

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),  
o texto completo desta dissertação será disponibilizado  
somente a partir de 16/01/2020.



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**Morfologia, funcionamento e influência de fatores exógenos no sistema secretor de óleo em espécies vegetais com ênfase no papel do citoesqueleto no processo de secreção**

**LUIZ RICARDO DOS SANTOS TOZIN**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal.

**BOTUCATU-SP**

**2018**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Morfologia, funcionamento e influência de fatores exógenos no sistema secretor de óleo em espécies vegetais com ênfase no papel do citoesqueleto no processo de secreção**

**LUIZ RICARDO DOS SANTOS TOZIN**

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> TATIANE MARIA RODRIGUES**

**ORIENTADORA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Morfologia e Diversidade Vegetal.

**BOTUCATU-SP**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tozin, Luiz Ricardo dos Santos.

Morfologia, funcionamento e influência de fatores exógenos no sistema secretor de óleo em espécies vegetais com ênfase no papel do citoesqueleto no processo de secreção / Luiz Ricardo dos Santos Tozin. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Tatiane Maria Rodrigues

Capes: 20300000

1. Actinas. 2. Lamiaceae. 3. Ultraestrutura (Biologia).  
4. Citoesqueleto. 5. Herbivoria. 6. Microtúbulos.

Palavras-chave: Actina; Herbivoria; Lamiaceae;  
Microtúbulos; Ultraestrutura.

## *Dedicatória*

*Dedico essa conquista aos meus pais, Maria de Lourdes e José Luiz, e a minha vó Ana, que sempre acreditaram em mim, me apoiaram e estiveram ao meu lado.*

## *Agradecimentos*

À **Deus**, por mais essa conquista e por ter me dado suporte nos momentos difíceis.

À **Prof. Dra. Tatiane Maria Rodrigues**, pela dedicação em minha orientação, por confiar e acreditar em mim sempre me incentivando a crescer, por todos os ensinamentos, paciência, conselhos e amizade, pelo comprometimento à ciência e a todos os seus orientados e por ser o exemplo de profissional que um dia almejo me tornar.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela bolsa concedida no país e no exterior (PDSE processo: 88881.131495/2016-01).

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro (Ed Universal 444205/2014-4).

Ao **Instituto de Biociências de Botucatu**, ao **Departamento de Botânica** e ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica)** pela infraestrutura.

Aos **docentes do Departamento de Botânica**, pela convivência, ensinamentos dentro e fora da sala de aula.

À todos **funcionários do Departamento de Botânica**, pela convivência, ensinamentos e auxílios.

À **equipe do Centro de Microscopia Eletrônica**, IBB, UNESP, pela assistência no processamento das amostras.

À **Prof. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques** e ao **Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)**, pela parceria e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa em Anatomia Vegetal I (LaPAV), **Diana, Fernanda, Hugo, Juan, Junior, Katiane, Maela, Maria Ivanilde, Muriel e Stefany**, pelo companheirismo, amizade e apoio.

Aos **amigos dos Laboratórios de Ecologia Vegetal, Fisiologia Vegetal e Anatomia Vegetal II**, pela convivência, amizade e por terem colaborado para tornar a caminhada mais leve.

À todos que me auxiliaram na condução dos experimentos em casa de vegetação, em especial ao **Dr. Filipe Bonfin** e a **Dra. Jordany Gomes**, pelo auxílio na obtenção das estacas; e ao **Felipe Giroto**, pelo imenso auxílio.

À **Angélica Rodrigues** e **Jennifer Búfalo**, pela convivência, amizade e apoio em todos os momentos ao longo desta etapa.

Ao **Dr. Jaideep Mathur**, por ter me recebido e me orientado durante o estágio sanduíche na University of Guelph.

Aos colegas de laboratório na University of Guelph, **Cole Anderson**, **Kathleen Delfosse**, **Kiah Barton**, **Laura Camero** e **Neeta Mathur**, por todos os ensinamentos e paciência.

Aos **amigos que fiz ao longo da minha estadia no Canadá**, que me forneceram suporte, em especial a **Fabieli Feitosa** e a **Geovanna Zaro**, que foram minha família e sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus pais, **José Luiz** e **Maria de Lourdes**, e ao meu irmão, **Luiz Renato**, por serem minha base e meu espelho, e por todo apoio e amor imensurável em todos os momentos.

Aos **funcionários da Biblioteca Central da UNESP, Câmpus Botucatu**, pela edição da ficha catalográfica.

À todos que contribuíram de forma direta ou indireta para concretização deste trabalho. Muito obrigado!!!

## SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	9
Introdução Geral.....	11
Referências Bibliográficas.....	17
Apresentação dos Capítulos.....	24
<b>Capítulo 1</b> – Distribution, morphology and histochemistry of glandular trichomes in <i>Ocimum gratissimum</i> L. (Lamiaceae) emphasizing the cytoskeletal elements involvement in the secretory process	25
Resumo.....	25
Introdução.....	26
Material e Métodos.....	28
Resultados.....	30
Discussão.....	33
Referências Bibliográficas.....	37
Tabelas.....	43
Legenda das figuras.....	44
Figuras.....	47
<b>Capítulo 2</b> – Influence of cytoskeletal polymerization inhibiting drugs and low levels of Ca <sup>+2</sup> on glandular trichomes of two Lamiaceae species	53
Resumo.....	53
Introdução.....	54
Material e Métodos.....	56
Resultados.....	60
Discussão.....	67
Referências Bibliográficas.....	72
Tabelas.....	77
Legenda das figuras.....	80
Figuras.....	86
<b>Capítulo 3</b> – Dynamic of intracellular lipid drop transport involves actin filaments and endoplasmic reticulum in Tobacco cells	97
Resumo.....	97
Introdução.....	98



Material e Métodos.....	99
Resultados.....	100
Discussão.....	101
Referências Bibliográficas.....	104
Legenda das figuras.....	107
Figuras.....	109
<b>Capítulo 4 – Herbivory by leaf-cutter ants changes the glandular trichomes density and the volatile components in an aromatic plant model</b>	111
Resumo.....	111
Introdução.....	112
Material e Métodos.....	114
Resultados.....	117
Discussão.....	119
Referências Bibliográficas.....	122
Tabelas.....	129
Figuras.....	130
Considerações Finais.....	132

TOZIN, L. R. S. **Morfologia, funcionamento e influência de fatores exógenos no sistema secretor de óleo em espécies vegetais com ênfase no papel do citoesqueleto no processo de secreção.** 2018. 133p. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**Resumo** – A morfologia, histoquímica e ultraestrutura dos tricomas glandulares têm sido estudadas em muitas espécies vegetais. Entretanto, alguns aspectos têm sido pouco abordados, como o envolvimento do citoesqueleto na morfologia e funcionamento glandular. Estudo recente demonstrou a relação entre a predominância de filamentos de actina e microtúbulos em células secretoras e a composição da secreção em tricomas glandulares. Além disso, pesquisas têm comprovado o envolvimento dos elementos do citoesqueleto na origem e manutenção dos tricomas tectores em plantas, sem informações para os tricomas glandulares. Sabe-se que o funcionamento do citoesqueleto está relacionado com a disponibilidade do cálcio, sendo que baixas concentrações desse íon podem prejudicar processos modulados por microtúbulos e actina. Apesar da presença de tricomas glandulares representar um caráter constitutivo em diversas espécies vegetais, fatores exógenos podem influenciar o desenvolvimento e o funcionamento glandular. Estudos têm mostrado que o ataque de herbívoros induz a formação de tricomas glandulares, levando a produção de substâncias com potencial repelente ou inseticida. Os objetivos desse trabalho foram investigar o papel do citoesqueleto na morfogênese e funcionamento de tricomas glandulares e no transporte lipídico em células secretoras de óleo, além de investigar a influência da herbivoria no desenvolvimento e funcionamento de tricomas glandulares. Foram estudadas duas espécies de Lamiaceae (*Hyptis villosa* e *Ocimum gratissimum*) e a espécie modelo *Nicotiana benthamiana*. Experimentos com drogas inibidoras da polimerização do citoesqueleto e doses decrescentes de cálcio foram realizados com *O. gratissimum* e *H. villosa*. Plantas de *N. benthamiana* foram infiltradas com *Agrobacterium* modificado

para marcação de gotas de óleo, plastídios, retículo endoplasmático, actina e microtúbulos. Além disso, indivíduos de *O. gratissimum* foram submetidos ao ataque de formigas cortadeiras. Análises estruturais foram realizadas aos microscópios de luz (campo claro e confocal) e eletrônico (varredura e transmissão). Além disso, foram realizadas análises de composição química de voláteis e de trocas gasosas. Três morfotipos de tricomas glandulares foram identificados em *O. gratissimum*; microtúbulos foram intensamente marcados em células secretoras de lipídios, enquanto filamentos de actina foram fortemente marcados em células secretoras de compostos hidrofílicos. As drogas desestabilizantes do citoesqueleto e baixos níveis de  $Ca^{+2}$  não afetaram a morfologia externa dos tricomas; entretanto, acarretaram danos estruturais nas paredes e no protoplasto das células secretoras em *O. gratissimum* e *H. villosa*. A composição química dos voláteis não foi alterada pelos diferentes níveis de  $Ca^{+2}$ . Em *N. benthamiana* foi observado que as gotas de óleo se movimentam no citoplasma pelo retículo endoplasmático ancorado aos filamentos de actina, sugerindo um mecanismo de diferente do descrito em células animais. A herbivoria promoveu respostas diferenciais de cada morfotipo glandular em *O. gratissimum* sugerindo a ocorrência de uma compartimentalização de funções entre os tricomas; além disso, foram detectadas alterações na composição dos componentes voláteis produzidos. Esse trabalho envolveu diferentes abordagens, várias delas inéditas, para o estudo do sistema secretor de óleo em plantas. Diferentes aspectos sobre o sistema secretor de óleo em espécies vegetais foram elucidados, gerando novas perspectivas para estudos mais aprofundados.

**Palavras-chave:** actina, herbivoria, Lamiaceae, microtúbulos, *Nicotiana benthamiana*, óleo essencial, tricomas, ultraestrutura.

TOZIN, L. R. S. **Morphology, functioning and influence of exogenous factors in the oil secretory system in plant species with emphasis on the role of the cytoskeleton in the secretory process.** 2018. 133p. Ph.D. THESIS – INSTITUTE OF BIOSCIENCES, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**Abstract** – The morphology, histochemistry and ultrastructure of glandular trichomes have been studied in many plant species. However, some aspects have been poorly approached, such as the involvement of the cytoskeleton on the gland morphology and functioning. Recent study demonstrated a relation between the predominance of actin filaments and microtubules in secretory cells and the secretion composition in glandular trichomes. In addition, researches have proven the involvement of the cytoskeletal elements in the origin and maintenance of non-glandular trichomes in plants, with no information for glandular trichomes. It is known that the cytoskeleton functioning is related with calcium availability and that low concentration of this ion can harm process modulated by actin filaments and microtubules. Despite the presence of glandular trichomes is a constitutive character in several plant species, exogenous factors can influence their development and functioning. Studies have showed that herbivore attacks induce the glandular trichomes formation, leading to the production of substances with repellent and insecticide potential. This work aimed to investigate the role of cytoskeleton in the glandular trichome morphogenesis and functioning, and in the lipid transport in oil secretory cells, in addition to investigate the influence of herbivory in the glandular trichomes formation and functioning. We studied two Lamiaceae species (*Hyptis villosa* and *Ocimum gratissimum*) and the model species *Nicotiana benthamiana*. Experiments with inhibitors of cytoskeletal element polymerization and decreasing calcium levels were performed with *H. villosa* and *O. gratissimum*. *N. benthamiana* plants were infiltrated with modified *Agrobacterium* for labeling lipid drops, plastids, endoplasmic reticulum, actin filaments and microtubules.

In addition, individuals of *O. gratissimum* were submitted to leaf-cutter ants attack. Structural analysis were performed using light (bright field and confocal) and electronic (scanning and transmission) microscopes. In addition, we performed analysis of the the chemical composition of the volatile components and of gas-exchanges. Three morphotypes of glandular trichomes were identified in *O. gratissimum*; microtubules were intensely labeled in secretory cells of lipophilic compounds, while actin filaments were strongly labeled in secretory cells of hydrophilic substances. The inhibitors of cytoskeletal elements polymerization and low levels of calcium did not affect the external morphology of the trichomes; however, lead to structural damages in the cell wall and protoplast of secretory cells of *O. gratissimum* and *H. villosa*. The chemical composition of volatile components was not affected by low levels of  $Ca^{+2}$ . In *N. benthamiana* we observed that lipid drops move in the cytoplasm by the endoplasmic reticulum anchored on the actin filaments; this suggests a different mechanism described for animal cells. The herbivory promoted differential answers in each glandular trichome morphotype in *O. gratissimum*; this suggests the occurrence of a compartmentalization of functions among the trichomes; in addition, we detected alterations in the chemical composition of the volatile components produced by attacked plants. This work involved different approaches, several of them innovative, for the study of the oil secretory system in plants. Different aspects about the oil secretory system in plants were elucidated, opening new avenues for further studies.

**Keywords:** actin, essential oil, herbivory, Lamiaceae, microtubules, *Nicotiana benthamiana*, trichomes, ultrastructure.

## INTRODUÇÃO GERAL

Tricomas glandulares são apêndices epidérmicos uni ou multicelulares especializados na secreção de substâncias de natureza química diversa, que pode ser lipofílica, hidrofílica ou mista. Tais substâncias apresentam grande importância na interação da planta com o ambiente (Fahn 1979; Werker 2000; Evert 2006), podendo atuar na atração de polinizadores e agentes dispersores de frutos e sementes (Harbone 1993; Langenheim 2003; Castro & Machado 2006), além de conferir proteção contra ataques de herbívoros e patógenos, altas temperaturas e intensidade luminosa (Harbone 1993; Langenheim 2003; Valkama et al. 2003).

Os tricomas glandulares apresentam morfologia bastante variada, sendo comum a ocorrência de diferentes morfotipos glandulares em um mesmo órgão de uma mesma planta (Serrato-Valenti et al. 1997; Ascensão & Pais 1998; Tozin et al. 2015a; Silva et al. 2016). Nesse sentido, estudos recentes têm demonstrado que tricomas glandulares presentes num mesmo órgão podem produzir substâncias de natureza química diferente, propondo uma correlação entre o morfotipo glandular e a composição da secreção produzida (Tozin et al. 2015a; Silva et al. 2016).

Análises ultraestruturais mostram que os aspectos celulares dos tricomas glandulares estão associados com a composição da secreção produzida, sendo que a diversidade de organelas nas células secretoras varia de acordo com a natureza química da secreção (Werker 2000; Tozin et al. 2015a; Silva et al. 2016). Assim, em tricomas produtores de substâncias predominantemente lipofílicas, a característica ultraestrutural mais comum das células secretoras é a proliferação do retículo endoplasmático liso (Werker 2000; Silva et al. 2016), além da ocorrência de plastídios polimórficos desprovidos de tilacóides (Werker 2000; Evert 2006; Tozin et al. 2015a). Diferentemente, a principal característica das células secretoras de substâncias

hidrofílicas é a abundância de dictiossomos hiperativos na produção de vesículas (Fahn 1979; Evert 2006; Tozin et al. 2015a).

Apesar de reconhecida a origem protodérmica dos tricomas glandulares, estudos sobre o processo de formação dessas glândulas em nível celular são bastante escassos, principalmente no que se refere ao papel do citoesqueleto nos processos ontogenéticos. Trabalhos têm demonstrando o papel do citoesqueleto na formação e manutenção de tricomas tectores em *Arabidopsis* (Szymanski et al 1999; Kost et al. 1999; Mathur et al. 1999), mas não em tricomas glandulares. Os microtúbulos exercem papel fundamental na formação do pedúnculo e na iniciação de ramificações dos tricomas tectores, determinando sua morfologia básica, enquanto que os filamentos de actina atuam principalmente nas fases finais do desenvolvimento destes tricomas atuando no alongamento de suas ramificações e na manutenção de sua forma madura (Kost et al. 1999; Mathur et al. 1999). Estudos demonstram ainda que problemas na polimerização dos filamentos de actina podem impedir a formação de tricomas tectores em *Arabidopsis* (Szymanski et al. 1999). Quanto ao papel do citoesqueleto na origem e funcionamento de tricomas glandulares, estudos não foram encontrados.

No que se refere à atuação do citoesqueleto nos processos subcelulares da secreção em células vegetais, sabe-se que a manutenção de vacúolos e o movimento e ancoragem de vesículas e organelas no citoplasma são realizadas pelos filamentos de actina (Evert 2006 e literatura citada). Quanto aos microtúbulos, desde o século passado, estudos têm apontado seu envolvimento na movimentação intracelular das gotas de óleo em células animais (Welte et al. 1998; Targett-Adams et al. 2003; Zehmer et al. 2009). Mais recentemente, em trabalho envolvendo a marcação diferencial dos elementos do citoesqueleto por técnicas de imunofluorescência em tricomas glandulares de uma espécie de Lamiaceae, Tozin & Rodrigues (2017) mostraram intensa marcação

de microtúbulos em células secretoras de substâncias lipídicas, enquanto que filamentos de actina foram intensamente corados em células produtoras de secreção predominantemente hidrofílica, e ambos os elementos foram marcados em células secretoras se substâncias mista. Esses resultados são inéditos para células secretoras em plantas e reforçam a necessidade de estudos mais profundos para o melhor entendimento do envolvimento do citoesqueleto no processo secretor em células vegetais.

O funcionamento do citoesqueleto está intimamente relacionado com a disponibilidade de alguns minerais, principalmente o cálcio (Hepler 2005). A interação entre elementos do citoesqueleto e o cálcio tem sido demonstrada em estudos envolvendo células motoras (Yao et al. 2008; Chen et al. 2013), sendo conhecido seu papel como mediador na polimerização dos filamentos de actina (Hwang & Lee 2001; Chen et al. 2013). Assim, a deficiência de cálcio pode acarretar diversos problemas nos processos modulados pelo citoesqueleto (Hepler 2005), como se supõem ser o caso dos processos de desenvolvimento e funcionamento dos tricomas glandulares.

Além da disponibilidade de nutrientes importantes para o desenvolvimento vegetal, como o cálcio, outros fatores exógenos como intensidade luminosa, temperatura, injúrias mecânicas, dentre outros, podem influenciar a formação e funcionamento das estruturas secretoras nas plantas (Langenheim 2003; Rosner & Hanrup 2004; Moreira et al. 2008). Dentre estes fatores, o efeito da herbivoria no desenvolvimento e funcionamento do sistema secretor é um dos mais conhecidos (Dalin et al. 2008). Em diversas espécies de plantas, o ataque de herbívoros resulta na produção de maior densidade de tricomas glandulares (Baur et al. 1991; Dalin et al. 2008), o que tem sido associado a produção de substâncias com potencial repelente que levam a um incremento na proteção dos órgãos formados após ataque de herbívoros



(Dalin et al. 2008). Nesse sentido tem sido registrado que diversas espécies vegetais produzem substâncias induzidas especificamente pelo ataque de herbívoros – herbivore-induced plant volatiles (HIPVs) (Dicke et al. 2003; Unsicker et al. 2009; Tozin et al. 2015b).

Apesar da conhecida plasticidade dos tricomas glandulares no que se refere à densidade e funcionamento (Dalin et al. 2008; Tozin et al. 2015b, 2017), a presença dessas glândulas em órgãos aéreos vegetativos e/ou reprodutivos é um aspecto constitutivo comum a numerosas famílias de eudicotiledôneas, dentre elas Lamiaceae (Metcalf & Chalk 1950). Espécies pertencentes à Lamiaceae possuem tricomas glandulares com morfologia diversificada como os principais sítios de secreção de metabólitos secundários que conferem a essas plantas propriedades aromática e medicinal (Fahn 1979; Ascensão et al. 1995).

Estudos sobre a morfologia de tricomas em espécies de Lamiaceae são abundantes, havendo informações sobre espécies pertencentes a diferentes gêneros (Werker et al. 1993; Ascensão et al. 1995, 1998; Serrato-Valenti et al. 1997; Ascensão & Pais 1998; Turner et al. 2000; Kaya et al. 2007; Milaneze-Gutierrez et al. 2007; Huang et al. 2010; Rodrigues et al. 2013). De forma geral, apesar da abundância de estudos sobre a morfologia de tricomas em Lamiaceae, pesquisas envolvendo espécies nativas são escassas. Da mesma forma, trabalhos envolvendo os aspectos celulares da secreção em tricomas glandulares de Lamiaceae são restritos a poucas espécies (Ascensão et al. 1995; Ascensão & Pais 1998; Huang et al. 2010; Tozin & Rodrigues 2017).

Neste trabalho, estudamos as espécies *Hyptis villosa* Pohl ex Benth. e *Ocimum gratissimum* L. pertencentes a Lamiaceae. O gênero *Hyptis* é constituído por cerca de 400 espécies distribuídas do Sul dos Estados Unidos até a Argentina. No Brasil, possui cerca de 200 espécies, sendo pelo menos 146 endêmicas (Falcão & Menezes 2003;

Harley et al. 2013). Espécies deste gênero são amplamente utilizadas pela indústria farmacêutica e na medicina popular em diversos países devido as atividades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e inseticida da secreção produzida por seus tricomas (Falcão & Menezes 2003). Além disso, estudos mostram que as substâncias extraídas de espécies de *Hyptis* apresentam potencial para a diminuição da carga viral do HIV (Falcão & Menezes 2003). No Cerrado paulista, *Hyptis villosa*, conhecida popularmente como hortelã-do-cerrado, é bastante comum (Durigan et al. 2004). Estudos demonstram que o óleo essencial produzido por esta espécie é rico em espatulenol, epi- $\alpha$ -cadinol e biciclogermacreno (Silva et al. 2013). Os tricomas glandulares de *H. villosa*, principais sítios produtores de tais substâncias bioativas, foram descritos por Tozin & Rodrigues (2017). Estes autores descreveram quatro morfotipos de tricomas glandulares, facilmente distinguíveis. O gênero *Ocimum* corresponde a um grupo de espécies com ampla importância econômica devido à produção de óleos essenciais largamente explorados por indústrias farmacêuticas e alimentícias. As espécies pertencentes a este gênero são amplamente distribuídas na África, América e Ásia (Orafidiya et al. 2004; Tchoumboungang et al. 2006). *Ocimum gratissimum*, popularmente conhecida como alfavaca ou alfavaca-cravo, possui óleo essencial rico em eugenol (Silva et al. 1999; Fernandes et al. 2013) e 1-8 cineol (Silva et al. 1999). A espécie tem sido bastante utilizada como condimento e na medicina popular para o tratamento de diversas doenças (Albuquerque et al. 2007; Di Stasi et al. 2002) como reumatismo, paralisias e transtornos mentais (Effraim et al. 2001). Além disso, diversos trabalhos têm demonstrado as propriedades bactericida (Matasyoh et al. 2007) e fungicida (Faria et al. 2006) de seus extratos. Entretanto, estudos sobre as características morfológicas das glândulas produtoras dos compostos bioativos nessa espécie não foram encontrados.

Além das duas espécies de Lamiaceae mencionadas acima, nesse trabalho empregamos a espécie modelo *Nicotiana benthamiana* Domin (Solanaceae) para estudos com abordagens moleculares. *Nicotiana benthamiana*, conhecida popularmente como tabaco, tem sido amplamente utilizada na literatura para estudos em associação com *Agrobacterium*, a fim de se promover a marcação de estruturas específicas com proteínas fluorescentes – GFP, RFP, YFP (Wahlroos et al. 2003; Sohn et al. 2014; Petre et al. 2017). A espécie produz grande quantidade de óleo, e, portanto, mostrou-se um importante modelo para o estudo do sistema secretor.

Os objetivos desse trabalho foram investigar o papel do citoesqueleto na morfogênese e funcionamento de tricomas glandulares e no transporte lipídico em células secretoras de óleo, além de investigar a influência da herbivoria no desenvolvimento e funcionamento de tricomas glandulares. Para isso, a) descrevemos a morfologia, histoquímica e aspectos subcelulares dos tricomas glandulares de *O. gratissimum*, com ênfase na distribuição dos elementos do citoesqueleto; b) investigamos o efeito do cálcio e de drogas desestabilizantes do citoesqueleto nos aspectos morfogenéticos, subcelulares e funcionais dos tricomas glandulares de *H. villosa* e *O. gratissimum*; c) investigamos a dinâmica do transporte intracelular de gotas de óleo utilizando a espécie modelo *Nicotiana benthamiana* (tabaco); e d) avaliamos a influência da herbivoria por formigas cortadeiras na densidade glandular e na composição química dos voláteis em *O. gratissimum*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho vem preencher importantes lacunas existentes na literatura no que se refere à morfologia e funcionamento do sistema secretor de óleo em plantas, enfatizando o papel do citoesqueleto no processo secretor, além de trazer informações sobre a influência de fatores exógenos no desenvolvimento e funcionamento glandular.

*Ocimum gratissimum* possui três morfotipos de tricomas glandulares produtores de substâncias de natureza química diversa. A distribuição dos elementos dos filamentos de actina e dos microtúbulos nas células dos tricomas glandulares foi associada com os compostos produzidos por cada célula. Estes dados corroboram resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa em estudo inédito realizado em tricomas glandulares e resultados conhecidos para células animais.

Ficou comprovado que o citoesqueleto exerce papel fundamental na morfologia e funcionamento dos tricomas glandulares. A utilização de drogas desestabilizadoras do citoesqueleto e de baixa disponibilidade de cálcio, numa abordagem inédita para estruturas secretoras em plantas, produziu alterações subcelulares importantes nas células glandulares de *H. villosa* e *O. gratissimum*. Cabe salientar que *O. gratissimum* mostrou-se um bom modelo para esses estudos por apresentar efetiva propagação vegetativa por meio de estacas, com 100% de enraizamento, além de moderada densidade de tricomas glandulares de três morfotipos facilmente reconhecíveis. Já *H. villosa* possui grande densidade de tricomas glandulares, o que dificulta o estudo de cada morfotipo glandular de forma individualizada; além disso, enfrentamos sérios problemas em seu enraizamento por meio de estacas, tendo obtido taxa de sucesso de apenas 6%.

Os dados apresentados no terceiro capítulo são frutos de estágio sanduíche realizado no *Laboratory of Plant Development and Interactions, Department of*

*Molecular and Cellular Biology, University of Guelph, Canadá, sob orientação do Prof. Dr. Jaideep Mathur. Utilizando *Nicotiana benthamiana* como modelo, pudemos mostrar a dinâmica intracelular do transporte das gotas de óleo em células vegetais. Interessantemente, nossos dados mostraram o grande envolvimento dos filamentos de actina (ancorando porções do retículo endoplasmático) no movimento das gotas de óleo no protoplasto, contrariamente ao observado em células animais onde os microtúbulos são considerados os elementos de maior envolvimento no transporte lipídico. Assim, fica evidente que a dinâmica intracelular do transporte de óleo em células animais e vegetais pode ocorrer por diferentes mecanismos.*

Embora o efeito da herbivoria na densidade de tricomas glandulares e na quantidade e composição da secreção seja conhecido, esse trabalho é inédito por considerar o efeito da herbivoria por formigas cortadeiras em cada morfotipo de tricoma glandular. Nossos resultados mostraram que cada morfotipo glandular em *O. gratissimum* responde de forma distinta ao estímulo levando a ideia de uma compartimentalização de funções no sistema de defesa das plantas. A alteração na composição química das substâncias voláteis registradas aqui por efeito da herbivoria merece atenção, principalmente pelo fato de se tratar de uma espécie amplamente utilizada como alimentícia.

As diferentes abordagens empregadas nesse estudo, várias delas inéditas para estudos com estruturas secretoras em plantas, permitiram que diferentes aspectos sobre a estrutura e funcionamento do sistema secretor de óleo em espécies vegetais fossem elucidados, gerando novas perspectivas para outras pesquisas em abordagens mais aprofundadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque, U.P.; Medeiros, P.M.; Almeida, A.L.S.; Monteiro, J.M.; Lins Neto, M.F.; Melo, J.G.; Santos, J.P. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol* v. 114, 325–354.
- Ascensão, L.; Marques, N.E.; Pais, M.S. (1995). Glandular Trichomes on Vegetative and Reproductive Organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Ann Bot.* v.75, 619-626.
- Ascensão, L.; Figueiredo, A.C.; Barroso, J.G.; Pedro, L.G.; Schripsema, J.; Deans, S.G.; Scheffer, J.J.C. (1998). *Plectranthus madagascariensis*: morphology of the glandular trichomes, essential oil composition, and its biological activity. *Int J Plant Sci.* v.159, 31-38.
- Ascensão, L.; Pais, M.S. (1998) The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. *Ann Bot.* v. 81, 263-271.
- Baur, R.; Binder, S.; Benz, G. (1991). Non glandular leaf trichomes as short-term inducible defence of the grey alder, *Alnus incana* (L.), against the chrysomelid beetle, *Agelastica alni* L. *Oecologia* v. 87, 219–226.
- Castro, M.M.; Machado, S.R. (2006). Células e tecidos secretores. In: Anatomia vegetal. Apezatto-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S. M. (2006). (Eds). Viçosa, UFV.
- Chen, D.; Acharya, B. R.; Liu, W.; Zhang, W. (2013). Interaction between calcium and actin in guard cell and pollen signaling networks. *Plants.* v. 2(4), 615-634.
- Dalin, P.; Agren, J.; Björkman, C.; Huttunen, P.; Kärkkäinen, K. (2008). Leaf Trichome Formation and Plant Resistance to Herbivory. In: Schaller A. (ed). *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Springer Science+Business Media.

- Dicke, M.; Agrawal, A.A.; Bruin, J. (2003). Plants talk, but are they deaf? Trends in Plant Science v. 8, 403–405.
- Di Stasi, L.C.; Oliveira, G.P.; Carvalhaes, M.A.; Queiroz Jr, M.; Tien, O.S.; Kakinami, S.H.; Reis, M.S. (2002). Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. Fitoterapia 73, 69–91.
- Durigan, G.; Baitello, J.B.; Franco, G.A.D.C.; Siqueira, M.F. (2004). Plantas do Cerrado Paulista: Imagens de uma paisagem ameaçada. Páginas & Letras Editora e Gráfica, São Paulo.
- Effraim, K.D.; Jacks, T.W.; Sodipo, O.A. (2001). Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leave extract on some organs of rabbit. African. Journal Biomedical Research 6: 21-25.
- Evert, R.F. (2006). Esau's Plant Anatomy. 3a. ed. Wiley-Interscience, New Jersey.
- Fahn, A. (1979). Secretory tissues in plants. Academic Press, London.
- Falcão, D.Q.; Menezes, F.S. (2003). Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. Rev Bras Farm. v. 84(3), 69-74.
- Faria, T.J.; Ferreira, R.S.; Yassumoto, L.; Souza, J.R.P.; Ishikawa, N.K.; Barbosa, A.M. (2006). Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. Braz Arch Biol Technol v. 49: 867-871.
- Fernandes, V.F.; Almeida, L.B.; Feijó, E.V.R.S.; Silva, D.C.; Oliveira, R.A.; Mielke, M.S.; Costa, L.C.B. (2013). Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. Rev Bra Farmac 23(3): 419-424.
- Harbone, J.B. (1993). Plant toxins and their effects on animals. In: Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press, London, 71-103p.

- Harley, R.; França, F.; Santos, E.P.; Santos, J.S.; Pastore, J.F. (2013). Lamiaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8183> (18 Outubro 2013).
- Hepler, P.K. (2005). Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell*, v.17, 2142-2155.
- Huang, S.S.; Liao, J.P.; Kirchoff, B.K. (2010). Calcium distribution and function in the glandular trichomes of *Lavandula pinnata* L. *J Tor Bot Soc.* v.137, 1-15.
- Hwang, J.; Lee, Y. (2001). Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiol.* v. 125(4), 2120-2128.
- Kaya, A.; Demirci, B.; Baser, K.H.C. (2007). Micromorphology of glandular trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. & Mey. var. *congesta* (Lamiaceae) and chemical analysis of the essential oils. *S Afr J Bot.* v. 73, 29-34.
- Kost, B.; Mathur, J.; Chua, N. (1999). Cytoskeleton in plant development. *Current Opinion in Plant Biol.* v.2, 462-470.
- Langenheim, J.H. (2003). *Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany.* Portland, Cambridge: Timber Press.
- Matasyoh, L.G.; Matasyoh, J.C.; Wachira, F.N.; Kinyua, M.G.; Muigai, A.G.W.; Mukiana, T.K. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. *Afr J Biotechnol* v. 6, 760-765.
- Mathur, J.; Speilhofer, P.; Kost, B.; Chua, N. (1999). The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* v. 126, 5559-5568.



- Metcalfe, C.R.; Chalk, L. (1950). *Anatomy of the dicotyledons II*. Clarendon, Oxford. 1500p.
- Milaneze-Gutierrez, M.A.; Famelli, M.C.; Capel, L.S.; Romagnolo, M.B. (2007). Caracterização morfológica dos tricomas foliares e caulinares de duas espécies de Lamiaceae conhecidas popularmente como “falso-boldo”. *Acta Sci Biol Sci*. v.29, 125-130.
- Moreira, X.; Sampedro, L.; Zas, R.; Solla, A. (2008). Alterations of the resin canal system of *Pinus pinaster* seedlings after fertilization of healthy and of a *Hylobius abietis* attacked stand. *Trees*. v. 22, 771-777.
- Orafidiya, L.O.; Agbani, E.O.; Iwalewa, E.O.; Adelusola, K.A.; Oyedapo, O.O. (2004). Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. *Phytomedicine* v. 11, 71–76.
- Petre, B.; Win, J.; Menke, F.L.H.; Kamoun, S. (2017). Protein-protein interaction assays with effector-GFP fusions in *Nicotiana benthamiana*. *Methods in Molecular Biology* v.1659, 85-98.
- Rodrigues, L.; Póvoa, O.; Teixeira, G.; Figueiredo, A.C.; Moldão, M.; Monteiro, A. (2013). Trichomes micromorphology and essential oil variation at different developmental stages of cultivated and wild growing *Mentha pulegium* L. populations from Portugal. *Indus Crops Produc.* v.43, 692-700.
- Rosner, S.; Hannrup, B. (2004). Resin canal traits relevant for constitutive resistance of Norway spruce against bark beetles: environmental and genetic variability. *For Ecol Manage.* v. 200, 77-87.
- Serrato-Valenti, G.; Bisio, A.; Cornara, L.; Ciarallo, G. (1997) Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Ann Bot.* v.79, 329-336.

- Silva, R.F.; Rezende, C.M.; Santana, H.C.D.; Vieira, R.F.; Bizzo, H.R. (2013). Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from the leaves of *Hyptis villosa* Pohl ex Benth (Lamiaceae). *J Essent Oil Res.* v. 25(5), 415-418.
- Silva, M.G.V; Craveira, A.A.; Matos, F.J.A.; Machado, M.I.L.; Alencar, J.W. (1999). Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia* v. 70, 21-34.
- Silva, S.C.M.; Tozin, L.R.S.; Rodrigues, T.M. (2016). Morphological and histochemical characterization of secretory sites of bioactive compounds in *Lantana camara* L. (Verbenaceae) leaves. *Botany* v. 94, 321-336.
- Sohn, S.H.; Frost, J.; Kim, Y.H.; Choi, S.K.; Lee, Y.; Seo, M.S.; Lim, S.H.; Choi, Y.; Lomonosoff, G. (2014). Cell-autonomous-like silencing of GFP-partitioned transgenic *Nicotiana benthamiana*. *J Exp Bot* v.65, 4271-4283.
- Szymanski, D.B.; Marks, D.; Wick, S.M. (1999). Organized f-actin is essential for normal trichome morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* v.11, 2331-2347.
- Targett-Adams, P.; Chambers, D.; Gledhill, S.; Hope, R.G.; Coy, J.F.; Girod, A.; McLauchlan, L. (2003). Live cell analysis and targeting of the lipid droplet-binding adipocyte differentiation-related protein. *J. Biol. Chem* v.278(18), 15998–1600.
- Tchoumboungang, F.; Amvam Zollo, P.H.; Aviessi, F.; Alitonou, G.A.; Sohounhloue, D.K.; Ouamba, J.M.; Tsomambet, A.; Andissa, N.O.; Dagne, E.; Agnaniyet, H.; Bessière, J.M.; Menut, C. (2006). Variability in the chemical compositions of the essential oils of five *Ocimum* species from Tropical African area. *J Essent Oil Res* v. 18, 194–199.

- Tozin, L.R.S.; Marques, M.O.M.; Rodrigues, T.M. (2017). Herbivory by leaf-cutter ants changes the glandular trichomes density and the volatile components in an aromatic plant model. *AoB Plants* v.9(6), plx057.
- Tozin, L.R.S.; Carvalho, S.F.; Machado, S.R.; Rodrigues, T.M. (2015a). Glandular trichome diversity on leaves of *Lippia origanoides* Kunth and *Lippia stachyoides* Cham. (Verbenaceae): morphology, histochemistry and ultrastructure. *Botany* v. 93, 297-306.
- Tozin, L.R.S.; Marques, M.O.M.; Rodrigues, T.M. (2015b). Glandular trichome density and essential oil composition in leaves and inflorescences of *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in the Brazilian Cerrado. *An Acad Bras Cienc* v. 87(2), 943-953.
- Tozin, L.R.S.; Rodrigues, T.M. (2017). Morphology and histochemistry of glandular trichomes in *Hyptis villosa* Pohl ex Benth. (Lamiaceae) and differential labeling of cytoskeletal elements. *Act Bot Bras* v.31(3), 330-343.
- Turner, G.W.; Gershenzon, J.; Croteau, R.B. (2000). Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiol.* v.124, 655-663.
- Unsicker, S.B.; Kunert, G.; Gershenzon, J. (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr Opin Plant Biol* v. 12, 479–485.
- Valkama, E.; Salminen, J.P.; Koricheva, J.; Pihlaja, K. (2003). Comparative analysis of leaves trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in Finnish Birch species. *Ann Bot.* v. 91(6), 643-655.
- Welte, M.A.; Gross, S.P.; Postner, M.; Block, S.M.; Wieschaus, E.F. (1998). Developmental regulation of vesicle transport in *Drosophila* embryos: forces and kinetics. *Cell* v.92, 547–557.

- Werker, E.; Putievsky, E.; Ravid, U.; Dudai, N.; Katzir, I. (1993). Glandular hair and essential oil in developing leaves of *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). *Ann Bot.* v.71, 43-50.
- Werker, E. (2000). Trichome Diversity and Development. *Adv Bot Res.* v.31.
- Zehmer, J.K.; Huang, Y.; Peng, G.; Pu, J.; Anderson, R.G.W.; Liu P. (2009). A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Protemics.* v9, 914-921.
- Yao, H.; Xu, Q.; Yuan, M. (2008). Actin dynamics mediates the changes of calcium level during the pulvinus movement of *Mimosa pudica*. *Plant Signal Behav.* v. 3(11), 954-960.