



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ASPECTOS SUBCELULARES E INFLUÊNCIA DE FATORES  
EXÓGENOS NOS ESPAÇOS SECRETORES DE RESINA DE  
*Protium heptaphyllum* (AUBL.) MARCHAND. (BURSERACEAE)

**FERNANDA HELENA PALERMO**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,  
UNESP, para obtenção do título de  
Mestre no Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas (Botânica)  
Botânica, Área de concentração:  
Morfologia e Diversidade Vegetal.

**BOTUCATU – SP**  
**-2018-**



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

ASPECTOS SUBCELULARES E INFLUÊNCIA DE FATORES  
EXÓGENOS NOS ESPAÇOS SECRETORES DE RESINA DE  
*Protium heptaphyllum* (AUBL.) MARCHAND. (BURSERACEAE)

**FERNANDA HELENA PALERMO**

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

**DR<sup>a</sup> AMANDA CRISTINA ESTEVES AMARO**  
CO-ORIENTADORA

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

**BOTUCATU – SP**  
**-2018-**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Palermo, Fernanda Helena.

Aspectos subcelulares e influência de fatores exógenos nos espaços secretores de resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) / Fernanda Helena Palermo. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Tatiane Maria Rodrigues

Coorientador: Amanda Cristina Esteves Amaro

Capes: 20302037

1. Resinas. 2. Etileno. 3. Estruturas secretoras.  
4. Ultraestrutura. 5. Breu-branco.

Palavras-chave: Breu-branco; Canais secretores; Etileno; Resina; Ultraestrutura.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Marinez, e a minha irmã, Alessandra que sempre me apoiaram no sonho de ser bióloga e, com carinho, me ajudaram a tomar as decisões certas e seguir rumo à felicidade.*

## **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

À Professora Dra. Tatiane Maria Rodrigues que por meio de sua orientação cuidadosa e ensinamentos, ao longo destes anos, se tornou um exemplo de profissional para mim. Agradeço pela oportunidade de ter realizado este trabalho do qual gosto tanto e tenho muito orgulho.

À Dra. Amanda C. E. Amaro, pela excelente coorientação, dedicação atenciosa e por ter me ensinado muito durante esses dois anos de trabalho.

À Professora Dra. Silvia R. Machado por sempre compartilhar seus conhecimentos valiosos e pela colaboração atenciosa neste trabalho, contribuindo para meu crescimento enquanto profissional.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica e do Departamento de Botânica, IBB, pela aprendizagem e assistência no processamento das amostras.

Ao Dr. Sérgio A. Adachi pela ajuda em campo e por todo o companheirismo de sempre e ao Luis Paulo Mantoan e Felipe Giroto por todos os ensinamentos e auxílio na montagem dos experimentos. Agradeço a todos por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos colegas de pós-graduação, Angélica, Bruna, Camila, Daiane, Jana, July, Katiane, Lorena, Tayeme, Thais e Wand, por esses anos muito agradáveis, com muita troca de conhecimento e momentos de descontração. Vocês foram muito importantes e ajudaram a manter tudo mais leve. Agradeço em especial aos amigos, Diana, Ivanilde, Juan, Ricardo e Stefany pela amizade e por tudo que aprendi com vocês dentro e fora do laboratório.

Ao meu pai, mãe e irmã, agradeço por todo o apoio e carinho. Vocês são meu porto seguro, meus amigos e exemplos de pessoa. Sinto todos os dias saudades de estar mais perto, mas carrego sempre vocês no coração.

Ao meu companheiro, André Luis, por trazer amor e leveza aos meus dias. Agradeço por sempre acreditar em meu trabalho, por todo o auxílio no trabalho de campo e por estes dois anos de convivência e compartilhamento de conhecimentos, ideias e momentos inesquecíveis.

À minha família Jahcarandá, Ana Liz, Eliza, Katiane e Marília pelos quatro anos de convivência que foram recheados de alegrias, histórias, ensinamentos e companheirismo. Espero ainda poder compartilhar muitos momentos com vocês ao longo desta vida.

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a chegar aqui.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUÇÃO GERAL .....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	7
APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS .....	11
CAPITULO I – The tridimensional branched and anastomosed secretory system in <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) under a developmental view .....	12
Resumo .....	12
Introdução .....	13
Material e métodos .....	14
Resultados .....	15
Discussão .....	17
Referências bibliográficas .....	20
Figuras e legendas .....	24
CAPITULO II – Influência do etileno no desenvolvimento dos espaços secretores de resina em <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) .....	34
Resumo .....	34
Introdução .....	35
Material e métodos .....	36
Resultados .....	38
Discussão .....	39
Referências Bibliográficas .....	42
Tabela .....	48
Figuras e legendas .....	49
Considerações finais .....	53

PALERMO, F. H. **ASPECTOS SUBCELULARES E INFLUÊNCIA DE FATORES EXÓGENOS NOS ESPAÇOS SECRETORES DE RESINA DE *Protium heptaphyllum* (AUBL.) MARCHAND**. 2018. 53p. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**Resumo** - Espécies de Burseraceae são conhecidas pela produção de resina utilizada na produção de incensos, repelentes, impermeabilizantes, medicamentos e cosméticos, além de conferir às plantas proteção contra herbívoros e patógenos. *Protium heptaphyllum* é uma espécie arbórea produtora de resina aromática com comprovada ação medicinal no tratamento de doenças respiratórias e do trato digestivo, dentre outras. Apresenta grande plasticidade quanto aos ambientes de ocorrência, estando presente em ecossistemas com características contrastantes em diferentes regiões do Brasil. Espaços secretores de resina ocorrem associados ao floema de raiz, caule e folhas, podendo formar uma rede anastomosada no caule. Esse trabalho teve como objetivo analisar os aspectos subcelulares envolvidos na origem, desenvolvimento e funcionamento dos espaços secretores de resina em *P. heptaphyllum*, além de avaliar a influência do etileno no desenvolvimento do sistema secretor. Amostras de caule jovem foram processadas para análise convencional e citoquímica em microscopia eletrônica de transmissão. Plantas jovens foram mantidas em casa de vegetação e submetidas a diferentes concentrações de Ethephon: 6g L<sup>-1</sup> (T1), 12g L<sup>-1</sup> (T2), 18g L<sup>-1</sup> (T3) e 24g L<sup>-1</sup> (T4); amostras de suas folhas e caule foram processadas segundo técnicas usuais em anatomia vegetal. Os canais secretores se originam por esquizogênese e se desenvolvem por esquizolisogênese. As células epiteliais apresentam população de organelas consistente com secreção de lipídios, polissacarídeos e proteínas. Canais maduros podem se alongar, ramificar e fundir por processo que envolve separação e morte de células. Pectinase e celulase foram detectadas e estão associadas ao processo de expansão do sistema secretor e liberação da secreção. Folhas de plantas tratadas com Ethephon mostraram aumento na área do lume dos ES, o que pode estar relacionado à ação do etileno em processos de degradação da parede celular. No caule primário, plantas do T2 e T3 apresentaram diminuição na área do lume em comparação com o grupo controle e T1. No caule em crescimento secundário, plantas do T4 apresentaram maior densidade de ES; entretanto, nessa região caulinar, plantas do T2 e T4 apresentaram ES com menor área do lume. A resposta diferencial do sistema secretor em órgãos em estrutura primária e secundária pode estar relacionada à atuação distinta do hormônio nos diferentes meristemas. Nossos resultados podem fornecer subsídios para o estabelecimento de técnicas mais sustentáveis e eficientes de extração de resina dessa espécie.

**Palavras-chave:** breu-branco, canais secretores, desenvolvimento, etileno, resina, ultraestrutura

PALERMO, F. H. **SUBCELLULAR FEATURES AND INFLUENCE OF EXOGENOUS FACTORS ON THE RESIN SECRETORY SPACES IN *Protium heptaphyllum* (AUBL.) MARCHAND.** 2018. 53p. MSc DISSERTATION – BIOCIENCIA INSTITUTE, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**Abstract** - Burseraceae species are known for resin production used in the yield of incense, repellent, waterproofing, drugs and cosmetics, and also protect plants against herbivores and pathogens. *Protium heptaphyllum* is a tree producer of aromatic resin with medicinal action in respiratory and digestive diseases, among others. It occurs in many environments, being present in ecosystems with contrasting characteristics in different regions of Brazil. Resin secretory spaces (SS) occur associated with phloem in root, stem and leaves, and form an anastomosed network in the stem. We aimed to analyze the subcellular aspects involved in the origin, development and functioning of the resin secretory spaces in *P. heptaphyllum*, besides to evaluate the influence of ethylene on the development of the secretory system. Young stem samples were processed for conventional analysis and cytochemistry in transmission electron microscopy. Young plants were kept in greenhouse and treated with different concentrations of Ethephon: 6g L<sup>-1</sup> (T1), 12g L<sup>-1</sup> (T2), 18g L<sup>-1</sup> (T3) e 24g L<sup>-1</sup> (T4); leaf and stem samples were processed according to usual techniques in plant anatomy. Secretory canals in the phloem originated by schizogenesis and developed by schyzolysigenesis. Epithelial cells presented organelles consistent with lipid, polysaccharides and proteins secretion. Mature canals can elongate, ramify and fuse, resulting in a complex structure. Pectinase and cellulase were detected and are associated with expansion and processes of secretion release of the secretory system. Leaves from plants treated with Ethephon showed wider SS; this can be associated with the ethylene action in degradation processes of cell walls. In the primary stem, plants under T2 and T3 presented narrower lumen area in comparison to control group and T1. In secondary stem, plants under T4 exhibited higher density of SS; however, in this stem region, plants under T2 and T4 showed SS with narrower lumen. The differential answering of the secretory system between organs under primary and secondary growth can be associated with the distinctive action of ethylene on the different meristems. Our results can provide subsidies to the establishment of more sustainable and efficient techniques of resin extraction in this species.

**Keywords:** breu-branco, secretory canals, development, ethylene, resin, ultrastructure



## Introdução geral

Espaços secretores (canais e cavidades) são estruturas secretoras internas constituídas por um epitélio de células secretoras especializadas que delimitam um espaço intercelular (lume), onde a secreção produzida se acumula (Fahn 1979). A diferenciação entre cavidades e canais secretores é baseada em seus aspectos morfológicos em secções longitudinais, sendo que cavidades secretoras apresentam lume esférico ou ovóide, enquanto que os canais secretores mostram-se alongados e com lume estreito em plano longitudinal (Fahn 1979).

Cavidades e canais secretores podem se originar por: a) lisogênese, processo que envolve a desintegração (lise) de células para a formação do lume; b) esquizogênese, no qual o afastamento das células epiteliais pela dissolução da lamela média resulta na formação do lume; e c) esquizolisogênese, processo que envolve uma combinação entre afastamento e morte celular (Fahn 1979; Evert 2013).

As substâncias produzidas pelos espaços secretores podem apresentar natureza química diversa, podendo conter óleos essenciais, resinas, mucilagem, proteínas, compostos fenólicos, alcalóides, flavonóides, dentre outras (Metcalf & Chalk 1950; Fahn 1979; Castro & Machado 2006; Donato & Morretes 2007; Rodrigues & Fett-Neto 2009; Rocha *et al.* 2011; Rodrigues *et al.* 2011a). Dentre essas substâncias, merecem destaque os terpenos, substâncias com reconhecida importância ecológica e econômica, representados pelos óleos-essenciais e pelas resinas (Langenheim 2003). Os óleos essenciais são terpenos voláteis de baixo peso molecular, enquanto que as resinas são formadas por uma mistura de terpenos voláteis e não-voláteis (Langenheim 2003). Entre os principais produtores de resina estão famílias pertencentes às gimnospermas, às monocotiledôneas e às eudicotiledôneas, dentre elas Burseraceae (Langenheim 2003).

As características ultraestruturais das células epiteliais de canais e cavidades secretores variam conforme a composição da secreção produzida (Fahn 1979; Evert 2006). Dictiosomos ativos na produção de vesículas caracterizam o citoplasma de células produtoras de material hidrofílico (Fahn 2000; Rodrigues *et al.* 2011b). Em células ativas na secreção de substâncias lipofílicas, a presença de retículo endoplasmático liso bem desenvolvido, plastídios desprovidos de tilacóides e abundância de gotas de óleo no citoplasma são características tipicamente observadas (Fahn 1979; Paiva & Machado 2007; Rodrigues *et al.* 2011a). Em células produtoras de proteínas, o citoplasma é caracterizado pela abundância de ribossomos e pela proliferação do retículo endoplasmático rugoso (Evert 2013).

A liberação da secreção das células epiteliais para o lume pode ocorrer por mecanismo holócrino ou merócrino (écrino e granulócrino). A presença de vesículas próximas à membrana plasmática pode indicar secreção granulócrina, onde as vesículas produzidas por dictiossomos e retículo endoplasmático se fundem à membrana plasmática, liberando seu conteúdo por exocitose. Já na secreção écrina as substâncias atravessam diretamente a membrana plasmática, por mecanismos de transporte ativo ou passivo. Na secreção holócrina, o conteúdo produzido é liberado pela dissolução ou lise das células epiteliais (Fahn 1979; Evert 2013).

Apesar da presença dos espaços secretores representar um caráter constitutivo em muitos grupos de plantas, fatores externos podem influenciar no desenvolvimento de canais e cavidades, assim como na quantidade e composição química da secreção produzida (Langenheim 2003; Rodrigues *et al.* 2014). Intensidade luminosa, temperatura, altitude, disponibilidade de água e nutrientes, ataque de herbívoros e patógenos, ferimentos dentre outros fatores, podem induzir mudanças nos aspectos morfológicos, subcelulares e funcionais do sistema secretor de espécies pertencentes a diversas famílias (Fahn & Benayoun 1976; Nair *et al.* 1980, 1985; Lin *et al.* 2001; Sheue *et al.* 2003; Moreira *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* 2014).

De forma geral, o estresse provocado por fatores bióticos ou abióticos é capaz de promover a liberação de grandes quantidades de hormônios no corpo vegetal, dentre eles o etileno (Taiz & Zeiger 2009). O etileno é um hormônio gasoso que regula muitos processos durante o crescimento e desenvolvimento vegetal (Trobacher 2009) e é um importante mediador das respostas das plantas ao estresse provocado por fatores bióticos e abióticos (Wang & Ecker 2002). Trabalhos mostram que a aplicação de Ethephon em sua forma sintética pode induzir a formação de espaços secretores em espécies vegetais (Nair *et al.* 1985), além de induzir o aumento do diâmetro dos espaços secretores (Tomás *et al.* 1993) e aumentar de forma significativa a quantidade da produção da secreção produzida (Bhatt 1989; Scarazatti 2011; Zuñiga 2013).

Espécies de Burseraceae são caracterizadas pela presença constitutiva de canais secretores de resina associados ao floema (Metcalf & Chalk 1950). A resina produzida por espécies de Burseraceae é fortemente aromática (Langenheim 2003) e apresenta importância ecológica conferindo às plantas proteção contra ataques de herbívoros e patógenos (Bowers *et al.* 2001). Além disso, apresenta grande importância econômica, sendo amplamente utilizada na produção de fármacos, cosméticos (Souza *et al.* 2016) e incensos, dentre outros (Tolera 2013). Ainda, merece ser mencionado o valor histórico da secreção produzida por espécies da

família. Registros de seu uso datam desde a época do Egito faraônico (3000 a.C), onde se utilizava óleo de mirra (*Commiphora myrrha*) para o embalsamento dos mortos (Langenheim 2003). Outros povos também se utilizavam desta matéria prima, como os Sumérios, Babilônios e Assírios, indicando um amplo comércio na região do sudeste da Arábia (Groom 1981; Langenheim 2003). O incenso e mirra, muito utilizados em cerimônias religiosas e citados em passagens bíblicas são extraídos, respectivamente, de espécies pertencentes aos gêneros *Boswellia* e *Commiphora* (Tolera 2013). Na região das Américas, o uso da resina de copal (*Protium copal*) pela civilização Maia, data de 600 d.C., sendo muito utilizado também em suas cerimônias religiosas (Tripplett 1999; Langenheim 2003).

Apesar da importância de Burseraceae na produção de resina com alto valor ecológico, econômico e histórico, os estudos morfológicos sobre o sistema secretor em membros da família são escassos e restritos a um pequeno número de espécies, principalmente no que se refere aos aspectos subcelulares envolvidos no desenvolvimento e funcionamento dos canais secretores. Em *Commiphora mukul*, Setial *et al.* (1977) observaram que os canais secretores no floema caulinar se desenvolvem por esquizogenia e suas células apresentam maquinaria para intensa síntese lipídica e proteica. Nessa mesma espécie, Nair *et al.* (1981) mostraram que precursores da resina são produzidos no citoplasma das células epiteliais e que a secreção atravessa a parede celular para se depositar no lume do canal.

Bhatt (1987) por meio de microscopia eletrônica de transmissão analisou o processo de origem e desenvolvimento dos canais secretores no caule de *Commiphora wightii* e notou que o início de um espaço secretor é sinalizado pela formação de um espaço esquizógeno entre um grupo de células procambiais. Em embriões somáticos dessa mesma espécie produzidos *in vitro*, Kumar *et al.* (2004) observaram que canais secretores de resina estão presentes desde a fase de torpedo e que grande quantidade de resina é produzida em culturas de tecido. Shah *et al.* (1980) registraram a alta atividade enzimática das células epiteliais dos canais de *Commiphora mukul* e *Boswellia serrata* o que foi atribuído aos processos de degradação e conversão de substâncias durante a diferenciação dos canais e síntese da secreção.

Tolera *et al.* (2013) encontraram canais secretores de resina no lenho e na casca do caule de *Boswellia papyrifera*; os autores observaram que o sistema secretor forma uma rede tridimensional na porção mais interna da casca, enquanto que no lenho ocorrem canais apenas no sentido axial; segundo os autores, a distribuição e arquitetura dos canais de resina pode ter implicações para o estabelecimento de técnicas de extração mais sustentáveis da secreção. Em 2016, Souza *et al.* descreveram a presença de canais secretores associados ao floema de

quatro espécies de *Protium* e observaram variações na composição dos óleos essenciais entre elas.

No Brasil, o gênero *Protium* Burm. f é o mais comum dentre as Burseraceae, havendo registros de 35 espécies (Rankin-de-Mérona *et al.* 1992; Daly & Fine 2011). Estudos têm investigado a composição química da secreção produzida por espécies deste gênero (Bandeira 2002; Rudiger *et al.* 2007; Marques 2010, Lima *et al.* 2016) e têm demonstrado a importância farmacêutica e biológica de seus produtos (Otuki 2005; Souza *et al.* 2016).

*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand, é uma espécie arbórea conhecida como breu-branco ou almecega. Apresenta ampla distribuição no Brasil ocorrendo nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste do país (Bandeira *et al.* 2002; Citó *et al.* 2006; Daly & Fine 2011). A resina que exsuda de seu tronco e folhas, além de servir como fonte de recursos para a indústria farmacêutica, é fonte de matéria-prima utilizada na fabricação de cosméticos, produtos de higiene, repelentes, vernizes, incensos e velas (Siani *et al.* 1999; Revilla 2001; Bandeira *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2005; Amaral *et al.* 2006; Pontes *et al.* 2007; Marques *et al.* 2010). Estudo recente relata a ocorrência de espaços secretores de resina associados ao floema de raiz e caule em estrutura primária e secundária e folhas de indivíduos de *P. heptaphyllum* (Rodrigues 2017). No caule, Rodrigues (2017) observou que os canais secretores sofrem processo de expansão e anastomose mesmo em órgãos já diferenciados. Entretanto, estudos ultraestruturais detalhados envolvendo técnicas específicas que permitam o entendimento do processo de expansão e fusão glandular não foram encontrados para espécies da família. Tampouco, foram encontradas informações sobre os aspectos ultraestruturais envolvidos na origem e funcionamento (síntese, acúmulo e liberação da secreção) do sistema secretor em *P. heptaphyllum*.

O sistema secretor de *P. heptaphyllum* parece apresentar plasticidade de desenvolvimento no que se refere ao número e tamanho dos espaços secretores em resposta a fatores exógenos. Rodrigues (2017) mostrou que indivíduos adultos de *P. heptaphyllum* vivendo em ambiente naturalmente alagável pelo pulso das marés em área de restinga apresentaram espaços secretores mais numerosos e com lume mais amplo em folhas e caule em estrutura primária, além de espaços secretores com área do lume duas vezes maior em caule em estrutura secundária, em comparação com indivíduos ocorrentes em áreas não-alagáveis.

Este trabalho teve como objetivo analisar os aspectos subcelulares envolvidos na origem, desenvolvimento e funcionamento dos espaços secretores de resina em *P.*

*heptaphyllum*, além de avaliar a influência do etileno no desenvolvimento do sistema secretor dessa espécie.

### Referências Bibliográficas

- Amaral FMM, Ribeiro MNS, Barbosa-Filho JM, Reis AS, Nascimento FRF, Macedo RO (2006) Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16:696-720
- Bandeira PN, Machado MIL, Cavalcanti FS, Lemos TLG (2001) Essential oil composition of leaves, fruits and resin of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Journal of Essential Oil Research* 13:33-34
- Bandeira PN, Pessoa ODL, Trevisan MTS, Lemos TLG (2002) Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. *Química Nova* 25:1078-1080
- Bhatt JR (1987) Development and structure of primary secretory ducts in the stem of *Commiphora wightii* (Burseraceae). *Annals of Botany* 60:405-416
- Bhatt JR, Nair MNB, Ram RYM (1989) Enhancement of oleo-gum-resin production in *Commiphora wighlii* by improved tapping technique. *Current Science* 58:349-357
- Bowers WS, Evans PH, Venable DL, Becerra JX (2001) Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *American Zoologist* 41:865-876
- Castro MM, Machado SR (2006) Células e tecidos secretores. In: Appezzato-da-Glória, B, Carmello-Guerreiro SM (Eds) *Anatomia Vegetal*. UFV, Viçosa, p.179-188
- Citó AGL, Costa FB, Lopes JAD, Oliveira VMM, Chaves MH (2006) Identificação dos constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8:4-7
- Daly DC, Fine WA (2011) A new amazonian section of *Protium* (Burseraceae) including both edaphic specialist and generalista taxa. *Studies in Neotropical Burseraceae XVI Systematic Botany* 36:939-949
- Donato AM, Morretes BL (2007) Anatomia foliar de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) proveniente de áreas de restinga e de floresta. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17:426-443
- Evert RF (2006) *Esau's Plant Anatomy. Meristems, cells and tissues of the plant body. Their structure, function and development*, 3rd edn. John Wiley and Sons, New Jersey

- Fahn A, Benayoun J (1976) Ultrastructure of resin ducts in *Pinus halepensis* development, possible sites of resin synthesis, and mode of its elimination from the protoplast. *Annals of Botany* 40:857-863
- Fahn A (1979) *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London
- Fahn A (2000) Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31:37-75
- Groom N (1981) *Frankincense and myrrh: a study of the Arabian incense trade* Londres: Longman.
- Kumar S, Sonie KC, Ramawat KG (2004) Development of resin canals during somatic embryogenesis in callus cultures of *Commiphora wightii*. *Indian Journal of Biotechnology* 3:267-270
- Langenheim JH (2003) *Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany*. Timber Press, Portland, Cambridge
- Lima TAAC, Ribeiro JELS, Marques MOM, Facanali R, Lima MP (2016) Estimulo para produção de resina em *Protium hebetatum* Daly e avaliação dos constituintes químicos voláteis. *Scientia Amazonia* 5:21-24
- Lin J, Sampson DA, Ceulemans R (2001) The effect of crown position and tree age on resin-canals density in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Canadian Journal of Botany* 79:1257-1261
- Marques DD, Sartori RA, Lemos TLA, Machado LL, Souza JSN, Monte FJQ (2010) Chemical composition of the essential oils from two subspecies of *Protium heptaphyllum*. *Acta Amazônica* 40:227-230
- Metcalf CR, Chalk L (1950) *Anatomy of the dicotyledons leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economy uses*. Clarendon press, Oxford
- Moreira CGA, Schwan-Estrada KRF, Bonaldo SM, Stangarlin JR, Cruz MES (2008) Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. *Summa Phytopathologica* 34:332-337
- Nair MNB, Patel KR, Shah JJ, Pandalai RC (1980) Effect of Ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) on gummosis in the bark of *Azadirachta indica*. *Indian Journal of Experimental Biology* 18:500-503
- Nair GM, Patel KR, Subrahmanyam SV, Shah JJ (1981) Secretion of resin across the wall of the epithelial cell in the gum-resin canal of *Commiphora mukul* Engl. *Annals of Botany* 47:419-421

- Nair MNB, Bhatt JR, Shah JJ (1985) Induction of traumatic gum cavities in sapwood of the Neem (*Azadirachta indica* A.Juss.) by Ethephon and paraquat. *Indian Journal of Experimental Biology* 23:60-64
- Oliveira FA, Costa CLS, Chaves MH, Almeida FRC, Cavalcante IJM, Lima AF, Lima Jr RCP, Silva RM, Campos AR, Santos FA, Rao VSN (2005) Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sciences* 77:2942-2952
- Otuki MF, Vieira-Lima F, Malheiros A, Yunes RA, Calixto JB (2005) Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and a-amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology* 507:253-259
- Paiva EAS, Machado SR (2007) Structural and ultrastructural aspects of ontogenesis and differentiation of resin secretory cavities in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae) leaves. *Nordic Journal of Botany* 24:423-431
- Pontes WJT, Oliveira JCG de, Câmara CAG da, Lopes ACHR, Gondim-Júnior MGC, Oliveira JV de, Barros R, Schwartz MOE (2007) Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Acta Amazônica* 37:103-110
- Rankin-de-Merona JM, Prance GT (1992) Preliminary results of a large-scale tree inventory of upland rain forest in the Central Amazon. *Acta Amazônica* 22:493-534
- Revilla J (2001) Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. SEBRAE-AM/INSPA, Manaus, MA
- Rocha J, Pimentel RR, Machado SR (2011) Estruturas secretoras de mucilagem em *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae): distribuição, caracterização morfoanatômica e histoquímica. *Acta Botânica Brasilica* 25:751-763
- Rodrigues KCS, Fett-Neto AG (2009) Oleoresin yield of *Pinus elliottii* in a subtropical climate: Seasonal variation and effect of auxin and salicylic acid-based stimulant paste. *Industrial Crops and Products* 30:316-320
- Rodrigues MIA (2017) Anatomia do eixo vegetativo aéreo de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) com ênfase no sistema secretor em ambiente com influência das marés. Tese, Universidade Estadual Paulista
- Rodrigues TM, Santos DC, Machado SR (2011a) The role of the parenchyma sheath and PCD during the development of oil cavities in *Pterodon pubescens* (Leguminosae- Papilionoideae). *Comptes Rendus Biologies* 334:535-543

- Rodrigues TM, Teixeira SP, Machado SR (2011b) The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf. Leguminosae - Caesalpinioideae). *Flora* 206:585-594
- Rodrigues TM, Buarque PFSM, Coneglian AG, Reis DC (2014) Light and temperature induce variations in the density and ultrastructure of the secretory spaces in the diesel-tree (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Leguminosae) *Trees* 28:613-623
- Rudiger AL, Siani AC, Veiga Junior VF (2007) The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Pharmacognosy Reviews* 1:93-103
- Scarazatti COS (2011) Produção de resina de Breu (Burseraceae) no assentamento rural Cristo Rei do Uatumã – Amazonas. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, AM
- Setia RC, Parthasarthy MV, Shah JJ (1977) Development, histochemistry and ultrastructure of gum-resin ducts in *Commiphora mukul* Engl. *Annals of Botany* 41:999-1004
- Shah JJ, Subramanyam SV, Nair GM, Patel KR (1980) Enzyme histochemistry in the gum-resin canals of some members of Burseraceae. *Proceedings of Indian National Science Academy B* 46:506-11
- Sheue CR, Yang YP, Kuo-Huang LL (2003) Altitudinal variation of resin ducts in *Pinus taiwanensis* Hayata (Pinaceae) needles. *Botanical Bulletin Academia Sinica* 44:305-313
- Siani AC, Ramos MFS, Menezes-de-Lima O, Soares ROA, Rosas EC, Susunaga GS, Guimarães AC, Zoghbi MGB, Henriques MGMO (1999) Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology* 66:57-69
- Souza LR, Trindade FG, Oliveira RA, Costa LCB, Gomes VM, Cunha M (2016) Histochemical characterization of secretory ducts and essential oil analysis of *Protium* species (Burseraceae). *Journal of Essential Oil Research* 28:166-171
- Taiz L, Zeiger E (2009) *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 848
- Tolera M, Menger D, Sass-Klaassen U, Sterck FJ, Copini P, Bongers F (2013) Resin secretory structures of *Boswellia papyrifera* and applications for frankincense yield. *Annals of Botany* 111:61-68
- Tomás AO, García-puig D, Sabater F, Porrás I, García-lídon A, Del río JA (1993) Influence of ethylene and Ethephon on the sesquiterpene nootkatone production in *Citrus paradisi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:1566-1569
- Tripplett KJ (1999) The ethnobotany of plant resins in the Maya cultural region of southern Mexico and Central America. Ph.D. dissertation, University of Texas, Austin.



- Trobacher CP (2009) Ethylene and programmed cell death in plants. *Botany* 87:757-769
- Wang KLC, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene Biosynthesis and signaling networks. *The plant cell* 14:131-151
- Zuñiga RM (2013) Extração induzida de resina em duas espécies de *Protium* Burm f. e análise química do óleo essencial da resina em *P. strumosum* Daly, na reserva Florestal dolpho Ducke – AM. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM

Conforme estabelecido pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) do IBB, UNESP, os resultados obtidos durante a execução deste Projeto de Mestrado foram reunidos em dois artigos científicos para publicação, os quais são apresentados de acordo com as normas de periódicos da área (Comitê de Biodiversidade da Capes).

Artigo 1: The tridimensional branched and anastomosed secretory system in *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) under a developmental view – Redigido de acordo com as normas do periódico *Protoplasma* (A2 - Comitê de Biodiversidade da Capes).

Artigo 2: Influência do etileno no desenvolvimento dos espaços secretores de resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) – Redigido de acordo com as normas do periódico *Trees* (B2 - Comitê de Biodiversidade da Capes).

# THE TRIDIMENSIONAL BRANCHED AND ANASTOMOSED SECRETORY SYSTEM IN *Protium heptaphyllum* (AUBL.) Marchand. (BURSERACEAE) UNDER A DEVELOPMENTAL VIEW

## Abstract

*Protium heptaphyllum* is a Burseraceae species known by the production of aromatic resin with medicinal, economic and ecological value. Information on the origin, development, architecture and functional features of the secretory system are crucial to understand the resin production and can contribute to a more sustainable tapping regime. We investigated the structure of the secretory system in *P. heptaphyllum* stem under a developmental point of view with emphasis on the subcellular features. Samples of young stem were analyzed under light and transmission electron microscopy by conventional and cytochemical methods. Secretory canals, originated from procambium, occurred immersed in the primary phloem. Mature canals have a secretory epithelium and a wide lumen where the exudate is accumulated. A sheath of parenchyma cells with meristematic features surrounds the epithelium. The canals originate by schizogenesis and develop by schyzolysigenesis. Canals active in secretion occurred since the shoot apex. Secreting epithelial cells have subcellular apparatus consistent with oleoresin, polysaccharides and enzymes secretion. Pectinase and cellulase were cytochemically detected in developing canals and are involved in cell wall changes associated to canal growth and release of exudate. In *P. heptaphyllum*, the secretory system has a complex structure resultant from longitudinal growth, lateral ramification and fusion of adjacent canals, in addition to intrusive growth of both epithelial and sheath cells. Our findings can contribute to the establishment of more efficient and sustainable techniques for resin extraction in this species.

**Keywords:** cytochemistry; development; histology; secretory canal; secretion; ultrastructure

## Introduction

Among the substances produced by plants, resin is considered the most versatile material since the Stone Age, going through the pre-industrial era and reaching the present day (Langenheim 2003). Species of Burseraceae are known for the production of resin and essential oils used in religious ceremonies, medicine and the production of cosmetics (Souza *et al.* 2016). The pharmacological properties of their secretions have been proven in the treatment against inflammations, pains, liver diseases and malaria (Sussunaga 1996; Siani *et al.* 1999).

*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand., popularly known as breu-branco (Lorenzi 2002), is a tree representative of Burseraceae widely distributed in different ecosystems in Brazil (Matos 1997; Citó *et al.* 2006; Daly & Fine 2011). The high diversity of terpenes in the aromatic resin of this species provides an effective defense against herbivores and pathogens (Bowers *et al.* 2001). The exudate from *P. heptaphyllum* stem is source of raw material to produce medicaments, cosmetics, hygiene products, perfumery, repellents, varnishes, incense, stains and candles (Revilla 2001). The chemical composition and the medicinal properties of the aromatic resin produced by this species has been exhaustively studied (Lima *et al.* 2016 and references therein) and its cytotoxicity in breast cancer cells, antimicrobial activity, and its antimutagenicity *in vivo* have been proved (Lima *et al.* 2016).

In *P. heptaphyllum*, secretory canals occur in the primary and secondary phloem (Rodrigues 2017) and are filled with a viscous and transparent material where phenolic compounds, alkaloids, essential oils, resin, and mucopolysaccharides were histochemically identified (Souza *et al.* 2016). According to Rodrigues (2017), these canals can ramify and fuse originating a tridimensional anastomosed secretory system. However, Rodrigues (2017) emphasizes that ultrastructural studies are necessary to understand the cellular processes involved in the origin and development of the secretory canals and their functioning in *P. heptaphyllum*.

In this study, we investigated the structure of the secretory system in *P. heptaphyllum* young stem under a developmental point of view with emphasis on the subcellular features.

## Materials and methods

### *Study site and plant material*

This study was performed in a seasonal forest located in Botucatu city (22°88'010"S; 48°49'143"W), São Paulo State, Brazil. Samples of shoot apex were collected from three adult trees of *P. heptaphyllum* with about 7m height with a straight stem and diameter at breast height between 20 and 25 cm. Samples of stem in primary growth were obtained from 0.5cm below the apex.

Vouchers were deposited in the Herbarium "Irina Delanova de Gemtchujnicov" (BOTU) of the Department of Botany, Institute of Biosciences of Botucatu (IBB), São Paulo State University (UNESP).

### *Histology*

For histological characterization and ontogenetic analysis, materials were fixed in FAA 50 (formalin/acetic acid/alcohol 50%) for 48 hours (Johansen 1940). Samples were dehydrated in ethanol series and embedded in methacrylate resin (Gerrits 1991). Serial cross and longitudinal sections (5µm) were obtained using a rotary microtome and stained with Toluidine blue pH 4.7 (O'Brien *et al.* 1964). Permanent slides were mounted with Entellan® and analyzed under an Olympus BX41 microscope coupled with a digital camera.

### *Transmission electron microscopy (TEM)*

To conventional analyses, portions of stems were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.3) for 24h; pos-fixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1h, dehydrated through acetone series and embedded in Araldite resin (Machado and Rodrigues 2004). Ultra-thin sections were post-stained with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds 1963). The material was examined with Fei Tecnai transmission electron microscope at 80kV.

For ultracytochemical detection of pectinase, samples were incubated in 0.1 M sodium acetate buffer solution (pH 5.0) containing 0.5% pectin for 20 minutes at room temperature. For ultracytochemical detection of cellulase, the material was incubated in 0.05 M citrate buffer (pH 4.8) containing 0.02% carboxymethylcellulose (CMC) for 10 minutes also at room temperature. Both treatments were transferred to Benedict reagent solution at 80°C for 10 minutes and then washed in 0.1M phosphate buffer. Then the samples were processed according to conventional protocol described above. The control samples were processed

without incubation in pectin and CMC (Bal 1974; Allen & Nessler 1984; Marinho & Teixeira 2016).

## **Results**

### *Structure and subcellular features of mature canals*

Mature secretory canals were constituted by a uniseriate epithelium surrounding a wide lumen (Fig. 1a) where the secretion accumulates. A discontinuous sheath constituted by one or more layers of tangentially elongated parenchyma cells with meristematic potential surrounded the canals (Fig. 1a).

Secretory canals are active in secretion since their early developmental stages and present lumen filled with exudate heterogenous in aspect (Fig. 1b). Epithelial cells had dense cytoplasm, evident nucleus and small vacuoles (Fig. 1c). The inner tangential cell wall, facing the lumen, is dense and become loose in appearance (Fig. 1c, d). Anticlinal (Fig. 1b) and outer tangential (Fig. 1c) walls have plasmodesmata interconnecting the epithelial cells between themselves and with the sheath cells. The plasmalemma of the epithelial cells is sinuous, mainly in the cell face tangent to the lumen (Fig. 1c, d).

The cytoplasm of the epithelial cells is abundant with numerous polysomes, mitochondria (Fig. 1c-f), plastids (Fig. 1d, f), dictyosomes (Fig. 1e; 2a), smooth (Fig. 2a) and rough endoplasmic reticulum (Fig. 2b), and oil droplets spread in the cytoplasm (Fig. 1d-f; 2b). Plastids are rounded to ovoid in shape, devoid of thylakoids and have electron-dense stroma and osmiophilic inclusions (Fig. 1 f). The smooth endoplasmic reticulum presents dilated cisterns, mainly in the ends of their profiles (Fig. 2a). Myelin-like structures were observed in the peripheral cytoplasm (Fig. 1e). Numerous vesicles were observed in epithelial cells, especially close to the plasma membrane (Fig. 2c, d, e). Cluster of electron-dense bodies were observed in the cytoplasm, mainly in the cell face adjacent to the lumen (Fig. 2c), in the periplasmic space (Fig. 2d), inside vacuole (Fig. 2c, e) and vesicles (Fig. 2c-e), and immersed in the cell wall facing the lumen (Fig. 1c, d, f; 2c-e). Images suggest that these substances cross the plasma membrane and accumulate in the cell wall tangent to the lumen (Fig. 1c, d, f; 2c-e). Subsequently, this material is released into the lumen by a peeling process of cell wall (Fig. 2e).

Sheath cells have more developed vacuome and reduced cytoplasm (Fig 3a). Their plastids present globular starch grains (Fig. 3a; insert). Mitochondria, dyciosomes, rough endoplasmic reticulum and oil droplets were observed in the cytoplasm (Fig. 3b). The sheath cells are tangentially elongated and acquire tapered ends that penetrate between the radial

walls of the neighboring sheath cells, in a way that resembles apical intrusive growth (Fig. 3a).

#### *Origin and development of the secretory canals*

Secretory canals at different stages of development were observed side by side in the shoot apex and subjacent regions (Fig. 3c).

The secretory canals are formed from procambial cells in the shoot apex. Precursor cells of the secretory canals are pyramidal in shape (Fig. 3d) and divides in several planes forming a cluster with four to eight cells (Fig. 3e). The derivative cells (Fig. 3e) had irregular contour, thin walls, voluminous nucleus with nucleolus, abundant cytoplasm rich in mitochondria and plastids, and small vacuoles (Fig. 3e). The middle lamella among the clustered derivative cells becomes swollen (Fig. 3e) and a small triangular intercellular space appears originating the lumen (Fig. 3f). This initial lumen expands by the progressive dissolution of the middle lamella of the surrounding cells (Fig. 3g, h).

Mature secretory canals continue developing by elongation at their ends (Fig. 4a). The elongating canals are characterized by the irregular contour and diameter of the lumen (Fig. 4b). In longitudinal section, epithelial cells are tangentially elongated and exhibit tapered ends that penetrate between the radial walls of the neighboring epithelial cells (Fig. 4c), in a way that resembles apical intrusive growth. In the both ends of an elongating canal, some epithelial cells exhibit swollen middle lamella with dissolution signals; this process culminates with the cell release into the lumen (Fig. 4d). Simultaneous, other epithelial cells in the canals ends exhibit signs of lyses such as irregular walls with loose appearance, reduced nucleus with irregular contour and dense lumps of chromatin (Fig. 4e), numerous vacuoles with membranous debris (Fig. 4f), large oils droplets (Fig. 4e, f) and mitochondria irregular in outline exhibiting electron lucent areas and disrupted cristae (Fig. 4e, f). The cell wall tangent to the lumen exhibits continuous peeling and discontinues areas forming hollows (Fig. 4e). Ultracytochemical tests revealed the presence of cellulase (Fig. 4g) and pectinase (Fig. 4h) in these cells walls. This process culminate with rupture of the epithelial cells and the release of their content to the lumen (Fig. 4b, d)

In the ends of the elongating secretory canals, the sheath cells divide periclinally and maintain their intrusive growth potential (Fig. 5a). Sheath cells can substitute the ruptured epithelial cells, becoming part of the secretory epithelium.

Secretory canals can ramify among the neighboring cells. Serial sections showed small cells arranged in longitudinal rows, adjacent to enlarging secretory canals (Fig. 5b). These

small cells, which are immersed in parenchyma tissue, exhibited meristematic features such as, thin and irregular walls, voluminous nucleus and dense and abundant cytoplasm (Fig. 5b, c). The middle lamellae among these cells show dissolution signals (Fig. 5c). As the middle lamellae dissolves, these cells become part of the secretory epithelium, giving rise to a branch of the canals (Fig. 5d, e). The presence of pectinase was ultracytochemically detected in the middle lamellae region of these cells.

Some secretory canals were observed very close to each other, sharing a same parenchyma sheath (Fig. 5f) or with secretory epithelium in direct contact (Fig. 5g). The middle lamellae among these parenchyma cells dissolve allowing the junction of adjacent canals, in a similar way to observed in ramification canals. In the regions of contact between neighboring canals, epithelial cells exhibit signals of lyses and dissolution of the middle lamellae (Fig. 5h). This process culminates with the total fusion of adjacent canals (Fig. i). Pectinase and cellulase were ultracytochemically marked in the cell walls in these regions.

### **Discussion**

Looking at the young stem in *P. heptaphyllum* using light and electron microscopy methods, we got insights on the origin and development of the secretory canals, ramification of canals by incorporation of neighboring cells and fusion between canals, in addition to evidence of intrusive growth. These findings lead us to understand the complexity of the tridimensional secretory system in this Burseraceae species.

Our observations showed that secretory canals are immersed in the primary phloem tissue in the stem of *P. heptaphyllum*. Secretory canals differentiate precociously in the shoot apex, and become active in secretion early while the surrounding tissues are still differentiating (Rodrigues 2017). Such precocious differentiation seems to be a common trait to secretory spaces in different plant species (Rodrigues *et al.* 2011a; Machado *et al.* 2017).

The subcellular apparatus of the epithelium of mature secretory canals in *P. heptaphyllum* is consistent with the production of polysaccharides and proteins, in addition to the lipophilic compounds, corroborating previous histochemical data (Souza *et al.* 2016; Rodrigues 2017). The occurrence of dictyosomes and abundant vesicles in these cells indicate the production of hydrophilic substances, as polysaccharides (Fahn 1979; Evert 2013). The abundance of oil drops in the cytoplasm, presence of plastids without thylakoids and smooth endoplasmic reticulum with dilated cisterns are consistent to the synthesis of lipophilic substances (Fahn 1979; Evert 2013), and are commonly reported in cells secreting

monoterpenes (Cheniclet & Carde 1985; Turner *et al.* 1999; Rodrigues *et al.* 2011a; Machado *et al.* 2017).

In the epithelial cells, the occurrence of myelin-like figures in the epithelial cells of *P. heptaphyllum* can be associated to the process of incorporation of terpenes and their precursors to the hydrophilic content of the vacuoles as reported to species belonging to other plant groups (Raatikainen *et al.* 1992; Rodrigues 2011a). The placement of the myelin-like figures (multilamellar bodies) in the peripheral cytoplasm of epithelial cells, in the interface with plasmalemma, suggests their role in the secretion of lipids and other molecules to outside the protoplast, as described to animal cells (Paquet *et al.* 2013). The origin of myelin-like figures in these cells is obscure and can be associated to autophagic process and degeneration of mitochondria and plastids, among others (van Doorn & Papini 2016).

The abundance of polysomes and profiles of rough endoplasmic reticulum in the epithelial cells of *P. heptaphyllum* are consistent to the synthesis of lytic enzymes required to the growth of the secretory canals (Marinho & Teixeira 2016) and the cell wall changes involved in the exudate release (Machado & Carmello-Guerreiro 2001; Rodrigues *et al.* 2011b; Machado *et al.* 2017).

Regarding the exudate release toward the lumen, our images suggest the occurrence of different mechanisms in *P. heptaphyllum*. The observation of oil drops and osmiophilic bodies in the cytoplasm of the epithelial cells, mainly in the cell side facing the lumen, in the periplasmic space and immersed in the cell wall matrix suggest lipid compounds can cross the cell wall and reaches the lumen (Nair *et al.* 1981). These features are typical of ecrine process of secretion release (Evert 2013; Rodrigues & Machado 2012) which is favored by the loose arrangement of the cellulose microfibrills of the cell wall facing the lumen. In addition, the abundance of vesicles in the outer cytoplasm and the irregular contour of the plasmalemma of the epithelial cells indicate that a fraction of the secretion, mainly the hydrophilic compounds, can be released toward the lumen by granulocrine mechanism (Fahn 1979; Evert 2013). In *P. heptaphyllum*, is evident that the release of the secretion to the lumen is associated to the peeling of the outer layers of the tangential wall of the epithelial cells facing the lumen (Rodrigues *et al.* 2011a; Machado *et al.* 2017). Still, in this species, the epithelial cells in the ends of the growing secretory canals can be broken and their protoplast content is released to the lumen, characterizing a holocrine mechanism of secretion (Machado & Carmello-Guerreiro 2001).

Secretory canals in *P. heptaphyllum* were originated from the procambium in shoot apex. The lumen is initiated by the separation of the cluster cells by the dissolution of the



middle lamellae, characterizing a schizogenous process (Fahn 1979; Evert 2013). However, canals with well-established lumen continue developing. Such growth of the secretory canals occurs by a combination between cell separation and rupture, characterizing a schizolysigenous process of growth (Fahn 1979; Evert 2013; Rodrigues *et al.* 2011b).

In this paper, the occurrence of cell wall peeling, vacuoles with membranous debris, nucleus with irregular contour and dense lumps of chromatin, mitochondria with cristolysis signals in epithelial cells are apoptotic signals consistent with programmed cell death (PCD) (Danon *et al.* 2000; Brighigna *et al.* 2006) during the growth of the secretory canals. In fact, the occurrence of PCD has been demonstrated during the development of the oil secretory spaces (Rodrigues *et al.* 2011a; Liu *et al.* 2012). Vacuoles containing membranous inclusions, probably sequestered portions of cytoplasm, can be interpreted as autophagic structures (autophagosomes) and indicates the occurrence of macroautophagic process (Papini *et al.* 2014) during the development of the secretory system in *P. heptaphyllum*.

The occurrence of an anastomosed secretory network has already been reported in other Burseraceae species (Mc Nair 1918; Tolera *et al.* 2013). By comparing different developmental stages of stem in light and electron microscopy, we were able to access and understand the complexity of the resin secretory system in *P. heptaphyllum*. In this species, the secretory system has a complex structure resulting from longitudinal growth, lateral ramification and fusion of adjacent canals, in addition to intrusive growth of both epithelial and sheath cells. Occurrence of intrusive growth of secretory cells has been described to secretory cavities of *Metrodorea nigra* (Machado *et al.* 2017) and in laticifers of *Tabernaemontana catharinensis* (Canaveze & Machado 2015). Epithelial and sheath cells with tapered ends penetrating the swollen middle lamella among adjacent cells is consistent with intrusive growth (Siedlecka *et al.* 2008; Machado *et al.* 2017) that was here confirmed by serial anatomical section analysis. This observation is of particular importance if we consider the spatial adjustment of the secretory canals occurred during their longitudinal growth, lateral ramification and fusion. In addition, the maintenance of the secretory active in the mature canals through the stem development is ensured by the replacement of the damaged epithelial cells by the parenchyma sheath that surrounds the secretory epithelium, as reported for different plant species (Bosabalidis and Tsekos 1982a, b; Rodrigues *et al.* 2011a, 2011b; Machado *et al.* 2017).

The observation of rows of cells with meristematic features immersed in the parenchyma tissue adjacent to mature canals is a novelty in the development of the secretory canals in Burseraceae. This characteristic suggests the existence of an induction action of

secretory canals on the neighboring cells as discussed for laticifers (Milanez 1977; Canaveze & Machado 2015); however, the action-inducing mechanism and the inductive properties of secretory cells are still poorly investigated. Anastomosis of secretory, as here observed in *P. heptaphyllum*, implies in a direct communication between two adjacent canals (Bosshard & Hug 1980) with biological and yield implications. In biological terms, this anastomosed secretory system could facilitate the transport of resin to long distances and toward different directions ensuring a more effective protection against herbivores (Tolera *et al.* 2013). Considering the importance of *P. heptaphyllum* in the production of resin with economic value, our findings can contribute to the establishment of more efficient and sustainable techniques for resin extraction.

### References

- Allen RD, Nessler CL (1984) Cytochemical localization of pectinase activity in laticifers of *Nerium oleander* L. *Protoplasma* 119:74-78
- Bal AK (1974) Cellulase. In: Hayat MA (ed) *Electron microscopy of enzymes v3*. Van Nostrand Reinhold, New York
- Bosabalidis A, Tsekos I (1982a) Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa*. Early stages of the gland cell differentiation. *Protoplasma* 112:55– 62
- Bosabalidis A, Tsekos I (1982b) Glandular scale development and essential oil secretion in *Origanum dictamnus* L. *Planta*. 156:496-504
- Bosshard HH & Hug UE (1980) The anastomoses of the resin canal system in *Picea abies* (L.) Karst., *Larix decidua* Mill. and *Pinus sylvestris* L. *Holz als Roh-und Werkstoff* 38:325-328
- Bowers WS, Evans PH, Venable DL, Becerra JX (2001) Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *American Zoologist* 41:865-876
- Brighigna L, Milocani E, Papini A, Vesprini JL (2006) Programmed cell death in the nucellus of *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Caryologia* 59:334-339
- Canaveze Y and Machado SR (2015) Leaf colleters in *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae, Rauvolfioideae): structure, ontogenesis, and cellular secretion. *Botany* 93:287-296
- Cheniclet C, Carde JP (1985) Presence of leucoplasts in secretory cells and of monoterpenes in the essential oil: a correlative study. *Israel Journal of Botany* 34:219-238

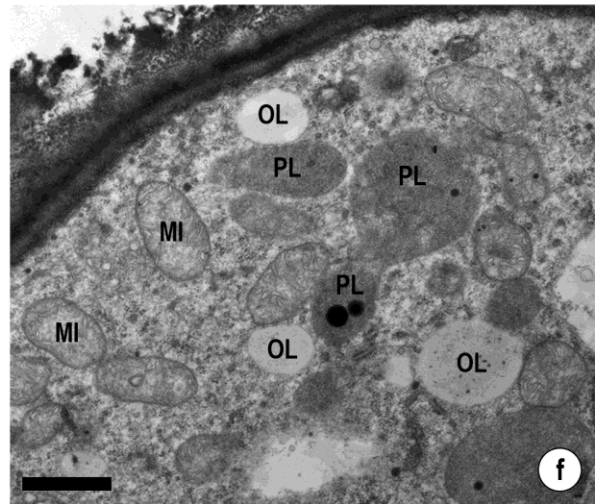
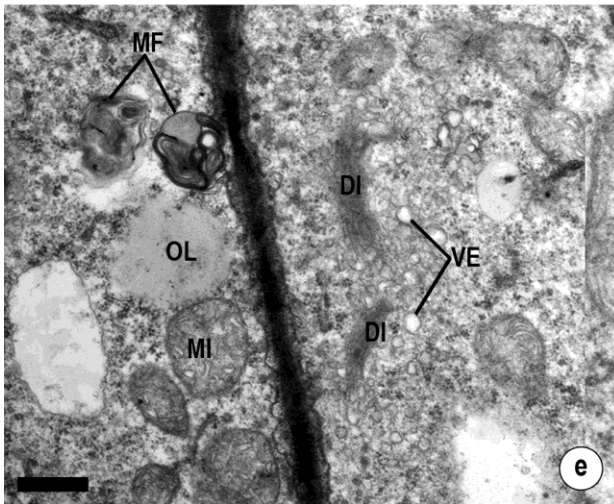
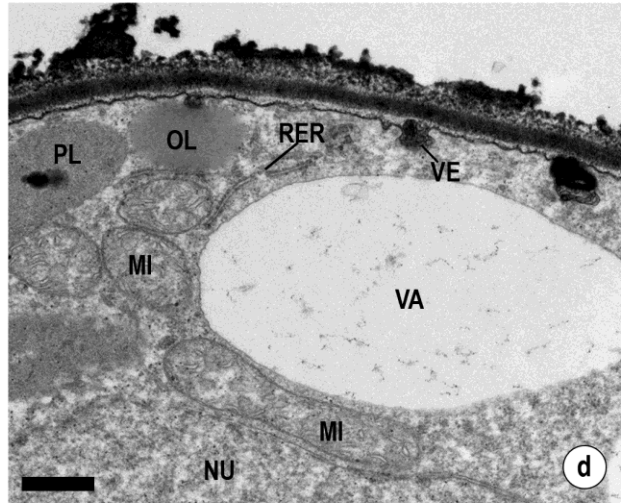
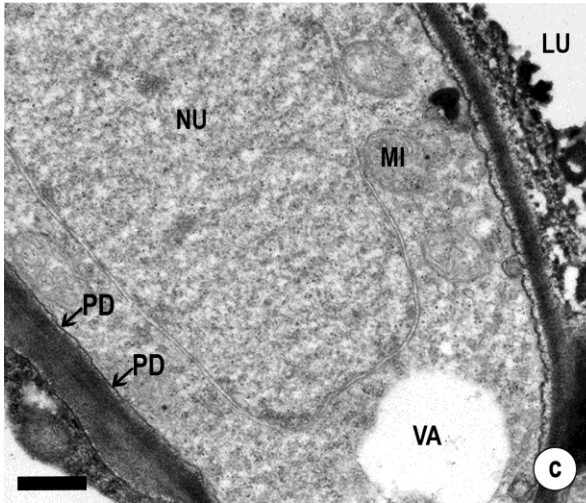
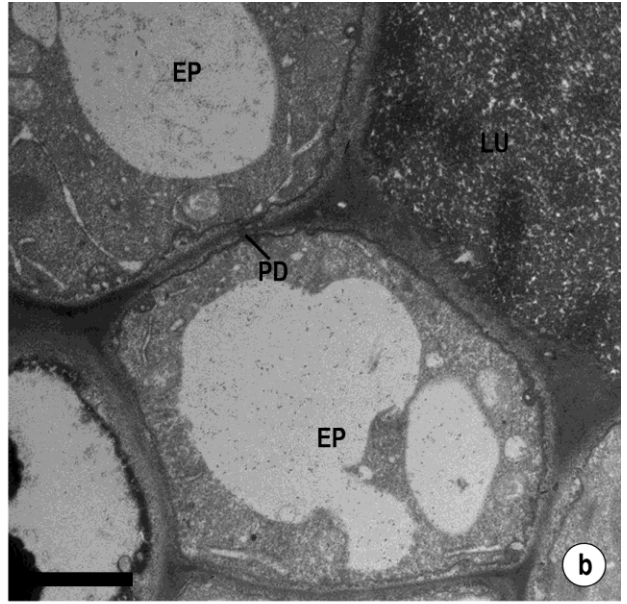
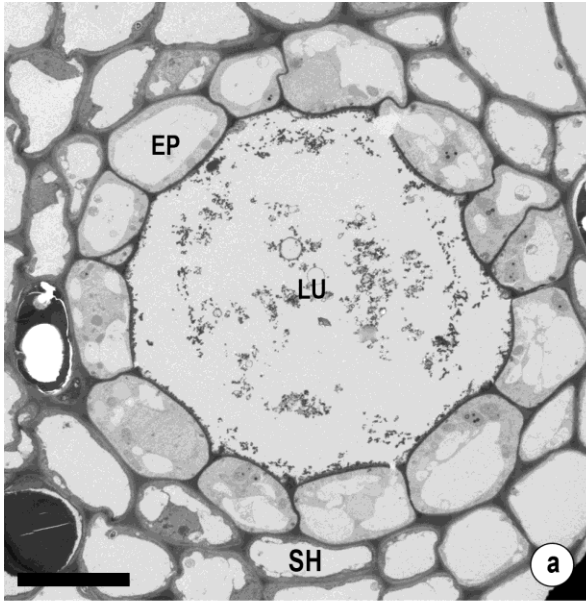
- Citó AGL, Costa FB, Lopes JAD, Oliveira VMM, Chaves MH (2006) Identificação dos constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 8:4-7
- Daly DC, Fine WA (2011) A new amazonian section of *Protium* (Burseraceae) including both edaphic specialist and generalista taxa. Studies in Neotropical Burseraceae XVI. Systematic Botany 36:939-949
- Danon A, Delorme V, Mailhac N, Gallois P (2000) Plant programmed cell death: A common way to die. Plant Physiology Biochemistry (Montrouge) 38:647-655
- Evert RF (2013) Anatomia das plantas de Esau: meristemas, célula e tecidos do corpo da planta: sua estrutura, função e desenvolvimento. Ray F. Evert: coordenação e tradução de Carmem Regina Marcati. Blucher, São Paulo
- Fahn A (1979) Secretory tissues in plants. Academic Press, London
- Gerrits PO (1991) The application of glycol methacrylate in histotechnology: some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology State University of Gröningen, Gröningen
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York
- Langenheim JH (2003) Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany. Timber Press, Portland, Cambridge
- Lima TAAC, Ribeiro JELS, Marques MOM, Facanali R, Lima MP (2016) Estimulo para produção de resina em *Protium hebetatum* Daly e avaliação dos constituintes químicos voláteis. Scientia Amazonia 5:21-24
- Liu P, Liang S, Yao N, Wu H (2012) Programmed cell death of secretory cavity cells in fruits of *Citrus grandis* cv. *Tomentosa* is associated with activation of caspase 3-like protease. Trees Structure and Function 26:1821-1835
- Lorenzi H (2002) Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Instituto Plantarum, Brasil
- Machado SR & Carmello-Guerreiro SM (2001) Estrutura e desenvolvimento de canais secretores em frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). Acta Botanica Brasilica: 15:189-195
- Machado SR, Rodrigues TM (2004) Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). Revista Brasileira de Botânica 27:135-147
- Machado SR, Canaveze Y, Rodrigues TM (2017) Structure and functioning of oil cavities in the shoot apex of *Metrodorea nigra* A. St.-Hil. (Rutaceae). Protoplasma 254:1661-1674

- Marinho C, Teixeira S (2016) Cytochemical localization of pectinases and cellulases in developing laticifers of *Maclura tinctoria* and *Ficus Montana* (Moraceae). European Microscopy Congress: Proceedings
- Matos FJA (1997) O Formulário Fitoterápico do professor Dias da Rocha, 2nd edn. UFC, Fortaleza
- Milanez FR (1977) Ontogênese dos laticíferos contínuos de *Neridium (Nerium) oleander* L. Trabalhos do XXVI Congresso Nacional de Botânica, Rio de Janeiro 1975:343-379
- Mc Nair JB (1918) Secretory canals of *Rhus diversiloba*. Botanical Gazette 65:268-273
- Nair GM, Patel KR, Subrahmanyam SV, Shah JJ (1981) Secretion of resin across the wall of the epithelial cell in the gum-resin canal of *Comiphora mukul* Engl. Annals of Botany 47:419-421
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. Protoplasma 59:368-373
- Papini A, Mosti S, van Doorn WG (2014) Classical macroautophagy in *Lobivia rauschii* (Cactaceae) and possible plastidial autophagy in *Tillandsia albida* (Bromeliaceae) tapetum cells. Protoplasma 251:719-725
- Paquet VE, Lessire R, Domergue F, Fouillen L, Filion G, Sedighi A, Charette SJ (2013) Lipid composition of multilamellar bodies secreted by *Dictyostelium discoideum* reveals their amoebal origin. Eukaryot Cell 12:1326–1334
- Raatikainen OJ, Taipale HT, Pelttari A & Lapinjoki SP (1992) An electron microscope study of resin production and secretion by the glands of seedlings of *Betula pendula* Roth. New Phytology 123:537-543
- Revilla J (2001) Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. SEBRAE-AM/INSPA, Manaus, MA
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. Journal of Cell Biology 17: 208-212
- Rodrigues TM, Santos DC, Machado SR (2011a) The role of the parenchyma sheath and PCD during the development of oil cavities in *Pterodon pubescens* (Leguminosae-Papilionoideae). Comptes Rendus Biologies 334:535-543
- Rodrigues TM, Teixeira SP, Machado SR (2011b) The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae–Caesalpinioideae). Flora - Morphology Distribution Functional Ecology of Plants 206:585-594
- Rodrigues TM & Machado SR (2012) Oil glands in *Pterodon pubescens* Benth. (Leguminosae-Papilionoideae): distribution, structure, and secretion mechanisms. International Journal of Plant Sciences 173:984-992

- Rodrigues MIA (2017) Anatomia do eixo vegetativo aéreo de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) com ênfase no sistema secretor em ambiente com influência das marés. Tese, Universidade Estadual Paulista
- Siani AC, Ramos MFS, Menezes-de-Lima O, Soares ROA, Rosas EC, Susunaga GS, Guimarães AC, Zoghbi MGB, Henriques MGMO (1999) Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology* 66:57-69
- Siedlecka A, Wiklund S, Péronne MA, Micheli F, Lesniewska J, Sethson I, Edlund U, Richard L, Sundberg B, Mellerowicz EJ (2008) Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cells of *Populus*. *Plant Physiology* 146:554–565
- Souza LR, Trindade FG, Oliveira RA, Costa LCB, Gomes VM, Cunha M (2016) Histochemical characterization of secretory ducts and essential oil analysis of *Protium* species (Burseraceae). *Journal of Essential Oil Research* 28:166-171
- Susunaga GS (1996) Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* March.(Burseraceae). Dissertation, University of Amazonas
- Tolera M, Menger D, Sass-Klaassen U, Sterck FJ, Copini P, Bongers F (2013) Resin secretory structures of *Boswellia papyrifera* and applications for frankincense yield. *Annals of Botany* 111:61-68
- Turner GW, Gershenzon J, Nielson EE, Froehlich JE, Croteau RB (1999) Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology* 120:879–886
- van Doorn WG, Papini A (2016) Plastid degeneration in *Tillandsia albida* (Bromeliaceae) and *Lobivia rauschii* (Cactaceae) provides evidence about the origin and destiny of multilamellar bodies in plants. *Phytomorphology* 66:103-112

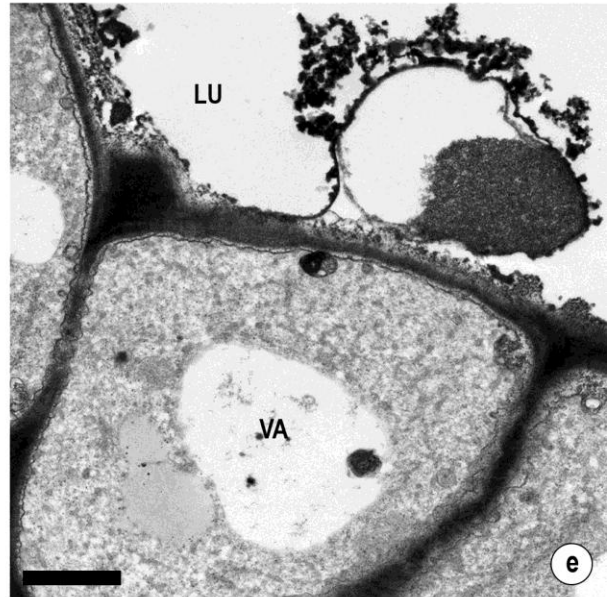
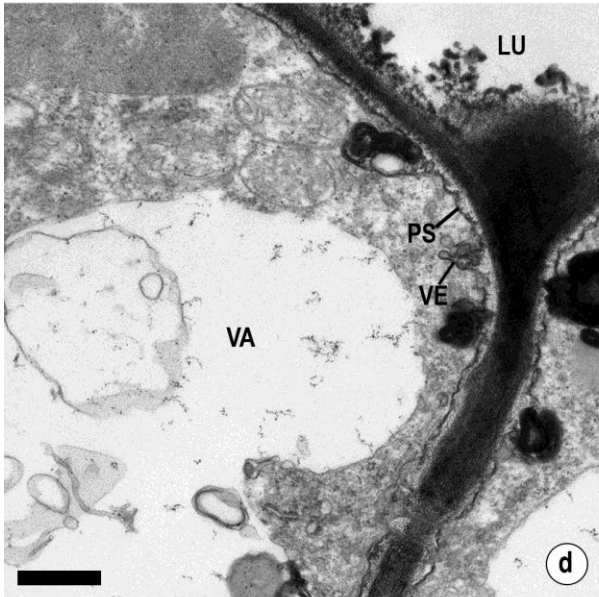
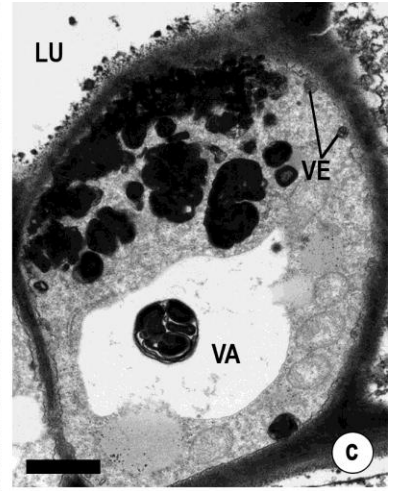
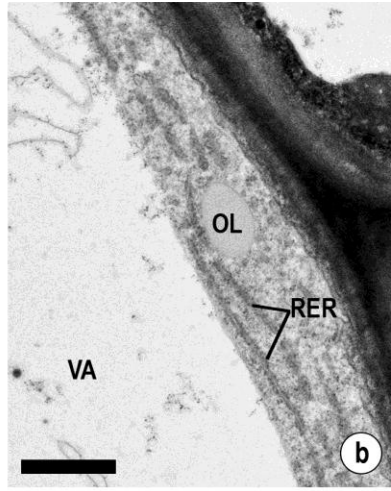
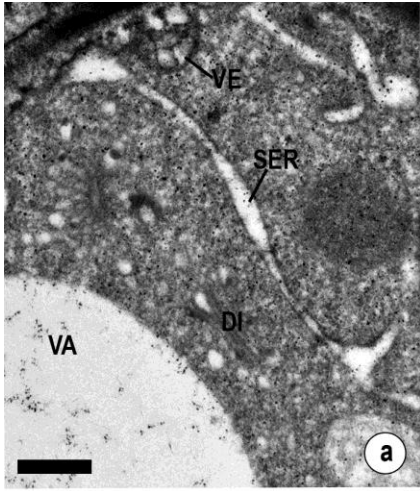
## Figures and legends

**Fig. 1** Electronmicrographies (TEM) of secretory canals in *Protium heptaphyllum*. **a** Mature canal with wide lumen (LU) and secretory epithelium (EP) surrounded by a parenchyma sheath (SH). **b** Secretory canal in early developmental stage with lumen (LU) filled with exudate heterogenous in aspect. Observe plasmodesmata (PD) connecting epithelial cells (EP). **c** Epithelial cell with dense cytoplasm, voluminous nucleus (NU) and small vacuole (VA). Plasmodesmata (PD) connect the epithelial and sheath cells. LU: lumen; MI: mitochondria. **d** Part of an epithelial cell showing mitochondria (MI), rough endoplasmic reticulum (RER), plastids (PL), oil drops (OL) and secretory vesicles (VE) filled with dense material. Note dense material adhered to the surface of the tangential wall facing the lumen (LU). LU: lumen. NU: nucleus; VA: vacuole. **e** Myelin-like figures (MF), mitochondria (MI), dictyosomes (DI) with numerous adjacent vesicles (VE) and oil drops (OL) in epithelial cells. **f** Epithelial cell with modified plastids (PL) with dense globules. MI: mitochondria; OL: oil drops. Scale bars: a (10nm); b (2nm); c-e, f (1nm).

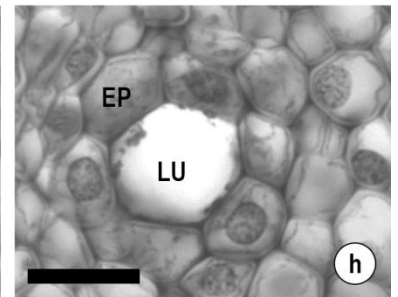
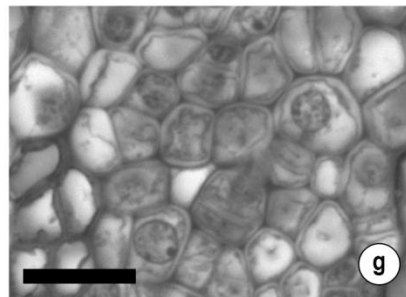
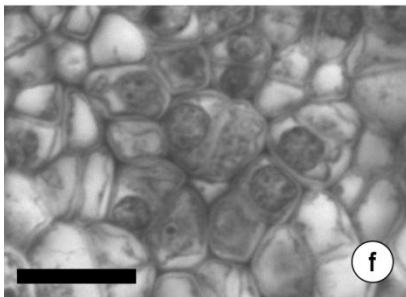
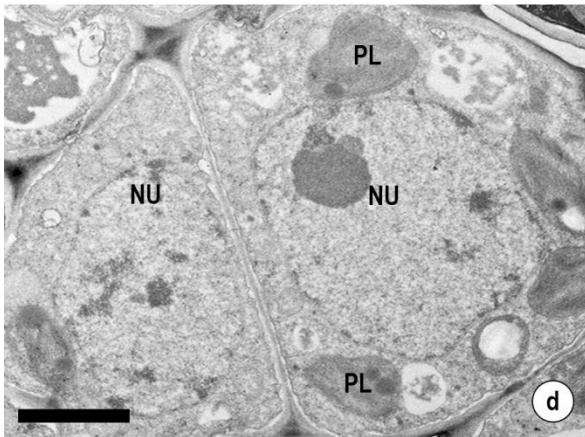
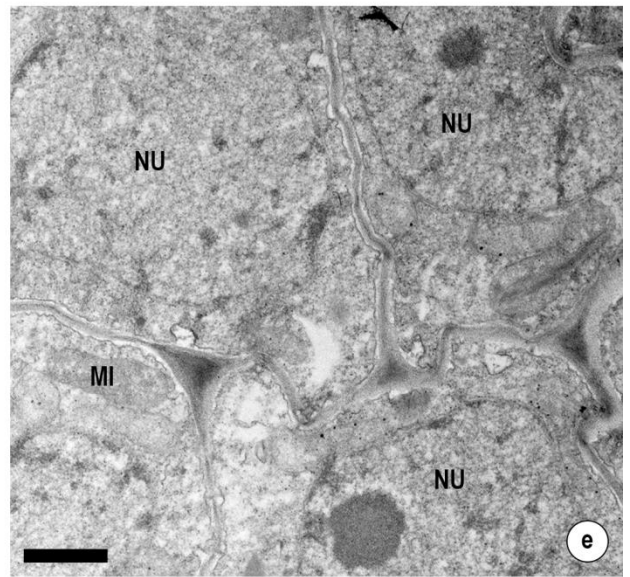
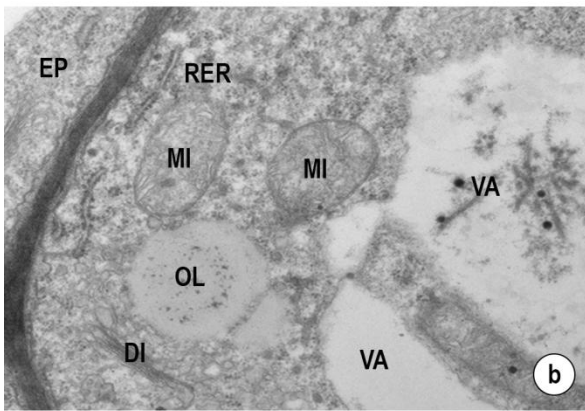
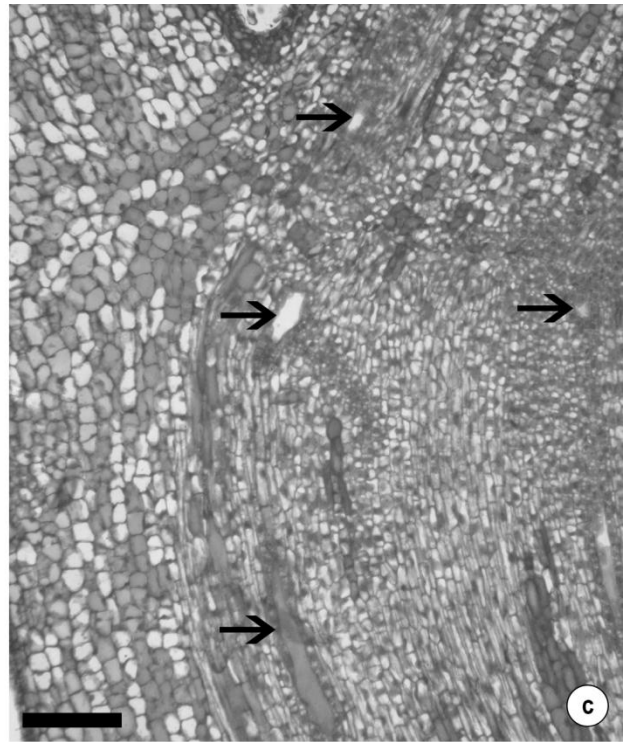
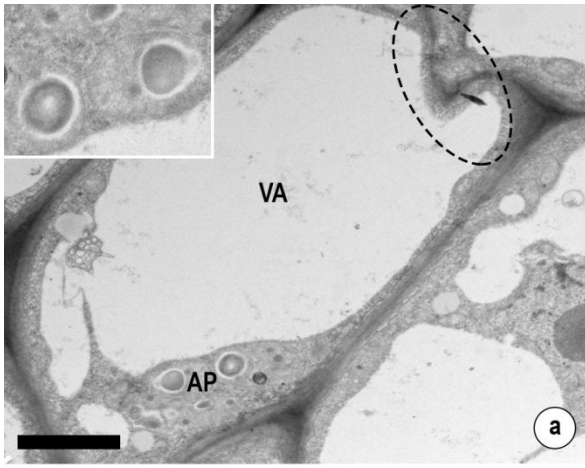


**Fig. 2** Electronmicrographies (TEM) of secretory canals in *Protium heptaphyllum*. **a** Part of an epithelial cell with smooth endoplasmic reticulum (SER) with dilated cisterns and hyperactive dictyosomes (DI). Note vesicles (VE) in the peripheral cytoplasm. **b** Extensive rough endoplasmic reticulum (RER) and oil drops (OL) in epithelial cell. VA: vacuole. **c** Cluster of electron-dense bodies in the cytoplasm and vacuole of epithelial cell. LU: lumen. VA: vacuole. VE: vesicles. **d** Electron-dense material accumulated in the periplasmic space (PS) of epithelial cell. LU: lumen. VA: vacuole. VE: vesicles. **e** Peeling of the tangential cell wall facing the lumen (LU). Scale bars: a, b, d (500nm); c, e (1nm).

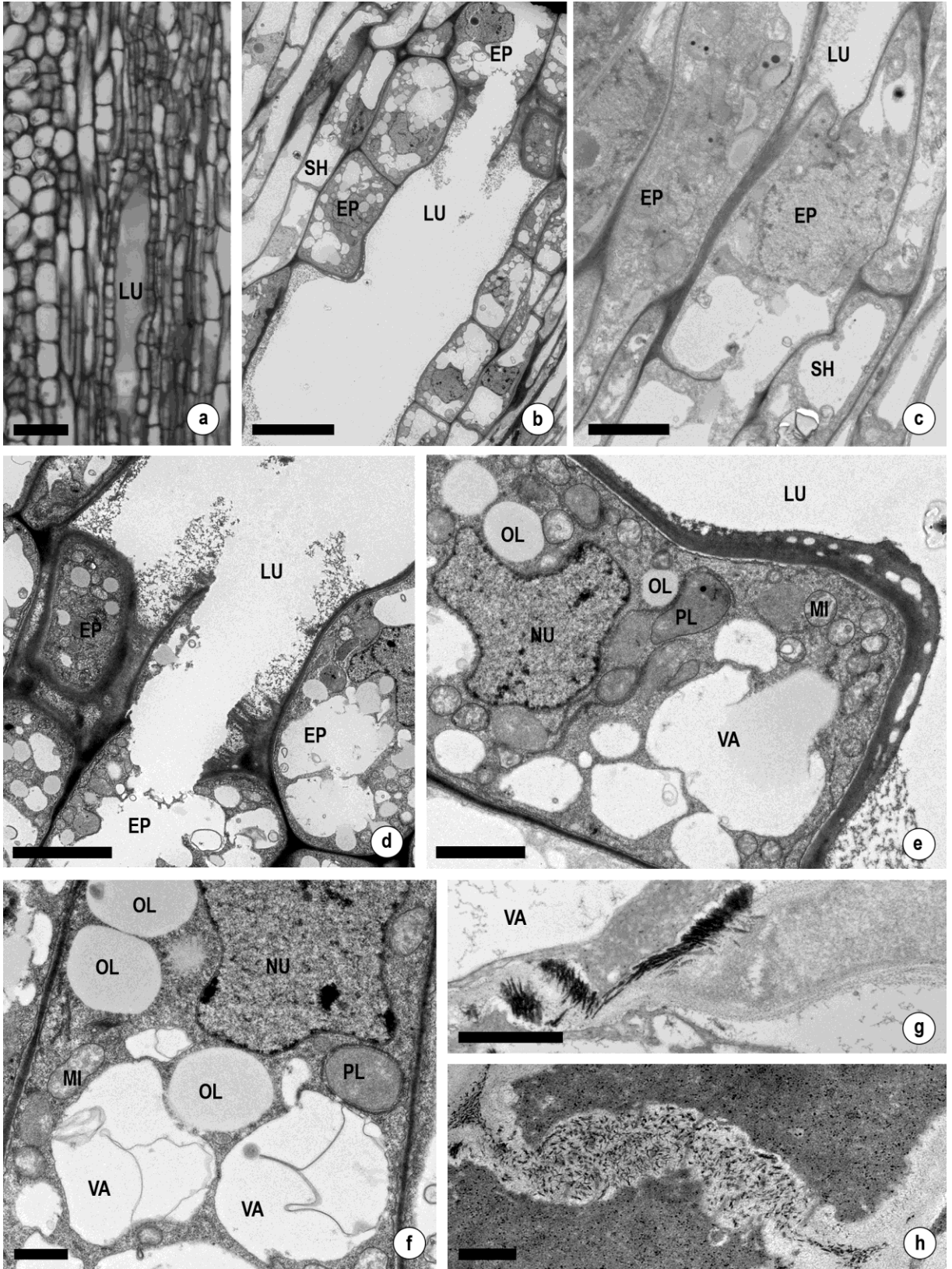




**Fig. 3** Light (c, f-h) and electronmicrographies (a, b, d, e) of secretory canals in *Protium heptaphyllum* stem. **a** Sheath cells (SH) with developed vacuoles (VA) and reduced cytoplasm with amyloplasts (AP). Note tapered ends of the sheath cells encircled. The insert details an amyloplast. EP: epithelial cell. **b** Detail of sheath cell showing mitochondria (MI), dictyosomes (DI), rough endoplasmic reticulum (RER) and oil drops (OL). VA: vacuole. EP: epithelium. **c** Longitudinal section through the shoot apex showing secretory canals (arrows) at different developmental stages. **d** Precursor pyramidal cells of the a secretory canal. NU: nucleus. PL: plastids. **e** Cluster of derivative cells. Note the swollen middle lamella among them. MI: mitochondria. NU: nucleus. **f-g**. Clustered derivative cells arranged around a small triangular intercellular space. **h** Epithelial cells (EP) arranged around a central lumen (LU). Scale bars: a (500nm); b (2nm); c (150µm); f-h (10µm); d (2nm); e (1nm)

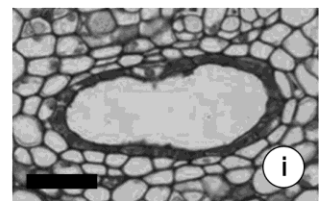
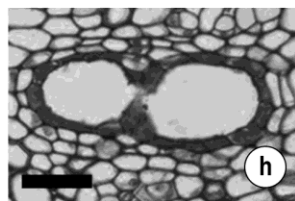
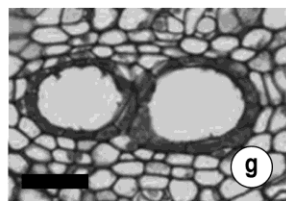
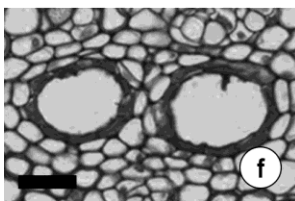
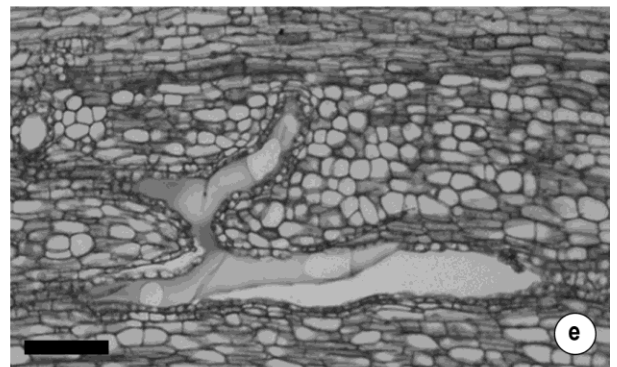
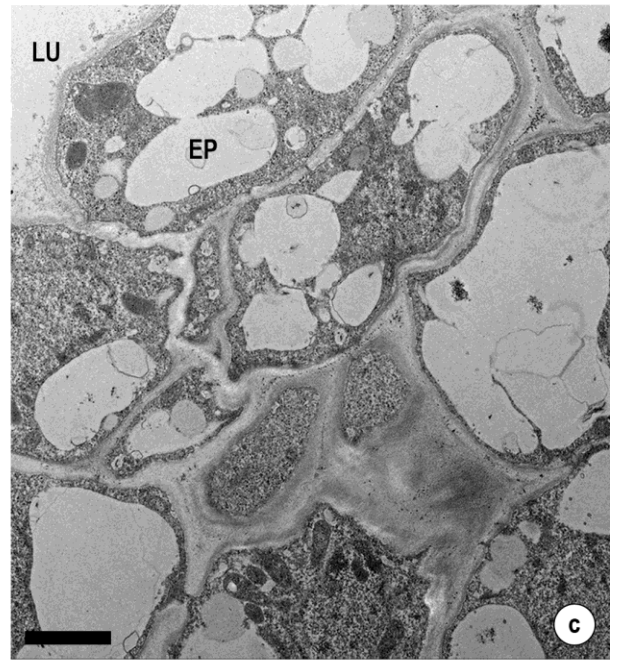
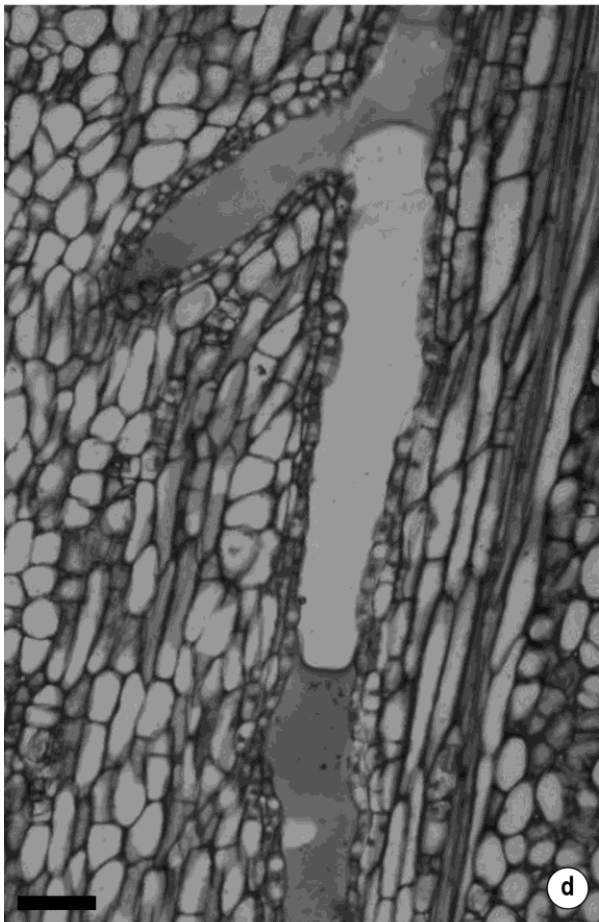
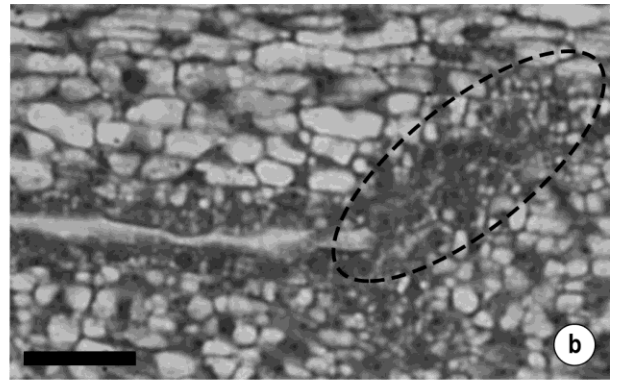
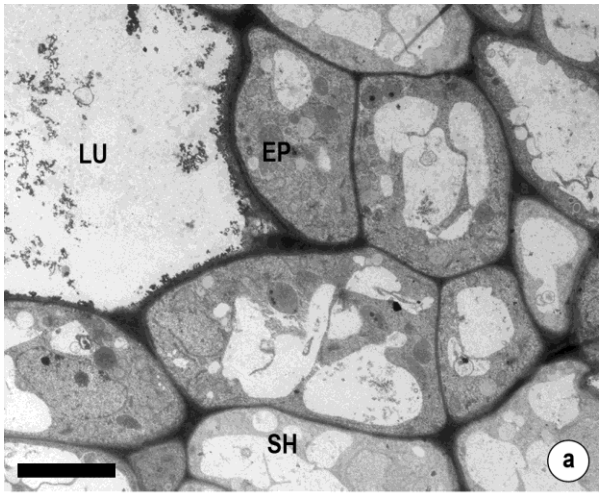


**Fig. 4** Developmental aspects of the secretory canals in *Protium heptaphyllum* primary stem .  
**a** Light microscopy. **b-h** TEM. **a** Mature canal with with irregular lumen (LU) width and elongating ends. **b** Elongating canal with irregular lumen (LU) and ruptured cell in the end. EP: epithelium. SH: sheath cell. **c** Epithelial cells (EP) with tapered ends between the radial walls of the neighboring epithelial cells. SH: sheath cell. LU: lumen. **d** End of an elongating canal with epithelial cells (EP) exhibiting swollen middle lamella with dissolution signals and broken cells. LU: lumen. **e** Epithelial cell showing irregular walls with loose appearance and discontinues areas forming hollows. Note reduced nucleus (NU), vacuoles (VA), mitochondria (MI) with disrupted cristae, plastids (PL) and oil (OL) drop. LU: lumen. **f** Epithelial cell with nucleus (NU) with irregular contour, mitochondria (MI) with lysis signals of matrix and vacuoles (VA) with membranous debris. PL: plastid. **g-h** Ultracytochemical tests for enzymes in the cell walls. **g** Cellulase. **h** Pectinase. Scale bars: a (150  $\mu$ m); g, h (500nm); b (10nm); d (5nm); c, e (2nm); f (1nm)



**Fig. 5** Aspects of fusion and ramification of secretory canals in *Protium heptaphyllum* primary stem. **a, c.** TEM. **b, d-i** Light microscopy. **a** Part of a secretory canal showing epithelial (EP) and sheath cells (SH) dividing periclinally. LU: lumen. **b** Longitudinal rows of small cells (encircled) adjacent to an enlarging canal. **c** Small rowed cells adjacent to the secretory epithelium (EP) showing irregular walls, swollen middle lamellae and dense and abundant cytoplasm. **d** Secretory canal with evident lateral ramification. **e** Fused secretory canals. **f-i** Cross sections showing fusion of adjacent canals. Note dissolution of the secretory epithelium in the contact region between canals. Scale bars: a,c (2nm); b (10µm); d, e (100 µm); f-i (25µm)





## **Influência do etileno no desenvolvimento dos espaços secretores de resina em *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae)**

### **Resumo**

A presença de espaços secretores (ES) de resina associados ao floema é um caráter constitutivo em espécies de Burseraceae. Fatores exógenos podem causar alterações na quantidade e na composição da resina produzida em espécies da família; entretanto, nenhuma informação foi encontrada quanto à influência desses fatores no desenvolvimento do sistema secretor. *Protium heptaphyllum* é conhecida pela produção de resina aromática com grande potencial econômico. Nessa espécie, espaços secretores de resina ocorrem associados ao floema. Nosso objetivo foi analisar a influência da simulação do estresse provocado pela aplicação exógena do Ethephon no desenvolvimento do sistema secretor de *P. heptaphyllum*. Plantas jovens foram submetidas à diferentes concentrações de Ethephon: 6g L<sup>-1</sup> (T1), 12g L<sup>-1</sup> (T2), 18g L<sup>-1</sup> (T3) e 24g L<sup>-1</sup> (T4). Amostras de folha e caule foram processadas segundo técnicas usuais em anatomia vegetal. Folhas de plantas tratadas com Ethephon mostraram aumento na área do lume dos ES, o que pode estar relacionado à ação do etileno em processos de degradação da parede celular. No caule primário, plantas do T2 e T3 apresentaram diminuição na área do lume em comparação com o grupo controle e T1. No caule em crescimento secundário, plantas do T4 apresentaram maior densidade de ES; entretanto, nessa região caulinar, plantas do T2 e T4 apresentaram ES com menor área do lume. Os resultados apontam para uma resposta diferencial do sistema secretor em órgãos em estrutura primária e secundária, o que pode estar relacionado à atuação distinta do hormônio nos diferentes meristemas. Nossos dados colaboram para o entendimento das respostas do sistema secretor de resina em espécies vegetais a fatores associados ao estresse e podem fornecer subsídios para a exploração sustentável da resina de *P. heptaphyllum*.

**Palavras-chave:** Breu-branco, densidade, Ethephon, lume, sistema secretor



## Introdução

A presença de estruturas secretoras no corpo vegetal, independentemente da ocorrência de injúrias, representa um aspecto constitutivo, considerado um dos mais importantes mecanismos de defesa das plantas contra a herbivoria (Langenheim 2003). Entretanto, fatores ambientais bióticos e abióticos podem influenciar na formação, distribuição e nos aspectos morfológicos das estruturas secretoras (Russin *et al.* 1988; Lin *et al.* 2001; Eyles *et al.* 2004; Rosner & Hanrup 2004; Moreira *et al.* 2008; Rodrigues *et al.* 2014; Tozin *et al.* 2017), induzindo mudanças qualitativas e quantitativas na secreção produzida (Langenheim & Stubblebine 1983; Langenheim 2003; Tozin *et al.* 2015, 2017).

A plasticidade fenotípica dos vegetais em resposta a fatores ambientais tem sido demonstrada nos níveis fisiológicos, morfológicos e anatômicos em seus órgãos vegetativos e reprodutivos. De forma geral, alterações nas condições ambientais ótimas para o desenvolvimento das plantas podem induzir o organismo vegetal a um estado de estresse (Dickison 2000), promovendo um desequilíbrio nas taxas fisiológicas e levando a produção de hormônios como o etileno (Taiz & Zeiger 2006).

O etileno é um hormônio gasoso importante na mediação das respostas das plantas ao estresse provocado por fatores bióticos e abióticos (Wang & Ecker 2002), regulando diversos processos durante o crescimento e desenvolvimento vegetal (Trobacher 2009). Trabalhos têm demonstrado que o aumento da concentração de etileno no corpo vegetal pode alterar o desenvolvimento do sistema secretor, levando à formação de maior número de espaços secretores em gimnospermas e angiospermas (Greenwood & Morey 1979; Nair *et al.* 1980; Fahn 1988; Tomás *et al.* 1993, Hudgins & Franceschi 2004), além de induzir o aumento do diâmetro glandular (Tomás *et al.* 1993) e aumentar de forma significativa a quantidade da produção da secreção produzida (Bhatt 1989; Scarazatti 2011; Zuñiga 2013). Nesse sentido, Tomás *et al.* (1993) observaram que, após tratamentos com Ethepon, substância que libera etileno lentamente por meio de hidrólise, os frutos de *Citrus paradisi* Macfad. apresentavam cavidades secretoras de óleo com maior diâmetro e células epiteliais mais volumosas, além de terem sido detectadas alterações na composição da secreção produzida.

Espécies de Burseraceae são conhecidas pela presença de espaços secretores de resina associados ao floema de folhas, caule e raiz (Metcalf & Chalk 1950; Tolera *et al.* 2013; Rodrigues 2017; Palermo *et al.* 2017a). Estudos têm demonstrado que a aplicação de Ethepon leva ao aumento da quantidade de resina produzida em *Commiphora wightii* (Bhatt *et al.* 1989) e *Protium hebetatum* (Scarazatti 2011), entretanto, não foram encontradas

informações sobre alterações no desenvolvimento do sistema secretor provocadas por essa substância em espécies da família.

*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand., popularmente conhecida como almécega ou breu-branco (Lorenzi 2002), é uma das espécies de Burseraceae mais comuns no Brasil. Ocorre em diferentes formações vegetacionais como restingas, florestas ripárias, matas de terra firme e solo alagado, cerrado, floresta pluvial e estacional (Santos *et al.* 2015; Rodrigues 2017), desde a região norte até o sudeste do país (Daly & Fine 2011; Bandeira *et al.* 2002; Citó *et al.* 2006), fazendo com que seja amplamente utilizada em projetos de restauração de áreas degradadas, principalmente próximos à corpos d'água (Lorenzi 2002).

A resina produzida por *P. heptaphyllum* é fortemente aromática e intensamente explorada pelas indústrias de cosméticos e medicamentos (Bandeira *et al.* 2002; Oliveira *et al.* 2005; Pontes *et al.* 2007; Amaral *et al.* 2006), além de garantir a proteção da planta contra ataques de herbívoros e patógenos, desde as fases iniciais do desenvolvimento vegetal até a fase adulta (Bowers *et al.* 2001; Sussunaga 1996; Harbone 1993). Trabalhos recentes têm demonstrado a plasticidade fenotípica do sistema secretor de *P. heptaphyllum*. Rodrigues (2017) observou que indivíduos adultos submetidos ao alagamento cíclico provocado pela maré, em ambiente de restinga, apresentavam espaços secretores mais numerosos e com lume mais amplo, em comparação com indivíduos em terra firme na mesma região, o que foi associado à maior produção de etileno em plantas no ambiente alagado. Entretanto, estudos experimentais sobre as respostas do sistema secretor dessa espécie ao estresse provocado por fatores exógenos estão faltando.

Este trabalho teve como objetivo analisar a influência da simulação do estresse provocado pela aplicação exógena do Ethephon no desenvolvimento do sistema secretor de *P. heptaphyllum*.

## **Material e Métodos**

### *Aplicação de Ethephon em plantas jovens*

Plantas jovens (6 meses) foram cultivadas em casa de vegetação sob sombrite 50% em vasos com capacidade de 12 L. Para a neutralização da acidez do solo foi feita mistura de cal virgem e terra (11g/vaso), um mês antes da transferência das mudas para os vasos. Após o período de aclimação de um mês, quando o eixo aéreo das plantas apresentava cerca de 15 cm de comprimento, foi realizada aplicação de solução de Ethephon sobre a gema apical caulinar dos indivíduos.

Para o preparo desta solução, foi utilizado o produto comercial Ethrel<sup>®</sup> (ácido 2-cloretil-fosfônico - 240 g L<sup>-1</sup> - 24% (m/v), produzido pela Bayer), além de Natur'l óleo<sup>®</sup> (espalhante adesivo, fabricado pela Stoller do Brasil, composto de 93% de óleo vegetal), ácido fosfórico (Produto comercial P-51<sup>®</sup>, produzido pela Stoller do Brasil) e água destilada. A solução de Ethephon foi diluída em solução de Natur'l óleo a 0,25% e o pH da calda foi acidificado para 4,5, utilizando ácido fosfórico.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, compostos por 5 tratamentos (T0, T1, T2, T3, T4), com 7 repetições cada, totalizando 35 indivíduos. As concentrações de Ethephon utilizadas foram: T0 (controle – água destilada e Natur'l óleo); T1 (Ethephon 6g L<sup>-1</sup>); T2 (Ethephon 12g L<sup>-1</sup>); T3 (Ethephon 18g L<sup>-1</sup>); e T4 (Ethephon 24g L<sup>-1</sup>). O ápice caulinar das plantas foi pulverizado com a solução por meio de pulverizador manual de CO<sub>2</sub> pressurizado, com 0,3 kgf cm<sup>-2</sup>, com bicos cônicos. As aplicações nos diferentes grupos de tratamento foram feitas em locais espaçados para evitar a deriva (adaptado de Bhatt *et al.* 1989; Ella *et al.* 2003).

De cada planta, as primeiras folhas formadas depois da aplicação dos tratamentos foram coletadas após sua completa expansão. Da mesma forma, foram coletadas porções de caule jovem (localizadas a 0,5cm abaixo do ápice) formadas após a aplicação dos tratamentos, além de amostras de caule em crescimento secundário localizadas a 7 cm abaixo do ápice. Essa coleta foi realizada cerca de dois meses após a aplicação dos tratamentos.

#### *Microscopia de luz (ML)*

Amostras da região mediana do limbo foliolar (obtida a partir do folíolo apical), caule jovem e caule em estrutura secundária foram fixadas em FAA 50 (Johansen 1940), desidratadas em série etílica e embebidas em resina metacrilato (Gerrits 1991). Secções transversais (5 µm) foram obtidas com auxílio de um micrótomo rotativo semiautomático e coradas com Azul de Toluidina 0,05% pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964). Lâminas permanentes foram montadas com lamínulas utilizando-se resina sintética Entelan<sup>®</sup> como meio de montagem.

O laminário foi analisado ao microscópio de luz Olympus BX 41 e os resultados relevantes documentados através do sistema de câmera digital acoplada.

#### *Análises morfométricas*

Análises quantitativas foram realizadas ao microscópio de luz com auxílio do software Olympus Cell B – Imaging Software for Life Science Microscopy. A densidade e a área do

lume dos espaços secretores foram mensuradas em uma área de  $1\text{mm}^2$  em secções transversais de caule em estrutura primária e secundária. Em folhas, foram analisados todos os espaços secretores presentes na nervura principal e aqueles localizados nas nervuras imersas no mesofilo (localizadas entre a nervura principal e o bordo do lado direito do folíolo).

#### *Análises estatísticas*

Para a verificação da homogeneidade das variâncias dos tratamentos utilizou-se o Teste Levene. Ao atender as pressuposições estatísticas, os dados morfométricos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade, com ajuda do programa estatístico SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

### **Resultados**

#### *Efeito da aplicação de Ethephon no desenvolvimento das plantas*

As plantas submetidas aos diferentes tratamentos mostraram comportamentos distintos de acordo com a concentração de Ethephon recebida. Plantas dos tratamentos T0 (Fig. 1a) e T1 (Fig. 1b) não mostraram alterações morfológicas ou sinais de injúrias nas gemas apicais. Dos indivíduos submetidos ao T2, quatro deles mostraram sinais de ressecamento nas gemas apicais caulinares, resultando na morte deste tecido; contudo houve rebrota a partir de gemas laterais. Com relação aos T3 e T4, após a aplicação do regulador vegetal, houve o ressecamento e morte das gemas apicais caulinares de todos os indivíduos (Fig. 1c); além disso, alguns sofreram abscisão foliar completa (Fig. 1d). As rebrotas começaram após 15 dias da aplicação dos tratamentos a partir de gemas caulinares laterais (Fig. 1d insert, e).

#### *Efeito da aplicação de Ethephon nos espaços secretores no limbo foliolar*

Espaços secretores foram observados associados ao floema das nervuras imersas no mesofilo do limbo foliolar (Fig. 2a) e da nervura principal (Fig. 2b) em todos os tratamentos. Essas glândulas apresentaram-se constituídas por epitélio secretor unisseriado e lume (Fig. 2B insert) em todos os tratamentos.

A densidade dos espaços secretores no limbo foliolar variou entre os tratamentos ( $P=0.0236$ ) (Tab. 1). Plantas tratadas com maiores concentrações de Ethephon (T2, T3, T4) mostraram menor densidade de espaços secretores que plantas que receberam menor concentração do regulador (T1). Entretanto, não houve variação na densidade de espaços secretores entre o tratamento controle e as plantas dos demais tratamentos (Tab. 1).

A área do lume dos espaços secretores no limbo foliar variou de forma significativa entre plantas mantidas como controle e plantas tratadas com Ethephon ( $P=0.0241$ ) (Tab. 1). Plantas tratadas com Ethephon apresentaram maior área do lume dos espaços secretores, em comparação com os indivíduos do tratamento controle (T0), independentemente da concentração hormonal recebida (Tab. 1).

#### *Efeito da aplicação de Ethephon nos espaços secretores no caule*

Espaços secretores foram observados associados ao floema no caule em estrutura primária (Fig. 2c) e secundária (Fig. 2d) de *P. heptaphyllum*.

A densidade de espaços secretores variou de forma significativa entre os tratamentos no caule secundário ( $P=0,0001$ ). Plantas mantidas sob maior concentração de regulador vegetal (T4) apresentaram a maior densidade de espaços secretores. No entanto, não houve resposta significativa quanto a densidade de espaços secretores no caule em estrutura primária ( $P=0,1019$ ). (Tab. 1). Com relação à área do lume, foram encontradas alterações significativas para caule em estrutura primária e secundária ( $P=0,032$ ;  $P=0,0118$ , respectivamente) (Tab. 1). Quanto ao caule em crescimento primário, plantas sob os tratamentos T2 e T3 mostraram os menores valores para área do lume de espaços secretores, em comparação com plantas do T0 e T1 (Tab. 1). No caule em estrutura secundária, plantas mantidas sob os tratamentos T2 e T4 apresentaram os menores valores para área do lume dos espaços secretores (Tab. 1).

#### **Discussão**

Neste estudo, a administração do Ethephon induziu respostas distintas no desenvolvimento do sistema secretor em folhas e caule em estrutura primária e secundária de *P. heptaphyllum*. O Ethephon é uma substância sintética que, em contato com os tecidos vegetais, estimula a liberação do etileno (Zuñiga 2013), um hormônio com efeito morfogenético (Trobacher 2009) importante na mediação das respostas das plantas ao estresse (Wang & Ecker 2002). Uma vez presente nos tecidos vegetais, o etileno se liga a receptores de membrana, ativando proteínas de sinalização que darão início a transcrição de genes (Liu 2016) envolvidos em diversos processos do metabolismo primário e secundário e respostas celulares a estímulos e estresse (Nie *et al.* 2016).

No caule em crescimento secundário, maior densidade de espaços secretores foi registrada em plantas mantidas sob a maior concentração de Ethephon administrada nesse trabalho ( $24\text{g L}^{-1}$ ). A indução da formação de espaços secretores no caule em estrutura

secundária pelo tratamento com Ethephon é reportada em trabalhos com diversas outras espécies de plantas (Greenwood & Morey 1979; Gedalovish & Fahn 1985; Hudgins & Franceschi 2004). O etileno é um hormônio vegetal de grande importância na regulação da atividade cambial, controlando a divisão celular e a diferenciação dos tecidos nesta região (Taiz & Zeiger 2017). O aumento na densidade de espaços secretores observados no floema secundário de *P. heptaphyllum* sob alta concentração de Ethephon pode estar relacionado ao fato de que o etileno é capaz de promover uma reprogramação das células cambiais que normalmente dariam origem a células condutoras dos tecidos vasculares (Franceschi *et al.* 2000), induzindo a formação de células epiteliais (Lachaud *et al.* 1999; Savidge 2001; Hudgins & Franceschi 2004).

Com relação à densidade de espaços secretores em folhas e caule em estrutura primária, a aplicação dos diferentes tratamentos não promoveu alterações significativas em comparação com grupo controle. Isso pode indicar que células do procâmbio e câmbio possam responder de maneira diferente a presença de etileno no corpo vegetal, sendo as células procambiais menos sensíveis ao hormônio. Nesse contexto, deve-se considerar que as respostas hormonais diferem entre os tecidos, o que implica no fato de que nem todos os tipos celulares são igualmente importantes para a geração de respostas (Vandenbussche *et al.* 2012). De acordo com Dugardeyn *et al.* (2008), todos os órgãos vegetais são capazes de sintetizar etileno, embora a taxa produção esteja relacionada ao tipo de tecido e seu estágio de desenvolvimento. Nesse sentido, maiores concentrações do hormônio ocorrem em porções mais velhas, em crescimento secundário, no corpo da planta, sendo que altas concentrações de etileno são comumente encontradas na região cambial (Taiz & Zeiger 2017). Assim, sugerimos que devido às menores taxas de etileno no ápice caulinar, as células dessa região sejam menos sensíveis a esse hormônio. Estudos mais aprofundados devem ser conduzidos para verificar essa hipótese, em especial estudos envolvendo os receptores de membranas para o etileno nos meristemas primários e laterais.

No que se refere à área do lume dos espaços secretores, folhas e caule de *P. heptaphyllum* também responderam de formas distintas aos tratamentos com Ethephon. Folhas de plantas que receberam a aplicação de Ethephon apresentaram espaços secretores com maior diâmetro do lume, em comparação com as plantas do grupo controle, independentemente da concentração do hormônio utilizada. Esse fato pode ser associado ao efeito do etileno na síntese de enzimas digestivas envolvidas na dissolução de componentes parietais (Pech *et al.* 1998; Fagan *et al.* 2015) que promovem a dissolução da lamela média e o afastamento das células, levando ao aumento de espaços intercelulares (Fagan *et al.* 2015).

Contrariamente ao observado nas folhas, para o caule, houve uma tendência à diminuição do lume dos espaços secretores com a aplicação do Ethephon. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que hormônios podem promover respostas diferenciais em tecidos de mesma natureza ocorrentes em diferentes órgãos (Vandenbussche *et al.* 2012). Entretanto, em *P. heptaphyllum*, a ampliação do sistema secretor parece ser um fenômeno natural e independente da ocorrência de estresse (Rodrigues 2017; Palermo *et al.* 2017b). No caule em estrutura primária e secundária dessa espécie, mais do que a ampliação no sentido da largura dos canais, tem sido registrada a ocorrência de alongamento pelas extremidades, ramificação e fusão de canais por um processo complexo que envolve separação de células, morte celular e crescimento intrusivo (Rodrigues 2017; Palermo *et al.* 2017b). Assim, supomos que, no caule, o aumento na concentração de etileno possa favorecer os processos esquizolisígenos envolvidos na expansão do sistema secretor, estimulando a síntese de enzimas para a dissolução da lamela média, e atuando no processo de morte celular programada, envolvido no alongamento, ramificação e fusão de canais mais que no aumento de sua circunferência. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar se os tratamentos utilizados nesse trabalho podem estimular ainda mais a ocorrência de crescimento pelas extremidades, fusão e ramificação de canais secretores em *P. heptaphyllum* pelo favorecimento dos processos envolvidos no estabelecimento dessa complexa rede secretora.

O aumento do lume e densidade dos espaços secretores por ação da aplicação de Ethephon pode significar incremento no acúmulo da secreção produzida. De fato, diversos estudos têm relacionado a aplicação de reguladores vegetais com o aumento na produção de resinas, óleos e gomas em diversas espécies (Gadalovich & Fahn 1985; Bhatt & Ram 1990; Ella 2003; Kanzaria 2015; Garde-Cerdan 2016). Em *Acacia senegal*, maior produção de exsudato foi registrada em indivíduos que foram tratados com maior concentração de Ethephon (Bhatt & Ram 1990). Quanto às espécies de Burseraceae, em *Protium hebetatum*, a produção de resina aumentou de 5 a 6 vezes após aplicação deste regulador vegetal no caule secundário (Scarazatti 2011). Maiores concentrações de Ethephon também foram responsáveis pelo incremento na produção de resina no caule secundário de *Commiphora wightii*, sendo registrado aumento de 22 vezes na quantidade de secreção produzida como resultado da aplicação do regulador (Bhatt *et al.* 1989). Essas respostas podem ser ocasionadas pelo aumento do lume ou maior densidade de espaços secretores induzidos pelo etileno, assim como aqui observado para o caule secundário de *P. heptaphyllum*.

Nesse estudo observamos que altas concentrações de Ethephon produziram efeitos danosos aos ápices caulinares de *P. heptaphyllum*. Plantas submetidas aos tratamentos T3 e

T4 apresentaram danos morfológicos severos que culminaram com o ressecamento e morte de suas gemas apicais, além da abscisão foliar em vários indivíduos. Esses tratamentos não estimularam a formação de espaços secretores adicionais no caule em crescimento primário e folhas de *P. heptaphyllum*; no entanto, essa resposta foi diferente para as amostras de caule secundário, principalmente quando se compara o grupo controle (T0) com plantas submetidas à maior concentração de Ethephon (T4) onde a densidade de espaços secretores foi significativamente maior. Embora nosso estudo tenha sido realizado com plantas jovens de *P. heptaphyllum*, esperamos resposta similar do sistema secretor em plantas adultas, devido a constância das características funcionais do câmbio ao longo do desenvolvimento do caule (Evert 2006).

Considerando que a extração do óleo-resina de *P. heptaphyllum* para fins medicinais e comerciais se dá a partir da casca (Scarazatti 2011), mais especificamente dos espaços secretores presentes no floema secundário, sugerimos que concentrações mais altas do regulador vegetal poderiam produzir resultados mais interessantes em termos de produtividade da secreção. Entretanto, pesquisas adicionais sobre alterações na produtividade da secreção em plantas de *P. heptaphyllum* sob administração de Ethephon devem ser realizadas. Para diversas espécies de interesse comercial, estudos vêm sendo desenvolvidos no intuito de encontrar a concentração adequada de Ethephon que estimule a produção da secreção, sem causar danos aos indivíduos. Por exemplo, em *Anacardium occidentale*, que pertence a Anacardiaceae, grupo irmão de Burseraceae, as concentrações mais indicadas de Ethephon são 12 a 48g L<sup>-1</sup> para incremento na extração de goma (Lima *et al.* 2001).

Nossos resultados preenchem uma lacuna existente nas informações sobre a influência de fatores exógenos no desenvolvimento do sistema secretor de resina em espécies nativas e fornecem dados para o entendimento da tolerância das plantas ao estresse, além de fornecer subsídios para a exploração sustentável da resina em *P. heptaphyllum*.

### **Referências bibliográficas**

- Amaral FMM, Ribeiro MNS, Barbosa-Filho JM, Reis AS, Nascimento FRF, Macedo, RO (2006) Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16:696-720
- Bandeira PN, Pessoa ODL, Trevisan MTS, Lemos TLG (2002) Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. *Química Nova* 25:1078-1080
- Bhatt JR, Nair MNB, Ram RYM. (1989) Enhancement of oleo-gum-resin production in *Commiphora wightii* by improved tapping technique. *Current Science* 58:349-357



- Bhatt JR, Ram RYM. (1990) Ethephon-induced gum production in *Acacia Senegal* and its potential value in the semi-arid regions of India. *Current Science* 59:1247-1250
- Bowers WS, Evans PH, Venable DL, Becerra JX (2001) Interactions between chemical and mechanical defenses in the plant genus *Bursera* and their implications for herbivores. *American Zoologist* 41:865-876
- Citó AGL, Costa FB, Lopes JAD, Oliveira VMM, Chaves MH (2006) Identificação dos constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8:4-7
- Daly DC, Fine WA (2011) A new amazonian section of *Protium* (Burseraceae) including both edaphic specialist and generalista taxa. *Studies in Neotropical Burseraceae XVI. Systematic Botany* 36:939-949
- Dickison WC (2000). *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press, USA
- Dugardeyn J, Vandebussche F, Straeten DVD (2008) To Grow or Not to Grow: What Can We Learn on Ethylene-gibberellin Cross-talk by in Silico Gene Expression Analysis? *Journal of Experimental Botany* 59:1–16
- Ella AB, Ramos MDR, Cortez JR (2003) Inducement of almaciga resin production through ethrel application. In: XII World Forest Congress, 2003, Québec city, Canada
- Eyles A, Davies NW, Mohammed CM (2004) Traumatic oil glands induced by pruning in the wound-associated phloem of *Eucalyptus globules*: Chemistry and histology. *Trees* 18:204-210
- Evert RF (2006) *Esau's Plant Anatomy. Meristems, cells and tissues of the plant body. Their structure, function and development*, 3rd edn. John Wiley and Sons, New Jersey
- Fagan EB, Ono EO, Rodrigues JD, Chalfun junior A, Dourado Neto D (2015) *Fisiologia Vegetal: Reguladores vegetais*. São Paulo, Andrei
- Fahn A (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New phytologist* 108:229-257
- Franceschi VR, Krokene P, Krekling T, Berryman AA, Christiansen E (2000) Phloem parenchyma cells are involved in local and distant defense responses to fungal inoculation or bark-beetle attack in Norway spruce (Pinaceae). *American Journal of Botany* 87:314–326
- Garde-Cerdan T, Portu J, López R, Santamaría P (2016) Effect of methyl jasmonate application to grapevine leaves on grape amino acid content. *Food chemistry* 203:536-539
- Gedalovich E, Fahn A (1985) Ethylene and gum duct formation in *Citrus*. *Annals of Botany* 56:571-577
- Gerrits PO (1991) *The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles*. Department of Anatomy and Embryology State University Groningen, Netherlands

- in the wound-associated phloem of *Eucalyptus globules*: chemistry and histology. *Trees* 18:204-210
- Greenwood C, Morey P (1979) Gummosis in honey mesquite. *Botanical Gazette* 140:32-38
- Harbone JB (1993) Introduction to ecological biochemistry, 4th ed. London: Academic Press
- Hudgins JW, Franceschi VR (2004) Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. *Plant Physiology* 135:1-16
- Johansen DA (1940). *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill
- Kanzaria DR, Polara ND, Patel HN, Senjaliya HJ (2015) Response of *Acacia Senegal* L. to Ethephon for Gum Production. *International Journal of Research Studies in Agricultural Sciences* 1:7-9
- Lachaud S, Catesson AM, Bonnemain JL (1999) Structure and functions of the vascular cambium. *Comptes Rendus de Academie des Sciences, Series III* 322:633–650
- Langenheim JH, Stubblebine WH (1983) Variation in leaf resin composition between parent tree and progeny in *Hymenaea*: Implications for herbivory in the humid tropics. *Biochemical systematics and ecology* 11:97-106
- Langenheim JH (2003) *Plant resins: chemistry, evolution, ecology and ethnobotany*. Timber Press, Portland, Cambridge
- Lima AC, Santos RA, Almeida FAG, Bandeira, CT (2001). Estimulantes químicos na extração da goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*, L.). *Ciência Rural* 31:409-415
- Lin J, Sampson DA, Ceulemans R (2001) The effect of crown position and tree age on resin-canals density in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Canadian Journal of Botany* 79:1257-1261
- Liu JP (2016) Molecular mechanism underlying ethylene stimulation of latex production in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). 30:1913-1921
- Lorenzi H, Matos FJA (2002) *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Plantarum
- Metcalf CR, Chalk L (1950) *Anatomy of the dicotyledons leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economy uses*. Clarendon press, Oxford
- Moreira CGA, Schwan-Estrada KRF, Bonaldo SM, Stangarlin JR, Cruz MES (2008) Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. *Summa Phytopathologica* 34:332-337

- Nair MNB, Patel KR, Shah JJ, Pandalai RC (1980) Effect of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) on gummosis in the bark of *Azadirachta indica*. Indian Journal of Experimental Biology 18:500-503
- Nie Z, Kang G, Duan C, Li Y, Dai L, Zeng R (2016) Profiling Ethylene-Responsive Genes Expressed in the Latex of the Mature Virgin Rubber Trees Using cDNA Microarray. PLoS ONE 11: e0152039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152039>
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. Protoplasma 59:368-373
- Oliveira FA, Costa CLS, Chaves MH, Almeida FRC, Cavalcante IJM, Lima AF, Lima Jr RCP, Silva RM, Campos AR, Santos FA, Rao VSN (2005) Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. Life Sci 77:2942-2952
- Palermo FH, Nicolai J, Seixas DP, Silva SCM, Rodrigues TM (2017a) Distribution, morphology, and histochemistry of the secretory system in roots of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). Holos environment (suplemento) In Simpósio de Biologia Vegetal, Rio Claro
- Palermo FH, Rodrigues MIA, de Nicolai J, Machado SR, Rodrigues TM (2017b) Resin secretory canals in *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae): a tridimensional branched and anastomosed system. Protoplasma <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1197-6>
- Pech JC, Ayub V, Latche A (1998) Ethylene dependent and ethylene independent pathways in the melon. Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene II (Island of Santorini, Cyclades, Greece). p. 46
- Pontes WJT, Oliveira JCG de, Câmara CAG da, Lopes ACHR, Gondim-Júnior MGC, Oliveira JV, de Barros R, Schwartz MOE (2007) Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). Acta Amazonica 37:103-110
- Rodrigues MIA (2017) Anatomia do eixo vegetativo aéreo de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand. (Burseraceae) com ênfase no sistema secretor em ambiente com influência das marés. Tese, Universidade Estadual Paulista
- Rodrigues TM, Buarque PFSM, Coneglian AG, Reis DC (2014) Light and temperature induce variations in the density and ultrastructure of the secretory spaces in the diesel-tree (*Copaifera langsdorffii* Desf. - Leguminosae). Trees 28:613-623

- Rosner S, Hannrup B (2004) Resin canal traits relevant for constitutive resistance of Norway spruce against bark beetles: environmental and genetic variability. *Forest Ecology and Management* 200:77-87
- Russin WA, Uchytel TF, Feistner G, Durbin RD (1988) Developmental changes in content of foliar secretory cavities of *Tagetes erecta* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 75:1787-1793
- Santos BNV, Larocca DG, Facundes OS, Súniga L, Silva IV (2015). Anatomia foliar de *Protium pilosum* (Cuatrec.) Daly coletada em área de transição Amazônia-cerrado. *Cáceres* 2:232-237
- Savidge RA (2001) Intrinsic regulation of cambial growth. *Journal of Plant Growth Regulation* 20:52-77
- Scarazatti COS (2011) Produção de resina de Breu (Burseraceae) no assentamento rural Cristo Rei do Uatumã – Amazonas. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, AM
- Sussunaga GS (1996) Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie *Protium heptaphyllum* March.(Burseraceae). Dissertação, Universidade do Amazonas
- Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant physiology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates
- Taiz L, Zeiger E (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal* [tradução: Alexandra Antunes Mastroberti ... et al.] ; revisão técnica: Paulo Luiz de Oliveira. – 6. ed. – Porto Alegre : Artmed
- Tolera M, Menger D, Sass-Klaassen U, Sterck FJ, Copini P, Bongers F (2013) Resin secretory structures of *Boswellia papyrifera* and applications for frankincense yield. *Annals of Botany* 111:61-68
- Tomás AO, García-puig D, Sabater F, Porras I, García-lídon A, Del rio JA (1993) Influence of ethylene and ethephon on the sesquiterpene nootkatone production in *Citrus paradisi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:1566-1569
- Tozin LRS, Carvalho SF, Machado SR, Rodrigues TM (2015) Glandular trichome diversity on leaves of *Lippia organoides* Kunth and *Lippia stacyoides* Cham. (Verbenaceae): Morphology, histochemistry and ultrastructure. *Botany* 93:297-306
- Tozin LRS, Rodrigues TM. (2017) Morphology and histochemistry of glandular trichomes in *Hyptis villosa* Pohl ex Benth. (Lamiaceae) and differential labeling of cytoskeletal elements. *Acta Botanica Brasilica*. 31:330-343
- Trobacher CP (2009) Ethylene and programmed cell death in plants. *Botany* 87:757-769
- Vandenbussche F, Vaseva I, Vissenberg K, Van der Straeten V (2012) Ethylene in vegetative development: a tale with a riddle. *New Phytologist*. 194:895-909

Wang KLC, Li H, Ecker JR (2002) Ethylene Biosynthesis and signaling networks. *The plant cell* 14:131-151

Zuñiga RM (2013) Extração induzida de resina em duas espécies de *Protium* Burm f. e análise química do óleo essencial da resina em *P. strumosum* Daly, na reserva Florestal dolpho Ducke – AM. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM

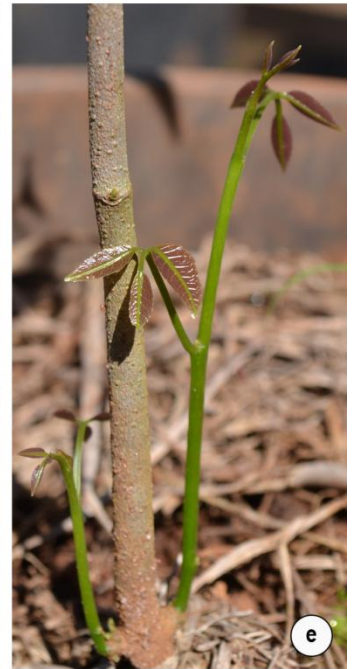
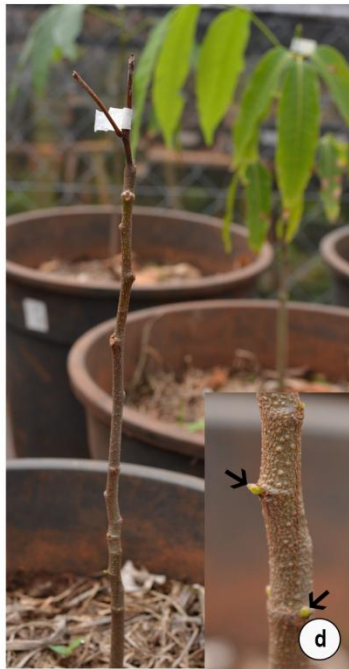
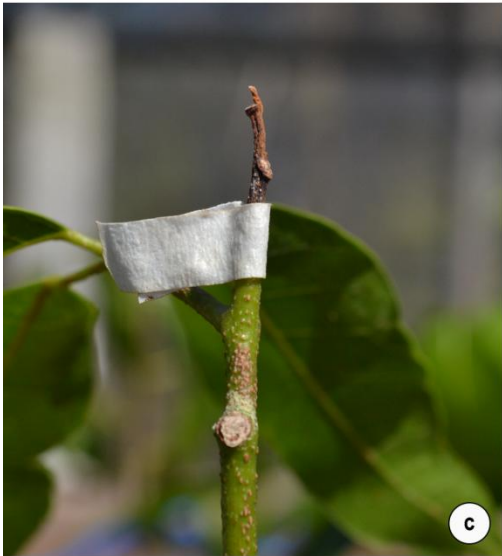
**Tabela 1.** Dados médios  $\pm$  desvio padrão da densidade e área do lúmen de espaços secretores no limbo foliolar, caule em estrutura primária e caule em estrutura secundária de plantas jovens de *Protium heptaphyllum* ( $n=7$ ) tratadas com diferentes concentrações de Ethephon

Tratamento	Concentração de Ethephon (g L <sup>-1</sup> )	Densidade (1mm <sup>2</sup> )			Área do lúmen (µm <sup>2</sup> )		
		Limbo Foliolar	Caule primário	Caule secundário	Limbo Foliolar	Caule primário	Caule secundário
T0	0	41.69±4,04 ab	41.9±2,65 a	31.27±1,91 bc	354.93± 46,67 b	212.37±43,22 a	1238.00±71,44 a
T1	6	46.60±6,37 a	38.37±0,82 a	27.14±1,32 c	515.53±58,92 a	212.67±16,86 a	1229.30±79,29 a
T2	12	34.96±2,07 b	43.06±0,9 a	32.46±2,04 b	502.89±37,85 a	134.49±13,99 b	932.50±88,44 b
T3	18	31.43±1,09 b	44.83±1,16 a	27.74±1,87 bc	528.29±45,30 a	136.00±13,09 b	1205.50±91,94 a
T4	24	32.49±3,02 b	40.14±2,70 a	40.13±1,6 a	582.09±60,45 a	174.94±18,41 ab	942.50±98,38 b
	Pr > F	0,0236	0,1019	<0.0001	0,0241	0,032	0,0118
	C.V. (%)	25,28	10,92	13,66	24,94	33,64	19,08

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

## Figuras e legendas

**Fig 1.** Aspectos morfológicos do eixo aéreo de plantas jovens de *Protium heptaphyllum* sob diferentes concentrações de Ethephon. (a, b) Produção de novas folhas a partir da gema apical caulinar. (a) T0 (controle). (b) T1 (6g L<sup>-1</sup>) (c) Morte da gema apical em indivíduo do T3 (18 g L<sup>-1</sup>). (d) Abscisão foliar completa em indivíduo do T3. No detalhe, as setas indicam rebrota a parti de gemas laterais. (e) Rebrotas na porção basal do caule em indivíduos do T4.

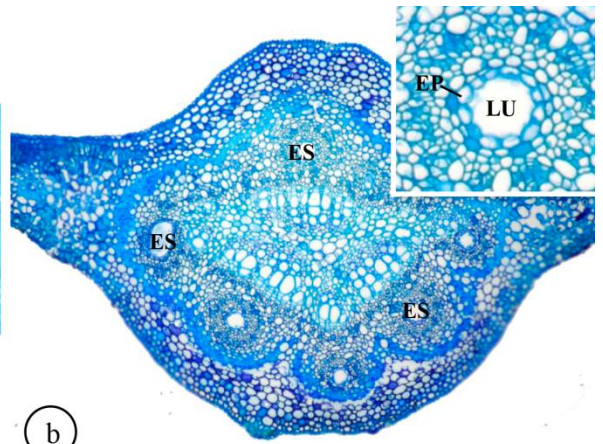




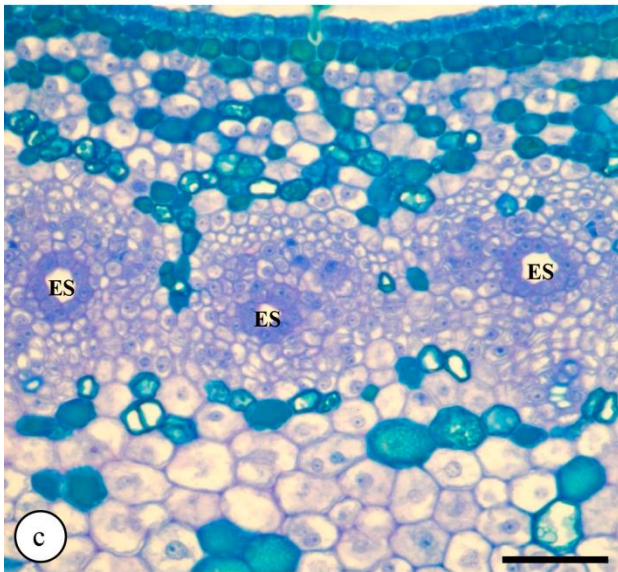
**Fig 2.** Secções transversais de folhas e caule de *Protium heptaphyllum*. (a) Espaço secretor (ES) associado ao floema em nervura de segunda ordem imersa no mesofilo foliolar. (b) Nervura principal do limbo foliolar apresentando espaços secretores (ES) no floema. O detalhe mostra espaço secretor com epitélio (EP) constituído por células secretoras e lume (LU). (c) Caule em crescimento primário mostrando espaços secretores (ES) no floema primário. e secundário. (d) Caule em crescimento secundário com espaços secretores (ES) no floema secundário. Barras: 150 $\mu$ m (b); 100 $\mu$ m (a, d); 50 $\mu$ m (c)



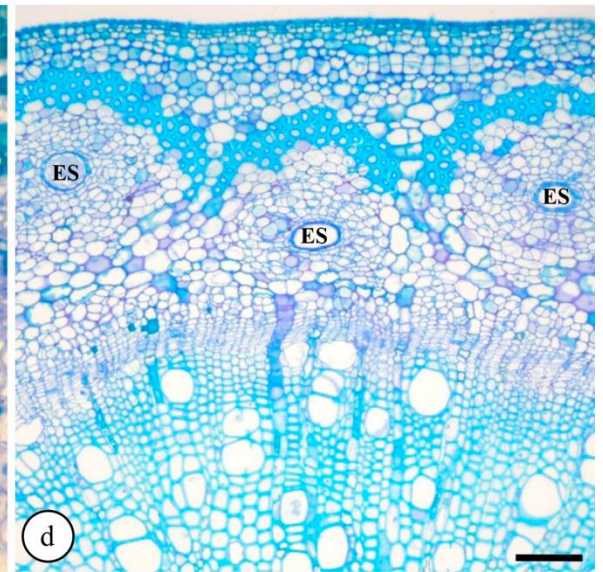
(a)



(b)



(c)



(d)



## Considerações finais

Este trabalho foi dedicado ao entendimento dos processos celulares envolvidos no desenvolvimento dos espaços secretores de resina em *P. heptaphyllum*, além de contribuir para o conhecimento da influência de fatores exógenos no desenvolvimento do sistema secretor de resina em espécies nativas.

A utilização de técnicas convencionais e citoquímicas para detecção de enzimas (celulase e pectina) ao microscópio eletrônico de transmissão produziram informações importantes sobre as alterações celulares nos espaços secretores dessa espécie que levam ao alongamento, ramificação e fusão de canais, mesmo em órgãos maduros. As informações obtidas possibilitaram a complementação dos dados sobre a formação dessa complexa rede secretora tridimensional anastomosada responsável pela produção de resina com alto valor ecológico e econômico. Conhecer a estrutura do sistema secretor de resina em *P. heptaphyllum* e os aspectos celulares envolvidos em seu desenvolvimento pode ter implicações sobre a forma de extração do exsudato e gerar subsídios para o entendimento dos mecanismos de defesa da planta contra herbívoros.

Nossos resultados mostram que o estresse provocado pelo etileno liberado pela aplicação do Ethephon é capaz de induzir alterações estruturais no sistema secretor de *P. heptaphyllum*. A aplicação de Ethephon em plantas jovens produziu respostas diferenciais no sistema secretor em órgãos com estrutura primária e secundária, indicando que órgãos em diferentes estágios de desenvolvimento podem responder de formas distintas a situações de estresse. Esses dados são inéditos e abrem novas perspectivas para o estudo da influência de fatores exógenos no desenvolvimento e funcionamento de glândulas presentes em órgãos em crescimento primário e secundário. Pesquisas adicionais merecem também ser realizadas para verificar possíveis alterações subcelulares no sistema secretor e na quantidade e composição da secreção produzida por plantas sob diferentes concentrações de Ethephon.

Por fim, os dados obtidos com o desenvolvimento desse trabalho preenchem uma importante lacuna sobre os processos celulares envolvidos no estabelecimento da complexa rede secretora em *P. heptaphyllum*, além de subsidiar o estabelecimento de técnicas mais sustentáveis de extração da resina e o entendimento da tolerância das plantas ao estresse, ressaltando a necessidade de preservação dos ambientes em que ocorrem.