entre a semente e o exterior, fazendo com que a entrada de água seja mais lenta até a total hidratação da semente. Nessa fase, as reservas solubilizadas são utilizadas para reparo celular, em especial de mitocôndrias e de DNA. Para sementes dormentes, há síntese de mRNAs ou proteínas associadas à germinação, enquanto para não-dormentes, como no caso das espécies de *Hevea*, há preparo para emergência do eixo embrionário. Já a fase de finalização da germinação consiste na expansão celular pela redução do turgor. Tecidos de reserva nesta fase não absorvem mais água e se preparam com a produção *de novo* de enzimas para mobilização das reservas em função da morte programada das células desses tecidos (BEWLEY *et al.*, 2013; NONOGAKI; CHEN; BRADFORD, 2018; CARRERA-CASTAÑO *et al.*, 2020; EL-MAAROUF-BOUTEAU, 2022).

Na primeira fase da embebição, boa parte das mitocôndrias, tanto embrionárias quanto dos tecidos de reserva, estão em número reduzido e com o interior não-diferenciado. Com a entrada de água há liberação de gases (associado à morte celular e hidrólise de solutos), e ativação de enzimas mitocondriais envolvidas com o ciclo de Krebs e da cadeia de transporte de elétrons (BEWLEY *et al.*, 2013). No caso de *H. brasiliensis*, a síndrome do cianeto é regulada por genes que são traduzidos em função do dano de embebição, corroborando com a

degradação da linamarina, para formação de ácido aspártico e asparagina (KADOW *et al.*, 2012).

Ao chegar na fase *lag*, com o reparo, desenvolvimento e/ou síntese de novas mitocôndria, há aumento da respiração celular a partir do uso de reservas já localizadas no embrião. Ainda que não muito bem elucidado o verdadeiro papel na germinação, autores fazem referência à presença de oligossacarídeos da série das rafinoses (rafinose, amilose e verbacose), que podem ser hidrolizados pela enzima α -galactosidase. A quebra desses oligossacarídeos resulta em D-galactose, que é convertida em D-galactose-1-fosfato pela galactoquinase. A D-galactose-1-fosfato é transformada pela UDP-D-glicose-hexose-1-fosfato uridiltransferase com a adição de UDP-glicose. Esse processo resulta em UDP-galactose (que pode ser novamente convertida em UDP-glicose pela UDP-galactose epimerase) e em D-glicose-1-fosfato que, por sua vez será convertida pela fosfoglicomutase em glicose-6-fosfato. Essa molécula será utilizada na glicólise para obtenção do piruvato e incorporação no ciclo do ácido cítrico durante a germinação *stricto sensu* (BEWLEY *et al.*, 2013; NONOGAKI; CHEN; BRADFORD, 2018; NELSON; COX, 2014; EL-MAAROUF-BOUTEAU, 2022).

Além do início do fornecimento efetivo de energia a partir da respiração mitocondrial, a síntese *de novo* de RNA e proteínas está presente durante a embebição, sendo um dos principais eixos da efetivação da germinação. E isso está associado à expressão de diversos genes relacionados à regulação hormonal e enzimática durante a fase *lag* (BEWLEY *et al.*, 2013; NONOGAKI; CHEN; BRADFORD, 2018; EL-MAAROUF-BOUTEAU, 2022).

Alguns desses genes estão associados à síntese de ácido giberélico que, por sua vez, está associado com a regulação de genes de enzimas modificadoras de membranas (expansinas e xiloglucases endotransglicosilase/hidrolase). Essas enzimas atuam no aumento da maleabilidade da membrana plasmática que permite a expansão celular do embrião. À medida que o embrião se desenvolve, há aumento da força de oposição em relação à testa associada ao enfraquecimento do endosperma micropilar, facilitando o processo de protusão da radícula. Esses fatores em conjunção à expressão de genes associados à proteção contra patógenos resultam na conclusão da germinação e na protusão da radícula (BEWLEY *et al.*, 2013; NONOGAKI; CHEN; BRADFORD, 2018; TAIZ, 2017; CARRERA-CASTAÑO *et al.*, 2020; EL-MAAROUF-BOUTEAU, 2022).

2.3.3 Mobilização de reservas primárias

A partir da protusão da radícula há início do desenvolvimento da plântula, sendo esse processo intitulado como germinação aparente. Essa fase é marcada pela mobilização intensa das reservas primárias, que são convertidas aos seus monômeros (ou em unidades transportáveis pela água) com auxílio das enzimas sintetizadas durante a germinação (BEWLEY *et al.*, 2013).

O catabolismo do amido pode ser realizado através da via hidrofílica, no qual conta com a α e β -amilase para a quebra das ligações glicosídicas e conversão da amilose em maltoligossacarídeo, seguindo por hidrólise para liberação de glicose e maltose. Um processo semelhante é visualizado para amilopectinas, entretanto, a α -amilase não é capaz de hidrolisar algumas ligações, resultando em grupos de dextrina. Nesse caso, esse resíduo é convertido para maltoligossacarídeo com auxílio de dextrinase limitada. A glicose liberada é utilizada diretamente para produção de piruvato e incorporação no ciclo de Krebs. Já a maltose passa por um processo extra de quebra pela α -glicosidase para liberação de duas moléculas de glicose. Outra via metabólica do amido é a fosforolítica, no qual a fosforilação do amido libera glicose-1-fosfato que pode ser transformada em glicose-6-fosfato, e dextrina que é convertida em maltoligossacarídeo (BEWLEY *et al.*, 2013; FANG *et al.*, 2021). Além disso, algumas espécies possuem acúmulo de galactomanano, mobilizado na emissão da radícula. A molécula tem a galactose separada do esqueleto de manano através da α -galactosidase, e o esqueleto é quebrado nas ligações 2 e 4 pela endo- β -mananase, liberando manobioses (ou trioses) que serão clivadas em manose (BEWLEY *et al.*, 2013; NELSON; COX, 2014).

Sabe-se que em plantas superiores o amido começa a ser degradado a partir da via fosforolítica e depois pela via hidrolítica com a presença de α e β -amilases, estando esse fato associado à atividade de hexoquinases e ativação da via da pentose-fosfato. Para *H. brasiliensis*, além do metabolismo da glicose, essas enzimas podem ser encontradas no citoplasma dos vasos laticíferos e estão relacionadas à produção de látex (FANG *et al.*, 2021).

Já o catabolismo de proteínas é realizado por diferentes tipos de proteases que hidrolisam total ou parcialmente os polipeptídeos. São elas: i) as endopeptidases, que são capazes de clivar ligações internas, reduzindo o tamanho das polipeptidases; ii) as aminopeptidases, que clivam apenas grupo amina ao final do polipeptídeo; e iii) as carboxipeptidases, que hidrolisam a carboxila ao final do polipeptídeo. Tanto as aminopeptidases quanto as carboxipeptidases são exopeptidases. As proteínas são mobilizadas intensamente desde a germinação, uma vez que seu papel não está relacionado ao fornecimento de energia, e sim na síntese *de novo* de proteínas, proteases e na manutenção do DNA (BEWLEY *et al.*, 2013; NELSON; COX, 2014). Nesse contexto, Wong e Abubakar (2005) observaram a redução das enzimas β -glucosidase, MutT/Nudix (fosfohidrolases) e amido

sintases, consumo total lectina ácida e giberelina 20-oxidase, e manutenção da rubisco, tirosina carboxilase e da ACC sintase durante a pós-germinação.

Os lipídeos estocados no tecido de reserva sofrem lipólise e são liberados dos oleossomas em sua forma monomérica. Os triacilglicerídeos (TAG) são convertidos em diacilglicerídeos (DAG) e, posteriormente, em monoacilglicerídeos (MAG) pelas enzimas triacilglicerídeo e diacilglicerídeo lipase, respectivamente. A última etapa (clivagem do MAG) gera também uma molécula de glicerol que é transportada ao citosol onde será transformada, com gasto energético, em α -glicerol fosfato. Por sua vez, essa molécula será transportada à mitocôndria e convertida em dihidroxicetona fosfato (BEWLEY *et al.*, 2013; NELSON; COX, 2014).

Os ácidos graxos são transportados ao glioxissomo (peroxissomo) e sofrem β -oxidação, onde são esterificados pela coenzima A e transformados em acetil-CoA. Ácidos graxos saturados com número ímpar de carbonos geram, além das duas moléculas de acetil-CoA, uma molécula de propionil-CoA que será transformada em acetil-CoA posteriormente. A degradação de ácidos graxos insaturados segue a mesma via metabólica, mas há necessidade da isomerização da molécula para que tenha uma ligação na posição *trans*, permitindo a β -oxidação. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um produto indesejado da β -oxidação por ser citotóxico. Por esse motivo, a reação ocorre no glioxissomo, organela que contém peroxidases (catalase) que decompõem a molécula em água e um átomo de oxigênio. A acetil-CoA é incorporada em duas rotas metabólicas: na via do glioxalato e no ciclo do ácido cítrico (BEWLEY *et al.*, 2013; NELSON; COX, 2014).

2.2.4 Eventos pós-germinativos

A mobilização de reservas primárias resulta no desenvolvimento dos órgãos das plântulas, permitindo a visualização de diferentes padrões de desenvolvimento em resposta às adaptações evolutivas das espécies. Garwood (1996) classificou o estabelecimento da plântula em função de tratos morfofisiológicos, sendo eles: i) alongamento do hipocótilo, no qual é dito estabelecimento epígeo quando há alongamento deste eixo, e hipógeo quando há alongamento do eixo do epicótilo; ii) visualização dos cotilédones, no qual, quando visíveis, é dito estabelecimento fanerocotiledonar, e caso permaneçam na semente, intitula-se criptocotiledonar; e iii) ao tipo do cotilédone, que podem ser foliáceos ou de absorção/reserva.

As diferentes estratégias de estabelecimento estão associadas à diferentes adaptações evolutivas das espécies. Ibarra-Manríquez, Ramos e Oyama (2001) comentam que espécies

com estabelecimento epígeo tendem a possuir cotilédones foliáceos, indicando a necessidade de rápido desenvolvimento e grande adaptabilidade a ambientes com alta incidência luminosa. Em contrapartida, para espécies com estabelecimento hipógeo, têm-se predominância de cotilédones de absorção ou de reserva, indicando tolerância à ambientes de sombra.

No contexto de grupos ecológicos de sucessão, espécies pioneiras tendem a ser mais representadas pelo estabelecimento epígeo-fanerocotiledonar com cotilédones foliáceos, visando desenvolvimento rápido e competência fotossintética. Em contrapartida, espécies clímax tendem a ter um estabelecimento hipógeo-criptocotiledonar com cotilédones de absorção, visando manutenção a longo prazo das necessidades energéticas da plântula (FERRAZ *et al.*, 2004; IBARRA-MANRÍQUEZ; RAMOS; OYAMA, 2001).

À parte das estratégias desenvolvidas para o estabelecimento da plântula, a germinação aparente é finalizada com o consumo total das reservas primárias, resultando no descarte da estrutura remanescente da semente (tecidos mortos) e no estabelecimento de uma plântula com folhas expandidas e competência fotossintética.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar a morfologia do estabelecimento inicial das plântulas, bem como a mobilização de ácidos graxos durante a germinação e pós-germinação de *H. brasiliensis*, *H. guianensis* e *H. spruceana*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar o padrão morfológico do estabelecimento inicial das espécies de *Hevea*.
- Identificar o perfil de ácidos graxos dos óleos fixos das sementes de *Hevea* spp.
- Avaliar a mobilização das reservas lipídicas das sementes de *Hevea* spp. durante a germinação e pós-germinação.

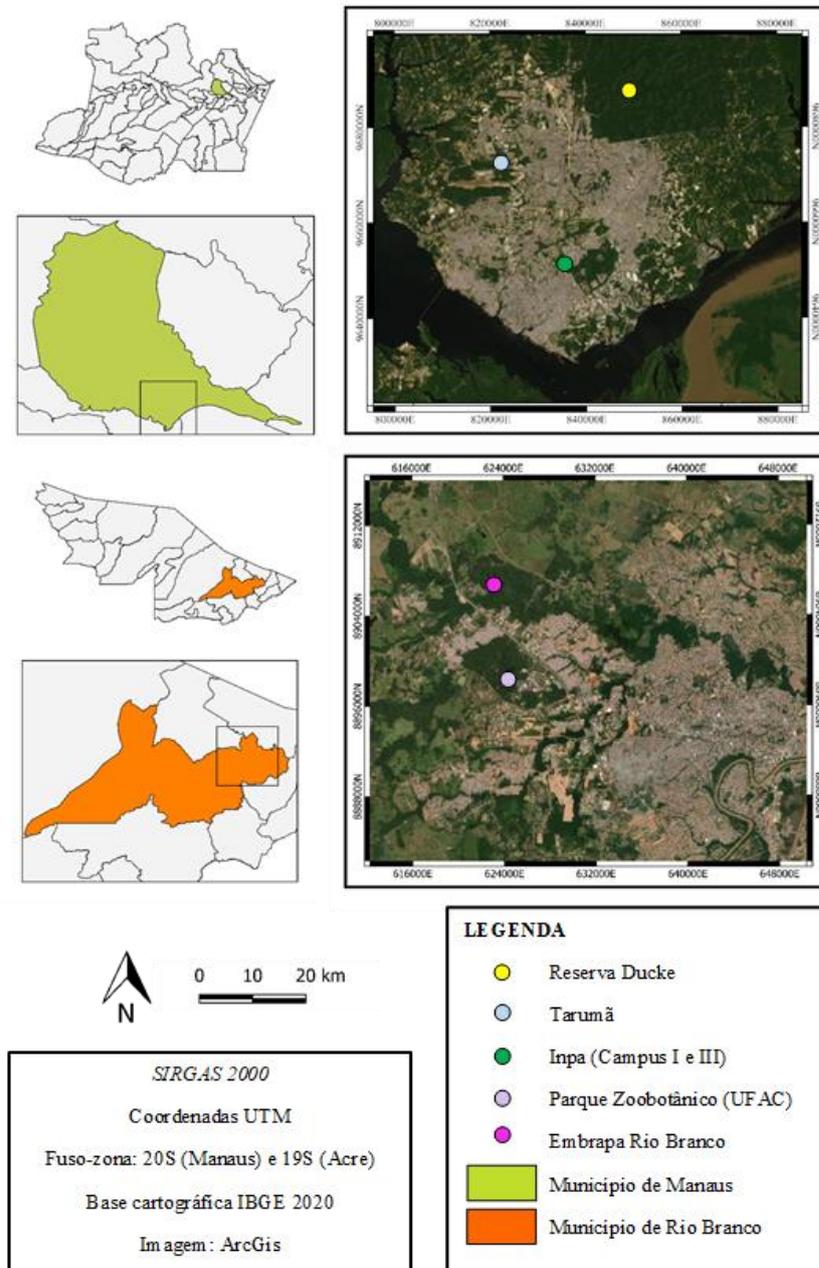
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado entre dezembro de 2020 e março de 2021, totalizando três lotes de 300 sementes para cada espécie. Sementes de *H. brasiliensis* foram coletadas no

Inpa/Campus I e III, enquanto as de *H. guianensis* foram coletadas na Reserva Florestal Adolfo Ducke e em fragmento florestal de propriedade privada localizada no Bairro Tarumã, e sementes de *H. spruceana* foram coletadas no Parque Zoológico e Embrapa Rio Branco (Figura 1).

Figura 1 – Mapas das áreas de coleta de *H. brasiliensis*, *H. guianensis* e *H. spruceana*.



O material vegetal foi armazenado em sacos pretos de polietileno e encaminhado ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal (LFBV). A assepsia se deu por lavagem das

sementes em água corrente, seguida por imersão em hipoclorito de sódio (NaClO) a 1,5% durante cinco minutos e tripla lavagem em água destilada.

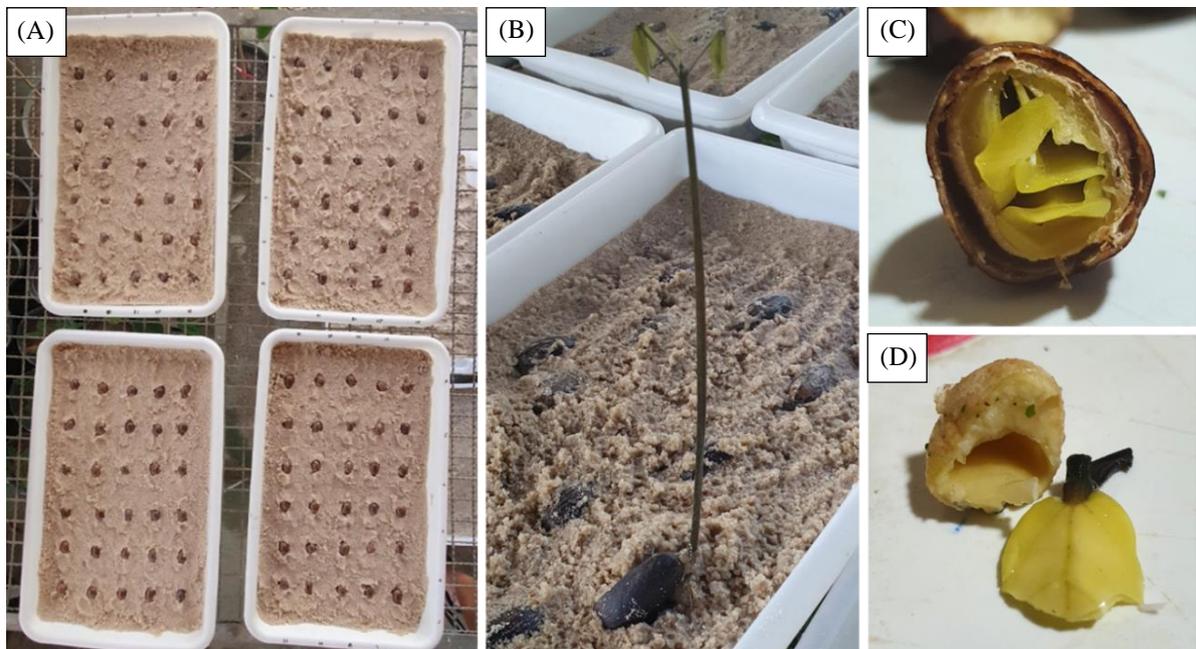
Para os experimentos de morfologia do estabelecimento e de mobilização de ácidos graxos, foram escolhidas quatro fases compreendendo germinação e pós-germinação de maior transformação morfofisiológica: (SQ), emissão da radícula (ER), raízes (RS) e eófilos (EO), adaptado de Carvalho (2017).

4.2 BIOMETRIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO ESTABELECIMENTO INICIAL DAS SEMENTES DE *Hevea* spp.

A biometria foi realizada com auxílio de paquímetro digital, seguida da obtenção das massas das sementes quiescentes. Para a caracterização do estabelecimento inicial foi realizada a identificação morfológica das estruturas durante a germinação e pós-germinação, baseando-se no modelo morfofuncional de Garwood (1996).

Parte das sementes quiescentes tiveram tegumentos, cotilédones e embriões removidos com auxílio de bisturis para obtenção dos endospermas que foram congelados com nitrogênio líquido e mantidos em super freezer (-80 °C). Demais sementes foram semeadas em bandejas contendo 10 cm de substrato de areia lavada e autoclavada, sendo agoadas periodicamente com água destilada (Figura 2).

Figura 2 – Experimento de caracterização morfológica do estabelecimento inicial.



Legendas: Semeadura em bandejas (A), plântula de *H. spruceana* (B) e corte transversal da semente de *H. guianensis* para identificação dos cotilédones (C e D).

Ao avançar da germinação, demais sementes foram coletadas, lavadas e submetidas aos mesmos procedimentos de obtenção de endosperma e congelamento que as sementes quiescentes previamente reservadas.

4.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS FIXOS

Os endospermas obtidos foram liofilizados e, para cada espécie/estádio germinativo, foram triturados os endospermas de cinco sementes, com auxílio de almofariz para obtenção da farinha seca.

A extração seguiu método modificado de Reis *et al.* (2021). Foi utilizado hexano (Sigma-Aldrich, HPLC) como solvente na proporção de 3 mL para 100 mg de farinha de forma seriada em lavadora ultrassônica (Eco-Sonic, Q3.8L): adição de 1 mL de solvente à farinha com extração durante dez minutos a 44 °C. A cada ciclo de extração, as amostras foram centrifugadas durante cinco minutos em 200 x g a 27 °C, tendo o sobrenadante coletado e reservado em vials de 10 mL. Ao fim das extrações, os vials contendo o sobrenadante foram centrifugados nas mesmas condições descritas, para remoção de resquícios da farinha e reservados, em temperatura ambiente durante 24 h, para volatilização do hexano e obtenção dos óleos fixos.

4.4 ANÁLISE DO PERFIL E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

As amostras foram esterificadas através da adição de 2 mL de solução de cloreto de acetila (Acros Organics, HPLC) e metanol (Sigma-Aldrich, HPLC) a 2%, e mantidas em estufa (Ethik Technology, 410/2ND) durante seis horas a 45 °C. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de hexano para suspensão e extração dos ésteres de metila, que foram armazenados em vials de 2 mL.

Para análise dos ésteres, foi realizada diluição de 1:100 em hexano. As diluições foram injetadas com auxílio de injetor automático (Shimadzu, AOC-20I) em cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas (Shimadzu, GCMS-QP2010), contendo coluna capilar (Restek, RTX-5MS). As corridas foram realizadas nas seguintes condições: injeção no modo split de 5:1, temperatura do injetor de 220 °C, curva de aquecimento iniciando em 60 °C com taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹ até 240 °C e temperatura do detector de 250 °C. Foi utilizado hélio como gás de arraste a uma vazão de 1 mL.min⁻¹.

Para quantificação de ácidos graxos, foi obtida a curva analítica a partir de solução FAME MIX (Sulpeco, CRM18918), diluída e injetada nas mesmas condições das amostras.

Para identificação dos compostos, além da comparação com a biblioteca local NIST11, foram comparados as áreas e tempos de retenção das amostras aos cromatogramas do FAME MIX e consulta nas bibliotecas SpectraBase (Wiley) e PubChem Compound Summary.

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com emprego de esquema fatorial de 3 x 4, com três espécies (*H. brasiliensis*, *H. guianensis* e *H. spruceana*) e quatro fases da germinação (SQ, ER, RS e EO), em triplicatas biológicas (cada amostra foi proveniente do *blending* do endosperma de cinco sementes). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias através do teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do programa Prism 8.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BIOMETRIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO ESTABELECIMENTO INICIAL DAS SEMENTES DE *Hevea* spp.

A investigação dos aspectos biométricos das sementes demonstrou diferença significativa ($P < 0,005$) das medidas de comprimento e largura entre *H. brasiliensis*, *H. guianensis* e *H. spruceana*, destacando a semente de *H. guianensis* como a menor, e a semente de *H. spruceana* como a maior. A massa média das sementes foi de 3,14 g para *H. brasiliensis*, 1,7 g para *H. guianensis* e 5,2 g para *H. spruceana* (Tabela 1). Embora não tenham sido encontradas informações acerca da biometria de *H. guianensis*, os valores encontrados se assemelham aos observados na literatura para *H. brasiliensis* e *H. spruceana* (CARVALHO, 2017; LIBERATO, 2010; MATOS, 2019; SANTOS, 2019).

Tabela 1 – Biometria e massa das sementes das espécies de *Hevea*.

Espécies	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Massa (g)
<i>H. brasiliensis</i>	22,26 ± 1,26	18,41 ± 1,17	15,11 ± 1,54	3,14 ± 0,25
<i>H. guianensis</i>	18,94 ± 1,12	14,07 ± 0,74	15,58 ± 0,92	1,70 ± 0,14
<i>H. spruceana</i>	39,38 ± 2,23	22,96 ± 2,02	16,78 ± 1,71	5,24 ± 0,11

Médias ± Desvio Padrão.

A biometria das sementes pode fornecer informações acerca dos aspectos evolutivos interespecíficos (MOLES *et al.*, 2005). Gonçalves, Cardoso e Ortolani (1990) descreveram *H.*

guianensis como possível espécie mais primitiva do gênero *Hevea* devido a sua presença em diferentes ecótipos da bacia Amazônica associada à plasticidade genotípica. É possível supor que ao ter a menor semente do gênero, há preferência na produção de maior quantidade de sementes, sendo essa característica associada à primitividade (TIFFNEY, 1984). Entretanto, não há registro na literatura acerca da diferença de produção de sementes dentre as espécies de *Hevea*. Já *H. brasiliensis* conta com sementes mais robustas, embora sua distribuição seja limitada a áreas com clima de savana (tipo Aw, na classificação Köppen-Geiger). E *H. spruceana* possui a maior semente do gênero, sendo adaptada à hidrocoria com distribuição natural próxima às margens do Rio Negro. Nesse contexto, *H. brasiliensis* e *H. spruceana* compõem o centro secundário de diversidade.

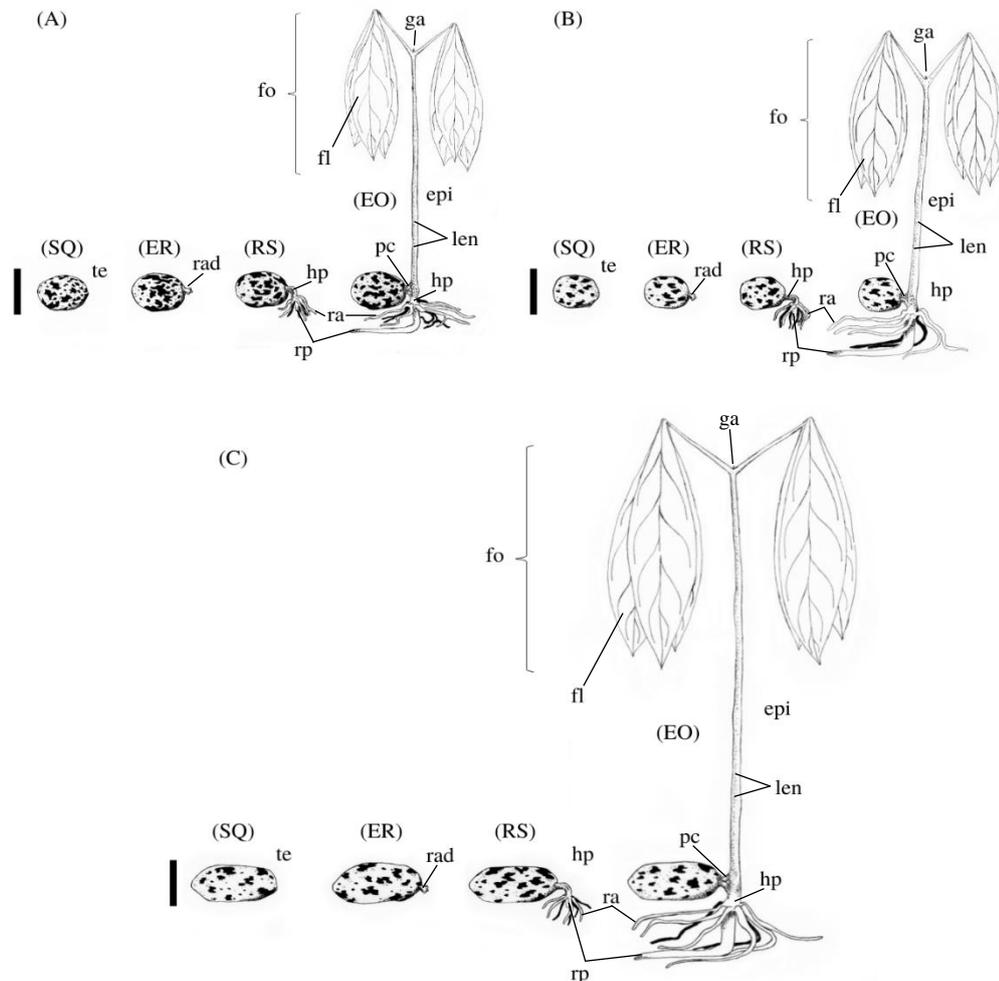
Igea *et al.* (2017) verificaram que a variação de massa das sementes está diretamente relacionada à tolerância ao estresse e às estratégias de dispersão. Sementes pequenas tendem a se dispersar em maiores distâncias, o que promove a colonização de novos ambientes e possibilita a formação de comunidades isoladas (o que favorece a especiação). Essa afirmação dá suporte ao discutido por Gonçalves, Cardoso e Ortolani (1990) sobre *H. guianensis*, em contraste a *H. brasiliensis* e *H. spruceana*.

Quanto às síndromes de dispersão das três espécies, é comentada a frequência de autocoria (pela deiscência explosiva) e zoocoria, sendo essa justificada pela presença de grande quantidade de reservas em seus tecidos (atraindo animais dispersores) (IGEA *et al.*, 2017; MOLES; LEISHMAN, 2008; NILSSON *et al.*, 2010). Além disso, é descrita adaptação à hidrocoria para *H. spruceana*. Sementes que se beneficiam desse mecanismo de dispersão, possuem adaptações que permitem que sejam carregadas pelo fluxo do corpo d'água. Essas sementes tendem a ser grandes e relativamente leves, possuindo ainda um bolsão de ar interno permitindo que a mesma flutue (NILSSON *et al.*, 2010). Nesse contexto, é possível afirmar que a semente de *H. spruceana* possui adaptação a hidrocoria.

Quanto à germinação e pós-germinação, as sementes das três espécies demonstraram padrão morfológico de estabelecimento similar, compreendendo em: i) entumescimento da semente pela embebição, ii) rompimento da micrópila pela protusão da radícula (marcando o final da germinação *stricto sensu*); iii) alongamento do epicótilo e desenvolvimento de raízes (adventícias e posterior raiz primária); iv) emissão dos eófilos; e v) expansão dos eófilos, resultando no consumo total do conteúdo endospermico (Figura 3 A-C). Baseando-se no padrão morfofisiológico de Garwood (1996), o estabelecimento inicial das plântulas de *H. brasiliensis*, *H. guianensis* e *H. spruceana* pode ser classificado como hipógeo-criptocotiledonar, com cotilédones de absorção. Esse padrão corresponde ao descrito na literatura para *H. brasiliensis*

e *H. spruceana* (ALENCAR, 2003; BEWLEY *et al.*, 2013; CARVALHO, 2017; LIBERATO, 2010; MUZIK, 1954).

Figura 3 – Morfologia dos eventos da germinação e pós-germinação.



Legendas: (A) *H. brasiliensis*; (B) *H. guianensis*; (C) *H. spruceana*.

(SQ) semente quiescente; (ER) emissão da radícula; (RS) raízes; (EO) eófilos.

rad – radícula; rp – raiz primária; ra – raízes adventícias; te – testa; pc – pecíolo cotiledonar; epi – epicótilo; len – lenticelas; ga – gema apical; fl – folíolos; fo – folhas. Barra de escala: 2 cm.

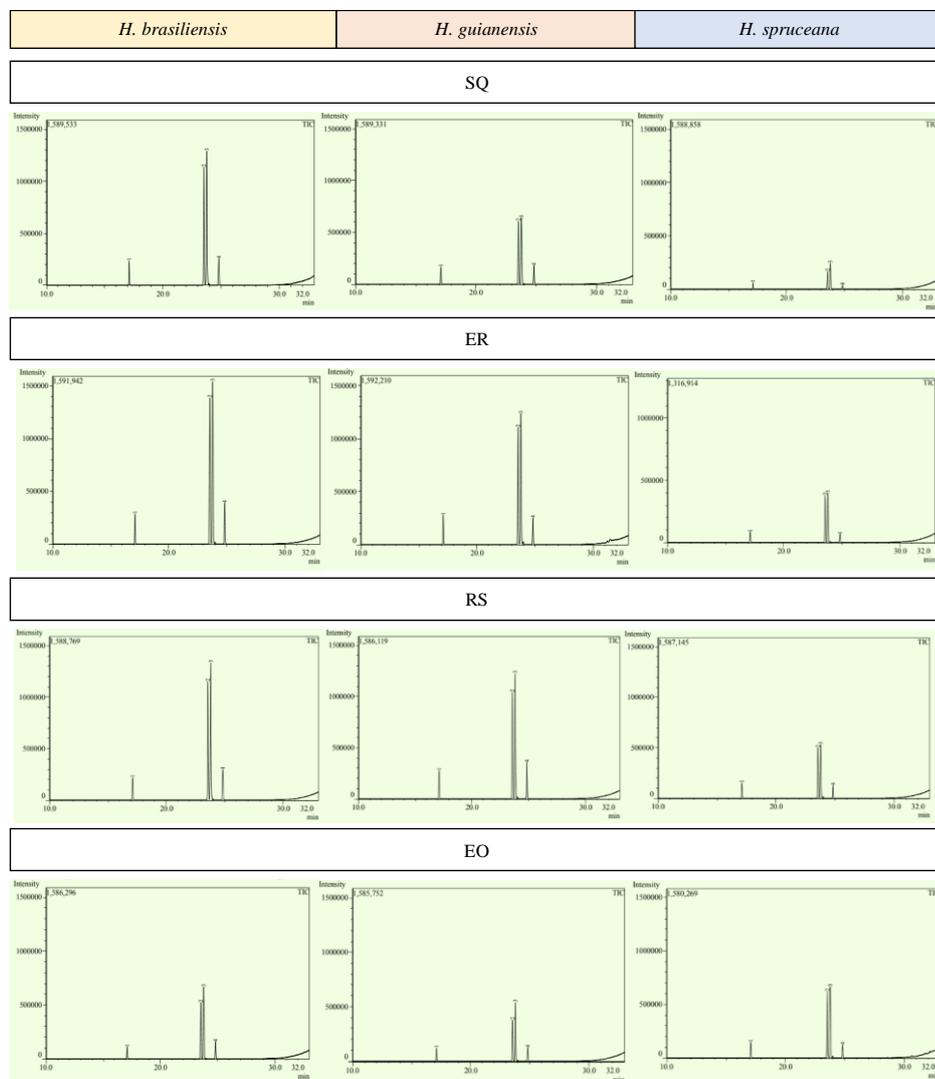
Grande parte das espécies pertencentes à família Euphorbiaceae tem estabelecimento epígeo-fanerocotiledonar, sendo exemplos de exceção o acaçu (*Hura crepitans*) e *Omphalea diandra*, que são epígeo-criptocotiledonares (OLIVEIRA; PEREIRA, 1987). Espécies com germinação do tipo criptocotiledonar, com cotilédones de absorção ou reserva, tendem a ser secundárias tardias ou clímax. Isso é justificado pela presença da grande quantidade de reservas, que atendem as demandas energéticas em ambientes com baixa luminosidade por longos períodos (GARWOOD, 1996; IBARRA-MANRÍQUEZ; RAMOS; OYAMA, 2001; BEWLEY

et al., 2013; TAIZ, 2017). Somado a isso, a ausência de dormência e a característica recalcitrante das sementes associam as espécies de *Hevea* ao sucesso do estabelecimento em estágios sucessionais tardios (AMARAL, 2009; MARINHO *et al.*, 2013; OBROUCHEVA *et al.*, 2017).

5.2 PERFIL E MOBILIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DURANTE ESTÁGIOS GERMINATIVOS DE SEMENTES DE *Hevea* spp.

Foram identificados quatro compostos para as três espécies, sendo eles: éster metílico do ácido *n*-hexadecanóico, éster metílico do ácido 9*Z*,12*Z*-octadecanóico, éster metílico do ácido 9*Z*-octadecanóico e éster metílico do ácido octadecanóico (Figura 4).

Figura 4 – Cromatogramas de ésteres metílicos de diferentes fases germinativas de *Hevea* spp.



Legenda: SQ: semente quiescente; ER: emissão da radícula; RS: raízes; EO: eófilos.

1. éster metílico do ácido *n*-hexadecanóico; 2. éster metílico do ácido 9*Z*,12*Z*-octadecanóico; 3. éster metílico do ácido 9*Z*-octadecanóico; 4. éster metílico do ácido octadecanóico.

A presença desses ácidos graxos é documentada para sementes de *H. brasiliensis*, sendo também encontrados outros ácidos graxos com cadeias variando dentre 14 a 24 carbonos (Tabela 2). Os ácidos graxos se aproximam em composição e quantidade ao observado na literatura para sementes de *Jatropha curcas* (SOTO-LANDEROS *et al.*, 2019). Os ácidos palmítico e oleico também são visualizados em *Ricinus communis*, mas em quantidades inferiores.

Tabela 2 – Composição de ácidos graxos para sementes de *H. brasiliensis* (SQ) em comparação com outras espécies da família Euphorbiaceae.

%									
Ácidos Graxos	<i>H. brasiliensis</i>							<i>Jatropha curcas</i>	<i>Ricinus communis</i>
	(a)*	(b)	(c)	(d)*	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)
C4:0									1,33
C8:0		0,08							0,29
C14:0								0,21	
C16:0	11,27	9,27	10,2	13,85	18,9	9,1	3,47	12,72	0,56
C16:1		0,14						0,58	
C18:0	10,78	10,58	8,7	16,82	10,91	5,6	8,33		
C18:1	27,17	26,64	24,6	64,11	35,91	24	32,05	40,3	5,1
C18:2	50,78	34,92	39,6		33,31	46,2	37,09	45,83	
C18:3		17,27	16,3			14,2	16,4	0,33	
C20:0		0,57						0,32	
C20:1		0,18							
C22:0		0,15							
C22:1				5,22					
C24:0		0,12							

* Em função dos ácidos graxos totais.

(a) Presente estudo.

(b) Nwokolo e Sim (1988).

(c) Ramadhas, Jayaraj e Muraleedharan (2005).

(d) Onoji *et al.* (2016).

(e) Chaikul, Lourith e Kanlayavattanakul (2017).

(f) Roschat *et al.* (2017).

(g) Raknam, Pinsuwan e Amnuait (2020).

(h) Soto-Landeros *et al.* (2019).

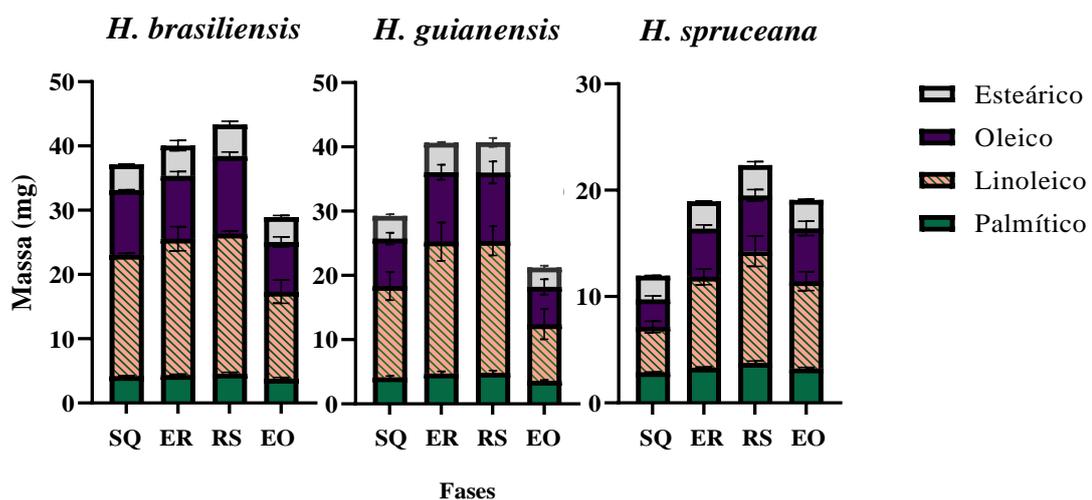
(i) Salimon *et al.* (2010).

Nesse contexto, sementes de espécies da família Euphorbiaceae são reconhecidas pela presença de ácidos graxos incomuns ou não identificados nas suas sementes. Podem ser citados

o ácido ricinoleico, que é o componente majoritário dos óleos fixos de *Ricinus communis*, dos ácidos veronólico e α -parnáríco documentados em *Bernardia pulchella* e *Sebastiania brasiliensis*, e do ácido azelaico nas sementes de *Jatropha curcas* (HUTTON; STUMPF, 1971; SILVA *et al.*, 2014). Em contrapartida, essas espécies, apesar de latescentes, contam com uma quantidade muito inferior ou inexistência de *cis*-1,4-poliisopreno, que é responsável por conferir as propriedades desejáveis da borracha natural (BOTTIER, 2020; SILVA *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2022). Portanto, é possível supor que a menor complexidade da composição dos óleos fixos de sementes de espécies de *Hevea* possa estar relacionada uma preferência pela produção de látex, enquanto demais espécies possuem outras vias metabólicas associadas à defesa e/ou estresse.

Quanto a mobilização geral desses ácidos graxos, *H. spruceana* demonstrou mobilização discreta das reservas lipídicas quando comparada à *H. brasiliensis* e *H. guianensis*, ao qual pôde ser observada maior mobilização entre as fases de RS e EO (Figura 5).

Figura 5 – Visão geral da mobilização de ácidos graxos durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas de diferentes espécies de *Hevea*.



Legenda: SQ – semente quiescente; ER – emissão da radícula; RS – raízes; EO – eófilos.

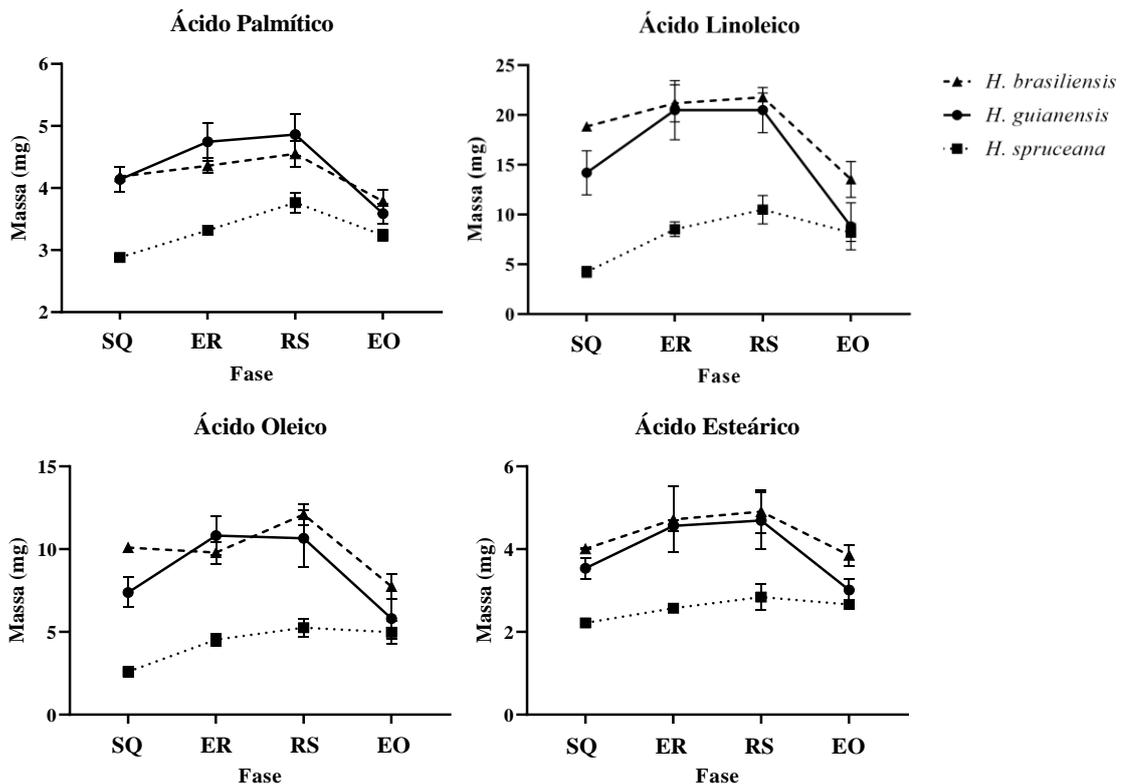
Na comparação interespecífica dos ácidos graxos, para o ácido palmítico foi possível verificar variação significativa entre as fases ER e EO em *H. brasiliensis* e *H. guianensis* ($P = 0,0387$ e $0,0424$ respectivamente). Em *H. spruceana*, verificou-se padrão semelhante com aumento da reserva até a fase RS, mas com aparente início de redução (não significativo, $P = 0,751$) da disponibilidade do ácido graxo no tecido na última fase observada (Figura 6).

Para o ácido linoleico, *H. brasiliensis* demonstrou maior quantitativo em todas as fases, quando comparado às outras espécies (Figura 6). Esse ácido graxo se manteve em maior

quantidade também em *H. guianensis* e *H. spruceana*, em relação aos demais ácidos graxos. Quanto a mobilização desse recurso, o padrão de *H. brasiliensis* apresentou aumento discreto entre as fases de SQ e RS ($P = 0,0341$) seguido de decréscimo entre as fases RS e EO ($P = 0,0486$). A mobilização desse ácido graxo em *H. guianensis* foi semelhante ao verificado para *H. brasiliensis*, porém com redução significativa entre ER e EO ($P = 0,0486$). Em *H. spruceana*, houve aumento significativo entre as fases SQ e RS ($P = 0,0189$) com tendência de redução na fase EO, mas não significativo ($P = 0,1666$).

Para o ácido oleico, em *H. brasiliensis* foi verificada redução significativa entre as fases RS e EO ($P = 0,0169$). Em *H. guianensis* foi visualizado padrão de mobilização semelhante ao do ácido linoleico. Em *H. spruceana* foi verificada mobilização significativa entre as fases SQ e RS ($P = 0,0066$) (Figura 6). Para o ácido esteárico, em *H. guianensis* foi visualizado aumento significativo entre SQ e ER ($P = 0,0152$), com mobilização discreta do ácido na fase EO. Não houve mobilização significativa desse recurso em *H. brasiliensis*. Em *H. spruceana* foi verificado aumento entre as fases SQ e ER ($P = 0,0212$), não apresentando mobilização significativa dessa reserva nas demais fases analisadas (Figura 6).

Figura 6 – Padrão de mobilização dos ácidos palmítico, linoleico, oleico e esteárico durante a germinação e pós-germinação das sementes de *Hevea* spp.



Legenda: SQ – semente quiescente; ER – emissão da radícula; RS – raízes; EO – eófilos.

De acordo com Liberato (2010), os lipídeos se constituem nas principais reservas para promover o desenvolvimento do embrião de *H. spruceana*. Em termos calóricos, a obtenção de energia é mais efetiva pela lipólise que pela glicólise, no qual são obtidos 9 Kcal/g contra 4 Kcal/g (IZQUIERDO *et al.*, 2017). Nesse sentido, a regulação de lipases envolvidas com a mobilização de TAGs, durante a germinação de sementes de plantas selvagens, é mediada em função dos ácidos graxos de maior quantidade nos tecidos de reserva (HELLYER; CHANDLER; BOSLEY, 1999). Carvalho (2017) verificou aumento progressivo da atividade de lipases em sementes selvagens e clonais de *H. brasiliensis* a partir da protusão da radícula, sendo observada maior atividade nos estágios finais (emissão e expansão dos eófilos).

Portanto, é possível afirmar que a mobilização de ácidos graxos está relacionada ao desenvolvimento final da plântula, para as três espécies, sendo ainda mais tardia para *H. spruceana*. Nesse quesito, a via hidrolítica de reservas amiláceas poderá garantir rápido acesso das células à energia necessária para o desenvolvimento inicial da radícula (FANG *et al.*, 2021). Com isso, é possível também sugerir que outro aspecto fisiológico impeça a germinação dessas espécies (especialmente *H. spruceana*) em condições de hipóxia, sendo necessária melhor investigação quanto a mobilização das demais reservas dessas espécies em diferentes condições ambientais.

Isso não exclui a importância desses ácidos graxos, uma vez que, em boa parte das sementes, as reservas em maior quantidade em suas células são consumidas ao final do estabelecimento da plântula (BEWLEY *et al.*, 2013). O que é explícito em *H. brasiliensis* e *H. guianensis*, no qual os ácidos graxos linoleico e oleico, seguido pelo palmítico, são mobilizados intensamente ao final do estabelecimento. Além do envolvimento dos ácidos graxos no fornecimento de energia, sabe-se que produtos intermediários são reaproveitados em outras vias metabólicas (MEP, MEV, via sintética de fitosteróis ou síntese *de novo* de ácidos graxos) (NEELAKANDAN *et al.*, 2010).

Ácidos graxos de cadeia longa, como ácido palmítico, estão associados a produção de ácidos polares, portanto, na estruturação das membranas plasmáticas e aumento da polaridade. Entretanto, é comentado que a maior demanda de ácido palmítico se dá no momento de maturação do fruto (ZHUKOV, 2015). Ácidos graxos de cadeia muito longa (C18 ou mais) estão relacionados na sinalização, regulação hormonal e fluidez membranar (HE; DING, 2020). Os ácidos graxos linolênico e linoleico são preferidos para β -oxidação visando a síntese de jasmonatos, nitroalcanos, glicerolipídeos e cutina/suberina (BACH; FAURE 2010; IZQUIERDO *et al.*, 2017; HE; DING, 2020). Esses compostos derivam da rota dos

octadecanóides, regulado por uma série de genes da família MYC (CHEONG; CHOI, 2003; ZHANG *et al.*, 2022). Para espécies do gênero *Hevea*, esse hormônio está intrinsecamente envolvido com a diferenciação secundária dos vasos laticíferos (HAO; WU, 2000).

Portanto, a presença do ácido linoleico em maior quantidade nas espécies pode estar diretamente relacionada à síntese *de novo* de ácido jasmônico visando a diferenciação dos vasos laticíferos durante a pós-germinação. Além disso, a regulação gerada pelo ácido jasmônico e homólogos em resposta ao estresse, conduz outras vias metabólicas secundárias como MEV e MEP, que geram os precursores de *cis*-1,4-poliisopreno (CHERIAN *et al.*, 2019). A quantidade reduzida dessas reservas em *H. spruceana* pode estar associada à um ajuste metabólico em função do ambiente e da produção inferior tanto em quantidade como qualidade de látex.

Com o desenvolvimento inicial a partir dos hormônios e subprodutos fornecidos pela planta-mãe durante a maturação dos frutos, a mobilização dos ácidos graxos ao relativo final do estabelecimento da plântula pode estar correlacionada ainda com a produção de glicose associada a formação de sucrose ou síntese *de novo* de demais componentes não-isoprênicos do látex, que compõem da fase “gel” do látex (BAE *et al.*, 2020). Além disso, é relatado por Kawahara *et al.* (1996) a suspeita do envolvimento do ácido esteárico na cristalização do látex em baixas temperaturas (em função da reação com compostos isoprênicos). Esse fato pode estar relacionado direta ou indiretamente com a quantidade e mobilização desse ácido graxo pelas espécies de *Hevea*.

De modo geral, ainda são limitados os estudos que envolvam impactos fisiológicos da presença de ácidos graxos (ligados à TAGs, especialmente e subprodutos durante a germinação, além do fornecimento de energia) (BACH; FAURE 2010; IZQUIERDO *et al.*, 2017). Portanto, são necessários esforços para melhor elucidar o real impacto dos ácidos graxos durante o desenvolvimento das plântulas das espécies de *Hevea*.

6. CONCLUSÃO

No que diz respeito à morfologia da germinação de *H. brasiliensis*, *H. guianensis* e *H. spruceana*, as espécies apresentaram o padrão morfológico de estabelecimento da plântula como hipógeo-criptocotiledonar, com cotilédones de absorção.

Foram caracterizados quatro ácidos graxos, sendo eles os ácidos palmítico, linoleico, oleico e esteárico para as três espécies. Desses ácidos, o ácido linoleico foi encontrado em maior quantidade para todas as espécies. Foram visualizadas estratégias distintas de mobilização para *H. spruceana* em comparação às outras duas espécies. À parte das estratégias de mobilização,

é possível afirmar que, para as três espécies, a reserva lipídica é mobilizada em função do desenvolvimento final da plântula.

Destaca-se que este estudo é pioneiro quanto à investigação da dinâmica de mobilização de ácidos graxos de três espécies selvagens de *Hevea*. Diante disso, são sugeridos novos estudos acerca do metabolismo de ácidos graxos durante a germinação e pós-germinação das espécies de *Hevea*, visando compreender melhor os mecanismos de regulação e seu impacto fisiológico.

7. REFERÊNCIAS

ALEIXO, I. F. **Padrões e tendências de 30 anos de floração em espécies arbóreas de terra firme na Amazônia Central**. 2014. 118 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Floresta Tropical) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2014.

ALENCAR, M. A. A. **Mobilização e distribuição de reservas de sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) durante a germinação e o crescimento inicial**. 2003. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

AMARAL, D. D. *et al.* Checklist da flora arbórea de remanescentes florestais da região metropolitana de Belém e valor histórico dos fragmentos, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Naturais**, v. 4, n. 3, p. 231-289, 2009.

ANTWI-WIREDU, A. *et al.* In vitro propagation of rubber tree (*Hevea Brasiliensis*) using shoot-tip and nodal cutting explants. **International Journal of Advances in Scientific Research and Engineering**, v. 4, n. 6, p. 38-50, 2018. DOI: 10.31695/IJASRE.2018.32743.

BACH, L.; FAURE, J. D. Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. **Comptes Rendus Biologies**, v. 333, n. 4, p. 361-370. 2010. DOI: 10.1016/j.crv.2010.01.014.

BAE, S.W. *et al.* Lipid composition of latex and rubber particles in *Hevea brasiliensis* and *Taraxacum kok-saghyz*. **Molecules**, v. 25, n. 21, 5110. 2020. DOI: 10.3390/molecules25215110.

BASKIN, C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. 2 ed. Academic Press: San Diego. 2014. 666 p.

BEWLEY, J. D. *et al.* **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. 3 ed. Springer: New York, 2013. 392 p.

BOTTIER, C. Biochemical composition of *Hevea brasiliensis* latex: a focus on the protein, lipid, carbohydrate and mineral contents. *In*: NAWROT, R. (Ed.). **Advances in Botanical Research**, Academic Press, v. 93, p. 201-237. 2020. DOI: 10.1016/bs.abr.2019.11.003.

CARRERA-CASTAÑO, G. *et al.* An updated overview on the regulation of seed germination. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 1-42. 2020. DOI: 10.3390/plants9060703.

CARVALHO, J. C. **Caracterização morfofuncional e mobilização de reservas primárias durante a germinação e o crescimento inicial de plântulas de *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex ADR de Juss.) Muell. Arg.** 2017. 135 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2017.

CARVALHO, T. C. *et al.* Criopreservação de embriões zigóticos de seringueira (*Hevea brasiliensis*) contendo tecido de reserva. **Ciência Florestal**, v. 31, n. 2, p. 959-973. 2021. DOI: 10.5902/1980509847436.

CHAIKUL, P.; LOURITH, N.; KANLAYAVATTANAKUL, M. Antimelanogenesis and cellular antioxidant activities of rubber (*Hevea brasiliensis*) seed oil for cosmetics. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. 1, p. 56-62. 2017. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.06.009.

CHEONG, J. J.; CHOI, Y. D. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. **Trends in genetics**, v. 19, n. 7, p. 409-413. 2003. DOI: 10.1016/S0168-9525(03)00138-0.

CHERIAN, S.; RYU, S. B.; CORNISH, K. Natural rubber biosynthesis in plants, the rubber transferase complex, and metabolic engineering progress and prospects. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, p. 2041-2061. 2019. DOI: 10.1111/pbi.13181.

COSTA, R. B. *et al.* Melhoramento e conservação genética aplicada ao desenvolvimento local – o caso da seringueira (*Hevea* sp). **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, n. 2, p. 51-58. 2001.

EKA, H. D.; TAJUL ARIS, Y.; WAN NADIAH, W. A. 2010. Potential use of malaysian rubber (*Hevea brasiliensis*) seed as food, feed and biofuel. **International Food Research Journal**, v. 17, p. 527-534. 2009.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. The seed and the metabolism regulation. **Biology**, v. 11, n. 2, p. 1-16. 2022. DOI: 10.3390/biology11020168.

FANG, P. *et al.* The hexokinases HbHXK2 and 4 are key enzymes involved in glucose metabolism and contribute to rubber productivity in *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). **Industrial Crops and Products**, v. 159, 113025. 2021. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.113025.

FERRAZ, I. D. K. *et al.* Características básicas para um agrupamento ecológico preliminar de espécies madeireiras da floresta de terra firme da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 4, p. 621-633. 2004. DOI: 10.1590/S0044-59672004000400014.

GARWOOD, N. C. Functional morphology of tropical tree seedlings. *In*: SWAINE, M. D. (Ed.). **The ecology of tropical forest tree seedlings**, v. 17. UNESCO/ Paris and Parthenon: Paris, 1996. p. 59-129.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed. Embrapa: Brasília, 2012. 255 p.

- Go, W.Z. *et al.* Virulence of *Rigidoporus microporus* isolates causing white root rot disease on rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Malaysia. **Plants**, v. 10, 2123. 2021. DOI: 10.3390/plants1010212.
- GONÇALVES, P. DE S.; CARDOSO, M.; ORTOLANI, A. A. Origem, variabilidade e domesticação da *Hevea*: uma revisão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 135-156, 1990.
- GONÇALVES, A. O.; MONTEIRO, L. L. Aptidão climática para a cultura da seringueira no estado de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, v. 28, n. 237, p. 39-43. 2007.
- GHORBANI, S.; MIGNON, E.; WERBROUCK, S. P. O. *In vitro* rejuvenation of *Hevea brasiliensis*. **Acta Horticulturae**, v. 1, n. 1224, p. 191-194. 2018. DOI: 10.17660/actahortic.2018.1224.25.
- HAO, B. Z.; WU, J. L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid. **Annals of Botany**, v. 85, n. 1, p. 37-43. 2000.
- HE, M.; DING, N. Z. Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response. **Frontiers in plant science**, v. 11, 562785. 2021. DOI: 10.3389/fpls.2020.562785.
- HELLYER, S. A., CHANDLER, I. C., & BOSLEY, J. A. (1999). Can the fatty acid selectivity of plant lipases be predicted from the composition of the seed triglyceride? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1440, n. 2-3, p. 215-224. DOI: 10.1016/s1388-1981(99)00125-0.
- HORA JÚNIOR, B. T. *et al.* Erasing the past: a new identity for the *Damoclean* pathogen causing South American leaf blight of rubber. **PLoS One**, v. 9, n. 8, e104750, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0104750.
- HUTTON, D.; STUMPF, P. K. Fat metabolism in higher plants: the pathway of ricinoleic acid catabolism in the germinating castor bean (*Ricinus communis* L.) and pea (*Pisum sativum* L.). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 142, n. 1, p. 48-60. 1971. DOI: 10.1016/0003-9861(71)90258-x.
- IBARRA-MANRÍQUEZ, G.; RAMOS, M. M.; OYAMA, K. Seedling functional types in a lowland rainforest in Mexico. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 10, p. 1801-1812. 2001. DOI: 10.02307/3558356.
- IGEA, J.; MILLER, E. F.; PAPADOPULOS, A. S.; TANENTZAP, A. J. Seed size and its rate of evolution correlate with species diversification across angiosperms. **PLoS Biology**, v. 15, n. 7, e2002792. 2017. DOI: 10.1371/journal.pbio.2002792.
- IZQUIERDO, N. *et al.* Seed composition in oil crops: its impact on seed germination performance. In: AHMAD, P. (Ed.). **Oilseed Crops: yield and adaptations under environmental stress**. 1 ed. John Wiley & Sons Ltd. 2017. p. 34-51.

JALANI, B. S.; RAMLI, O. Production systems and agronomy: rubber. In: THOMAS, B.; MURPHY, D. J.; MURRAY, B. G. (Eds.). **Encyclopedia of applied plant sciences**. Elsevier/Academic Press: London, 2003. p. 970-978.

JAYASREE, P. K. *et al.* Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature anthers of *Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg. **Current Science**, v. 76, n. 9, p. 1242-1245. 1999.

KADOW, D. *et al.* The cyanogenic syndrome in rubber tree *Hevea brasiliensis*: tissue-damage-dependent activation of linamarase and hydroxynitrile lyase accelerates hydrogen cyanide release. **Annals of botany**, v. 109, n. 7, p. 1253-1262. 2012. DOI: 10.1093/aob/mcs057.

KAWAHARA, S., NISHIYAMA, N., KAKUBO, T. AND TANAKA, Y. Origin of characteristic properties of natural rubber - synergistic effect of fatty acids on crystallization of cis-1,4-polyisoprene : ii mixed and esterified fatty acids in natural rubber. **Rubber Chemistry and Technology**, v. 69, n. 4, p. 608-614. DOI: 10.5254/1.3538388.

KRICKL, S.; TOURAUD, D.; KUNZ, W. Investigation of ethanolamine stabilized natural rubber latex from *Taraxacum kok-saghyz* and from *Hevea brasiliensis* using zeta-potential and dynamic light scattering measurements. **Industrial Crops and Products**, v. 103, p. 169-174. 2017. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.03.046.

LIBERATO, M. A. R. **Metabolismo energético e emissão de compostos orgânicos por *Hevea spruceana* (Benth.) Müll. Arg em diferentes ecossistemas inundáveis da Amazônia Central**. 2010. 140 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

LOURITH, N.; KANALAYAVATTANAKUL, M.; CHAIKUL, P. Para rubber seed oil: the safe and efficient bio-material for hair loss treatment. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 7, p. 2160-2167. 2021. DOI: 10.1111/jocd.13843.

MARINHO, T. A. D. S. *et al.* Distribuição e crescimento de *Garcinia brasiliensis* Mart. e *Hevea spruceana* (Benth.) Müll. Arg. em uma floresta inundável em Manaus, Amazonas. **Ciência Florestal**, v. 23, n. 1, p. 223-232. 2013.

MATOS, M. A. **Biometria de sementes de seringueira *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex A. Juss.) Müll.Arg**. 2019. 42 p. Monografia - Universidade do Estado do Amazonas, Itacoatiara, 2019.

MOREIRA, S. A. F. **Caracterização morfo-anatômica, fisiológica e bioquímica do desenvolvimento de frutos e sementes de seringueira (*Hevea* spp.)**. 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MOLES, A.; LEISHMAN, M. The seedling as part of a plant's life history strategy. In: LECK, M.; PARKER, V.; SIMPSON, R. (Eds.). **Seedling Ecology and Evolution**. Cambridge University Press: Cambridge, 2008. p. 217-238. DOI: 10.1017/CBO9780511815133.012.

MOLES A. T. *et al.* Factors that shape seed mass evolution. **Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10540-10544. DOI: 10.1073/pnas.0501473102.

- MUZIK, T. J. (1954). Development of fruit, seed, embryo, and seedling of *Hevea brasiliensis*. **American Journal of Botany**, v. 41, n. 1, p. 39-43. 1954. DOI: 10.2307/2438580.
- NAIR, K. P. **Tree crops**. 1 ed. Springer, Cham. 2021. 536 p. DOI: 10.1007/978-3-030-62140-7.
- NEELAKANDAN, A. K. *et al.* Molecular characterization and functional analysis of *glycine max sterol methyl transferase 2* genes involved in plant membrane sterol biosynthesis. **Plant Molecular Biology**, v. 74, p. 503-518. 2010. DOI: 10.1007/s11103-010-9692-6.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São. Paulo: Artmed, 2014. 1250 p.
- NILSSON, C.; BROWN, R. L.; JANSSON, R.; MERRITT, D. M. The role of hydrochory in structuring riparian and wetland vegetation. **Biological Reviews**, v. 85, p. 837-858. 2010. DOI: 10.1111/j.1469-185x.2010.00129.x
- NONOGAKI, H.; CHEN, F.; BRADFORD, K. J. Mechanisms and genes involved in germination *sensu stricto*. **Annual Plant Reviews**, v. 27, p. 264-304. 2018. DOI: 10.1002/9781119312994.apr028.
- NWOKOLO, E.; SIM, J. S. Dietary utilization of rubber seed oil by growing chicks. **Tropical Science**, v. 28, p.147-152. 1988.
- OBROUCHEVA, N. V. *et al.* Water relations in germinating seeds. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 64, p. 625-633. 2017. DOI: 10.1134/S102144371703013X.
- OLEINIK, G. *et al.* *In vitro* antioxidant extracts evaluation from the residue of the *Hevea brasiliensis* seed. **Scientific reports**, v. 12, n. 480, p. 1-14. 2022. DOI: 10.1038/s41598-021-04017-w.
- OLIVEIRA, E. C.; PEREIRA, T. S. Euphorbiaceae - morfologia da germinação de algumas espécies. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 9, p. 9-51. 1987.
- ONOJI, S. E.; IYUKE, S. E.; IGBAFE, A. I. *Hevea brasiliensis* (rubber seed) oil: extraction, characterization, and kinetics of thermo-oxidative degradation using classical chemical methods. **Energy and Fuels**, v. 30, n. 12, p. 10555-10567. 2016. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.6b022.
- OYEKUNLE, J. A. O.; OMODE, A. A. Chemical composition and fatty acid profile of the lipid fractions of selected nigerian indigenous oilseeds. **International Journal of Food Properties**, v. 11, p. 273-281. 2008.
- PRIYADARSHAN, P. M. Molecular markers to devise predictive models for juvenile selection in *Hevea* rubber. **Plant Breeding**, v.142, n. 2, p. 1-25. 2022. DOI: 10.1111/pbr.13001.
- RAMADHAS, A.; JAYARAJ, S.; MURALEEDHARAN, C. Biodiesel production from high FFA rubber seed oil. **Fuel**, v. 84, n. 4, p. 335-340. 2005. DOI: 10.1016/j.fuel.2004.09.016.

- RAKNAM, P.; PINSUWAN, S.; AMNUAIKIT, T. Rubber seed cleansing oil formulation and its efficacy of makeup remover. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 11, n. 1, p. 146-155. 2020. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.11(1).146-55.
- RAVINDRAN, V.; RAVINDRAN, G. Some nutritional and anti-nutritional characteristics of para-rubber (*Hevea brasiliensis*) seeds. **Food Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 93–102. 1988. DOI: 10.1016/0308-8146(88)90147-1.
- REIS, A. S.; SANTOS, A. S.; GONÇALVES, J. F. C. Ultrasound-assisted lipid extractions, enriched with sterols and tetranortriterpenoids, from *Carapa guianensis* seeds and the application of lipidomics using GC/MS. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 11, 33160. 2021. DOI: 10.1039/D1RA04776K.
- ROCHA, H. R. *et al.* Seasonality of water and heat fluxes over a tropical forest in eastern Amazonia. **Ecological Applications**, v. 14, p. S22-S32. 2004.
- ROSCHAT, W. *et al.* Rubber seed oil as potential non-edible feedstock for biodiesel production using heterogeneous catalyst in Thailand. **Renewable Energy**, v. 101, p. 937-944, 2017.
- SALIMON, J.; ABDULLAH, B. M.; SALIH, N. Rubber (*Hevea brasiliensis*) seed oil toxicity effect and linamarin compound analysis. **Lipids in health and disease**, v. 11, n. 74, p. 1-8. 2012. DOI: 10.1186/1476-511X-11-74.
- SALIMON, J. *et al.* Fatty acid composition and physicochemical properties of malaysian castor bean *Ricinus communis* L. seed oil. **Sains Malaysiana**, v. 39, n. 5, p. 761-764. 2010.
- SAMPAIO, V. S. *et al.* Malaria in the state of Amazonas: a typical brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 4-11. 2015. DOI: 10.1590/0037-8682-0275-2014.
- SANTOS, L. R. Morfometria de semente de *Hevea spruceana* (Benth.) Müll. Arg. de áreas alagáveis da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Ciências da Amazônia**, v. 8, n. 1, p. 13-17. 2019.
- SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**. 2 ed. Oxford University Press: Oxford, 2006. 440 p.
- SCHULTES, R. E. a new infrageneric classification of *Hevea*. **Botanical Museum Leaflets/Harvard University**, v. 25, n. 9, p. 243-257. 1977.
- SECCO, R. S.; BIGIO, N. C. *Hevea* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB22703>>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- SHUIB, N. H. *et al.* Study on biochemical properties of *Hevea brasiliensis* seeds stored at three different temperatures. **Research Journal of Seed Science**, v. 11, p. 1-11, 2018.
- SILVA, S. I. *et al.* Seed oils of Euphorbiaceae from the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. **Biomass and Bioenergy**, v. 69, p. 124-134. 2014. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.07.010.

- SOOD, A.; CHAUHAN, R. S. Regulation of FA and TAG biosynthesis pathway genes in endosperms and embryos of high and low oil content genotypes of *Jatropha curcas* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 94, p. 253-267. 2015. DOI: 10.1016/j.plaphy.2015.06.015.
- SOTO-LANDEROS, F. *et al.* Seed oil content and composition of *Jatropha curcas* (L.) and grafted *Jatropha curcas* (L.) on *Jatropha cinerea* (Ortega) Muell. Arg. rootstock. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo**, vol. 51, n. 2, p. 68-77. 2019.
- PRABPREE, A. *et al.* Expression profile of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and phenolic content during early stages of graft development in bud grafted *Hevea brasiliensis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 88-95. 2018. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.02.010.
- PONTES, C. J. F. O primeiro ciclo da borracha no Acre: da formação dos seringais ao grande colapso. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 1, n. 1, p. 107-123. 2014.
- PONTES, C. J. F. A guerra no inferno verde: segundo ciclo da borracha, o front da Amazônia e os soldados da borracha. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 1, p. 56-67. 2015.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.
- TAN, D. *et al.* Comparative morphology and transcriptome analysis reveals distinct functions of the primary and secondary laticifer cells in the rubber tree. **Scientific Reports**, v. 7, 3126. 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-03083-3.
- TIFFNEY, B. H. Seed size, dispersal syndromes, and the rise of the angiosperms: evidence and hypothesis. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 71, n. 2, p. 551-576. 1984. DOI: 10.2307/2399037.
- WONG, P. F.; ABUBAKAR, S. Post-germination changes in *Hevea brasiliensis* seeds proteome. **Plant Science**, v. 169, n. 2, p. 303-311. 2005. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.01.018.
- YEBOAH, A. *et al.* Castor oil (*Ricinus communis*): a review on the chemical composition and physicochemical properties. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 399-413. 2021. DOI: 10.1590/fst.19620.
- ZHANG, F. Single-chain mechanics of cis-1,4-polyisoprene and polysulfide. **Polymer**, v. 240, 124473. 2022. DOI: 10.1016/j.polymer.2021.124473.
- ZHANG, S. X. *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of MYC transcription factor family genes in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Forests**, v. 13, n. 531. 2022. DOI: 10.3390/f13040531.
- ZHOU, Q. N. *et al.* Plant regeneration via somatic embryogenesis from root explants of *Hevea brasiliensis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 48, p. 8168-8173. 2010. DOI: 10.5897/AJB10.969.

ZHUKOV, A.V. Palmitic acid and its role in the structure and functions of plant cell membranes. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 62, p. 706-713. 2015. DOI: 10.1134/S1021443715050192.