



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE BOTUCATU  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Influência da luz e temperatura em cavidades e canais secretores  
em plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-  
Caesalpinioideae): estudo anatômico e ultraestrutural**

**PLÁCIDO FABRÍCIO SILVA MELO BUARQUE**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Morfologia e Diversidade Vegetal.

BOTUCATU-SP  
2013



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE BOTUCATU  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**Influência da luz e temperatura em cavidades e canais secretores  
em plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-  
Caesalpinioideae): estudo anatômico e ultraestrutural**

**PLÁCIDO FABRÍCIO SILVA MELO BUARQUE**

**Profa. Dra. TATIANE MARIA ROGRIGUES**

**ORIENTADORA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Morfologia e Diversidade Vegetal.

BOTUCATU-SP  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Buarque, Plácido Fabrício Silva Melo.

Influência da luz e temperatura em cavidades e canais secretores em plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae): estudo anatômico e ultraestrutural / Plácido Fabrício Silva Melo Buarque - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Tatiane Maria Rodrigues

Capes: 20302037

1. Anatomia vegetal. 2. Morfologia vegetal. 3. Ultraestrutura (Biologia).  
4. Plantas – Efeitos da luz. 5. Árvores.

Palavras-chave: Densidade; Espaços secretores; Luz; Plântula; Temperatura; ultraestrutura.

*Dedico*

*Aos meus pais, Simone Melo e Plácido Fernando, pela educação, amor e carinho que deram durante a minha formação como pessoa e profissional.*

*Aos meus familiares, Cícera Melo (avó); Amaro Plácido (avô); Alexandre Wanderley e Sílvio Sandro.*

*Aos meus irmãos Natália Simoni; Plácido Davi e Kléberson Buarque.*

*A minha noiva e futura esposa Fernanda Tresmondi pelo amor, carinho e por ter encontrado minha alma gêmea.*



## AGRADECIMENTOS

Ao **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudo concedida.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo suporte financeiro (TEM-Biota proc. 2008/55434-7; Coordenadora Profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado).

À **Profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues** pela dedicação, comprometimento, atenção, entusiasmo e pela coragem de trabalhar com um tema desafiador, instigante e inovador no Brasil. Agradeço também por todos os ensinamentos científicos que contribuirão para minha formação acadêmica profissional, principalmente, ao ter apresentado o fascinante mundo da ultraestrutura vegetal.

A **todos os professores do Departamento de Botânica da UNESP** que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho. Agradeço em especial aos docentes profa. Dra. Silvia Rodrigues Machado pelas sugestões, dedicação e extraordinário conhecimento de anatomia vegetal; ao prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida pelo auxílio em coletas, empréstimo de material e sugestões; à profa. Dra. Elza Guimarães pelo empréstimo de material e sugestões; à Profa. Dra. Carmen Regina Marcati pela colaboração no manuseio de amostras; Prof. Dr. Luciano Barbosa (IB/UNESP) pelo auxílio nas análises estatísticas.

À **equipe do Centro de Microscopia Eletrônica, IB, UNESP**, pela assistência no processamento do material.

À **equipe dos Laboratórios de Imunohistoquímica Vegetal, Biologia da secreção em plantas e Anatomia da madeira**, pela assistência no processamento de material. Em especial para **Amanda Gobette Coneglian (IC-Fapesp)** que foi indispensável para a realização de parte deste trabalho.

Aos **amigos e estudantes da pós-graduação do IB/UNESP**, pelo auxílio em coletas, assistência no processamento de materiais, auxílio em análises estatísticas. Em especial para Fernanda Tresmondi, Fábio Bosio, Sérgio Akira Adachi, Danilo Miranda Franco, Angélica Lino Rodrigues, Daniel Baron, Natália Totti, Yve canaveze, Juliana Iassia Gimenez, Raquel de Arruda Santos, Jorge Laço Portinho, Danilo Muniz da Silva (UFSC).

À **Fernanda Tresmondi** que durante o meu mestrado sempre esteve ao meu lado mostrando companheirismo, disponibilidade, prontidão, incentivos, discussões, sugestões, humildade e por todos os momentos de apoio que fizeram e faz a nossa história científica e matrimonial.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO E ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>4</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>8</b>
Cavidades e canais secretores em leguminosas: estrutura e secreção.....	9
<i>Copaifera langsdorffii</i> (Leguminosae-Caesalpinioideae).....	11
Influência de fatores exógenos nos espaços secretores em diferentes grupos vegetais.....	13
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>19</b>
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	23
Resultados.....	25
Discussão.....	33
Referências Bibliográficas.....	39
Figuras.....	46
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>

## ***RESUMO E ABSTRACT***

---

**BUARQUE, P.F.S.M. Influência da luz e temperatura em cavidades e canais secretores em plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae): estudo anatômico e ultraestrutural.** 2013. 68p. – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

**RESUMO** - Espaços secretores estão distribuídos por todo o eixo vegetativo de *Copaifera langsdorffii*. São constituídos por epitélio secretor unisseriado e lúmen amplo e, devido à secreção produzida, representam um mecanismo de defesa constitutivo contra herbívoros e patógenos. Nas plântulas desta espécie, cavidades secretoras de óleo ocorrem no mesófilo dos eófilos e no córtex do epicótilo e hipocótilo, enquanto que canais secretores de oleorresina estão presentes na medula do epicótilo e hipocótilo. Evidências sugerem que fatores exógenos podem influenciar na produção da secreção nessa espécie; entretanto, nada se conhece sobre a influência desses fatores no desenvolvimento de canais e cavidades. Este trabalho teve como objetivo investigar a influência da luz e da temperatura na densidade e na área do lúmen de cavidades e canais secretores em plântulas de *C. langsdorffii*, além de estudar a influência da temperatura na ultraestrutura das células epiteliais. Plântulas foram mantidas em câmara climática sob 2500lux, 1250lux e 250lux e 15°C, 25°C e 35°C. Para análises anatômicas quantitativas, amostras do epicótilo e eófilos foram processadas segundo técnicas usuais em anatomia vegetal. Para análises ultraestruturais, amostras de eófilos foram preparadas de acordo com técnicas convencionais de microscopia eletrônica de transmissão. Plântulas mantidas sob 25°C/1250lux mostraram maior densidade de cavidades nos eófilos e no epicótilo, enquanto aquelas mantidas sob 25°C/2500lux apresentaram maior densidade de canais secretores. Essa resposta diferencial de cavidades e canais à luz pode estar relacionada à origem meristemática distinta dessas estruturas. Quanto à área do lúmen, cavidades e canais respondem de formas variáveis às condições de luz e temperatura. Ultraestruturalmente, as células epiteliais de plântulas mantidas sob 25°C mostraram sinais de intensa atividade secretora. Alterações estruturais em mitocôndrias, plastídios e retículo endoplasmático foram observadas em células de plântulas mantidas a 15°C e 35°C. Em plântulas mantidas sob 35°C, as células epiteliais mostraram intensos sinais de lise, indicando prejuízos à atividade secretora.

**Palavras-chave:** densidade, espaços secretores, eófilos, epicótilo, luz, temperatura, ultraestrutura celular

**BUARQUE, P.F.S.M. Influence of light and temperature on the secretory cavities and canals in seedlings of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae): anatomical and ultrastructural study. 2013. 68p. – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.**

**ABSTRACT** - Secretory spaces are distributed throughout the vegetative axis of *Copaifera langsdorffii*. They are constituted by uniseriate secretory epithelium and wide lumen, and represent a constitutive defense mechanism against herbivores and pathogens due to the produced secretion. In *C. langsdorffii* seedlings, oil cavities occur in the mesophyll of eophylls and in the cortex of epicotyl and hypocotyl, whereas oleoresin canals are present in the pith of epicotyl and hypocotyl. Evidences suggest that exogenous factors can influence the production of secretion in this species; however, nothing is known about these factors influencing the development of canals and cavities. This work aimed to investigate the influence of light and temperature on the density and lumen area of secretory canals and cavities in seedlings of *C. langsdorffii*, besides to study the influence of the temperature on the ultrastructural features of epithelial cells. Seedlings were maintained in climatic chamber under 2500lux, 1250lux and 250lux, and 15°C, 25°C and 35°C. For quantitative anatomical analysis, samples of epicotyl and eophylls were processed according to usual techniques in plant anatomy. For ultrastructural studies, samples of eophylls were prepared following conventional techniques of transmission electron microscopy. Seedlings under 25°C/1250lux presented higher density of cavities in eophylls and epicotyl, whereas seedlings under 25°C/2500lux showed higher density of canals. This differential answer to light can be related to the distinctive origin of these secretory structures. Concerning the lumen area, variable answers were observed to cavities and canals. Ultrastructurally, epithelial cells of seedlings under 25°C showed evidences of intense secretory activity. Alterations in mitochondria, plastids and endoplasmic reticulum were observed in seedlings under 15°C and 35°C. In seedlings under 35°C, the epithelial cells showed evident signals of lysis, indicating damages to their secretory activity.

**Keywords:** cell ultrastructure, density, eophylls, epicotyl, light, secretory spaces, temperature

# *INTRODUÇÃO*

---

---

## INTRODUÇÃO

A presença de estruturas secretoras externas ou internas no corpo vegetal, independentemente da ocorrência de qualquer tipo de injúria, representa um mecanismo de defesa constitutivo contra herbívoros e patógenos, enquanto que as estruturas formadas em resposta a diferentes tipos de estresses sofridos pela planta (Alfaro, 1995; Tomlin et al., 1998; Langenheim, 2003; Eyles et al., 2004; Solla et al., 2006; Moreira et al., 2008) constituem um mecanismo de defesa induzido (Langenheim, 2003). Sabe-se que, embora exista uma predisposição genética para respostas a fatores exógenos, as condições ambientais influenciam significativamente na quantidade e na composição química da secreção produzida e na formação, distribuição e nos aspectos morfológicos das estruturas secretoras em cada espécie (Zamski, 1972; Fahn e Benayoun, 1976; Gedalovich e Fahn, 1985; Wimmer & Grabner, 1997,2000; Russin et al., 1988; Langenheim, 2003; Eyles et al., 2004; Rosner & Hanrup, 2004; Moreira et al., 2008). Entretanto, a grande maioria das pesquisas disponíveis na literatura é dedicada aos estudos da influência de fatores ambientais no desenvolvimento do sistema secretor em espécies de gimnospermas (Fahn & Benayoun, 1976; Greenwood & Morey, 1979; Gedalovich & Fahn, 1985; Lin et al., 2001; Moreira et al., 2008; Zulak & Bholmann, 2010), sendo raros os estudos com angiospermas (Eyles et al., 2004; Dünisch & Bass, 2006).

Dentre os fatores abióticos, luz e temperatura estão entre os principais fatores que podem causar alterações no desenvolvimento do sistema secretor em plantas. Lin et al. (2001) demonstraram que acículas de *Pinus sylvestris*, localizadas na periferia da copa, as quais estavam sujeitas a maior irradiância e temperatura, apresentavam maior densidade de canais de resina. Da mesma forma, estudos envolvendo a formação de canais de resina no xilema secundário de gimnospermas demonstram a influência positiva da temperatura mais elevada (Zamski, 1972; Blanche et al., 1992; Wimmer & Grabner, 1997, 2000; Rigling et al., 2003; Kilpeläinen et al., 2007) ou maiores intensidades luminosas (Lin et al., 2001; Wainhouse et al., 1998) na formação dessas estruturas. No que se refere à influência desses fatores nos aspectos ultraestruturais do sistema secretor, os estudos são ainda mais escassos, havendo relatos de que variações na temperatura podem levar à alterações na densidade do citoplasma e no desenvolvimento do retículo endoplasmático em células epiteliais de canais secretores de resina (Fahn & Benayoun, 1976). Quanto à influência da luz e temperatura nos aspectos

anatômicos e celulares do sistema secretor interno de angiospermas, não foram encontrados trabalhos disponíveis em literatura.

A ocorrência de canais e cavidades secretores, genericamente denominados espaços secretores, é um aspecto comum em muitas espécies de leguminosas (Solleder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950), sendo que nas espécies pertencentes à subfamília Caesalpinioideae essas estruturas são reconhecidas pela produção de uma mistura de terpenos voláteis e não-voláteis denominada oleorresina (Langenheim, 2003). Dentre essas espécies, *Copaifera langsdorffii*, popularmente conhecida como copaíba, copaúba, pau-d'óleo ou árvore-diesel, vem recebendo destaque devido sua grande importância na produção do óleo-de-copaíba exaustivamente explorado pela indústria de fármacos e cosméticos no Brasil (Coelho et al., 1998; Langenheim, 2003).

Em *C. langsdorffii* a presença de cavidades e canais secretores de terpenos é um aspecto constitutivo (Rodrigues et al., 2011a) e representa um importante mecanismo de defesa conferindo a essa espécie proteção contra herbívoros e patógenos (Langenheim et al., 1982; Langenheim, 2003). Pesquisas demonstram que nesta espécie, espaços secretores constituídos por lúmen amplo e epitélio unisseriado estão presentes em todo o eixo vegetativo, desde a fase de plântula até planta adulta. Nas plantas adultas, cavidades secretoras de óleo ocorrem no mesófilo foliar e no córtex do caule, pulvino, pecíolo e raque, enquanto canais secretores de oleorresina estão presentes na medula caulinar e do pulvino, pecíolo e raque, além do xilema secundário de raiz e caule. Em plântulas, cavidades secretoras de óleo foram encontradas no mesófilo dos eófilos e no córtex do epicótilo e hipocótilo, enquanto canais secretores de oleorresina foram observados na medula do epicótilo e do hipocótilo (Rodrigues et al., 2011a). Ultraestruturalmente, as células epiteliais de canais e cavidades desta espécie são caracterizadas pela presença de paredes delgadas, núcleo conspicuo, vacúolos pequenos e citoplasma denso e abundante rico em mitocôndrias, retículo endoplasmático liso bem desenvolvido e plastídios desprovidos de tilacóides (Rodrigues et al., 2011a).

Segundo Carvalho (2003), *C. langsdorffii* é uma espécie neotropical de ampla distribuição geográfica, ocorrendo no nordeste da Argentina, sul da Bolívia, norte do Paraguai e em estados das regiões sudeste, centro-oeste, norte e nordeste do Brasil. Ocorre em vários ecossistemas florestais e savânicos (Correa, 1984; Lorenzi, 1998; Castro, 1999) caracterizados por diferentes condições de solo, disponibilidade hídrica, temperatura e, principalmente,



luminosidade (Kanegae et al., 2000; Ratter et al., 2003; Haridasan, 2008; Ronquim et al., 2009), tais como cerrado, cerradão, caatinga, floresta estacional semidecidual, decidual, ombrófila densa, campos rupestres, dentre outros (Salgado et al., 2001; Carvalho 2003). É uma espécie heliófita tolerante a sombra (Salgado et al., 2001) e, segundo Ronquim et al. (2009), seu sucesso na colonização de ambientes diversificados se deve ao fato de que suas plântulas apresentam mecanismos fisiológicos que permitem a sua sobrevivência em contrastantes condições ambientais (Ronquim et al., 2009). Entretanto, nada se conhece sobre a influência de fatores ambientais no desenvolvimento do sistema secretor desta espécie.

Este trabalho teve como objetivo investigar a influência da luz e da temperatura na densidade e na área do lúmen de cavidades e canais secretores em plântulas de *C. langsdorffii*, além de estudar a influência da temperatura na ultraestrutura das células epiteliais. A falta de pesquisas experimentais nesta área, especificamente com leguminosas de valor comercial, é um dos aspectos que justificam este trabalho; além disso, ao conhecer os possíveis ajustes do sistema secretor de *C. langsdorffii* aos fatores mencionados, os resultados obtidos poderão subsidiar estudos de biologia celular em plantas, ecofisiologia e programas de manejo e uso racional de *C. langsdorffii*, espécie brasileira de reconhecido valor na economia e na medicina.

# ***REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

---

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### **Cavidades e canais secretores em leguminosas: estrutura e secreção**

Estruturas secretoras são formações especializadas na síntese, acúmulo e/ou eliminação de substâncias específicas, podendo ser uni ou multicelulares e estar localizadas na superfície do corpo vegetal ou em tecidos mais internos (Fahn, 1979, Castro & Machado, 2006). Dentre as espécies de Leguminosae, as estruturas secretoras são bastante comuns e diversificadas (Judd et al., 1999), podendo ocorrer nectários extraflorais, tricomas glandulares, idioblastos de substâncias fenólicas, protéicas, resiníferas ou mucilaginosas, cavidades e canais secretores e tricomas glandulares foliares (Solereeder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950).

Cavidades e canais, genericamente denominados espaços secretores internos são formados por espaços intercelulares conspícuos (lúmen) delimitados por células secretoras especializadas, as quais constituem o epitélio (Fahn, 1979; Evert, 2006). Segundo Fahn (1979), a distinção entre canais e cavidades é feita de acordo com sua aparência em cortes longitudinais. Assim, enquanto cavidades secretoras possuem lúmen esférico ou ovóide, os canais secretores mostram-se alongados e com lúmen estreito em secções longitudinais (Fahn, 1979; Evert, 2006).

Em Leguminosae, espaços secretores foram relatados em diversos órgãos de diferentes espécies. Cavidades secretoras foram encontradas em folhas de diferentes espécies pertencentes a gêneros das tribos Amorpheae e Psoraleae (Turner, 1986); nas folhas de espécies de *Sympetalandra* e *Poincianella* (Lersten and Curtis, 1996); nas folhas de espécies de *Lonchocarpus* (Teixeira et al., 2000); no caule em estrutura primária, folhas e órgãos florais de espécies de *Dahlstedtia* (Teixeira & Gabrielli, 2000, 2006; Teixeira & Rocha, 2009); nas folhas de espécies de *Myrocarpus*, *Myrospermum*, *Myroxylon* (Sartori & Tozzi 2002); nas folhas e estípulas de *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva & Machado, 2007); nos frutos (Paiva et al., 2008), folhas e córtex caulinar de *Pterodon pubescens* (Rodrigues et al., 2011b; Rodrigues & Machado 2012) e *Copaifera langsdorffii* (Rodrigues et al., 2011) e nas folhas de *Copaifera trapezifolia* (Milani et al., 2011); Canais secretores foram observados no xilema secundário do caule e da raiz de *Copaifera langsdorffii* (Marcati et al., 2001; Rodrigues & Machado, 2009) e pecíolo e caule em estrutura primária de *Copaifera trapezifolia* (Milani et

al., 2011). Para os membros de Mimosoideae, a literatura comumente relata a ocorrência de idioblastos secretores, não havendo relatos de canais e cavidades (Metcalf & Chalk, 1950; Solereder, 1908).

A secreção produzida por canais e cavidades em espécies de leguminosas apresenta natureza diversa, podendo ser predominantemente lipofílica, mucilagínosa ou mista (Teixeira & Gabrielli, 2000; Rodrigues & Machado, 2009; Milani et al., 2001; Rodrigues et al., 2011a,b, 2012), sendo os terpenos e os fenólicos as substâncias mais comumente produzidas pelas estruturas secretoras das leguminosas (Langenheim, 2003). Segundo Langenheim (2003), a mistura lipossolúvel de terpenos voláteis e não-voláteis secretados por estruturas especializadas que apresenta importância nas interações ecológicas recebe o nome de resina. Segundo Langenheim (2003) a resina pode ser de dois tipos: fluida ou viscosa. A resina fluida também chamada de oleorresina apresenta uma maior concentração de terpenos voláteis do que não-voláteis, já a resina viscosa apresenta um predomínio de terpenos não voláteis e em contato com o meio externo sofre polimerização. Quando monoterpenos e/ou sesquiterpenos estão presentes na secreção, eles são chamados de óleos essenciais. Na maioria das angiospermas, os sesquiterpenos predominam na fração volátil da resina, sendo os diterpenos dominantes na fração não-volátil. Espécies de leguminosas pertencentes à subfamília Papilionoideae e que apresentam espaços secretores de terpenos são caracterizadas pela presença de cavidades secretoras de óleos essenciais, enquanto que aquelas pertencentes à Caesalpinioideae são reconhecidas pela produção de uma mistura de compostos voláteis e não voláteis denominada oleorresina, como é o caso de espécies pertencentes ao gênero *Copaifera* (Langenheim, 2003).

Os terpenos são responsáveis pela resistência da planta aos ataques microbianos e pela proteção contra predadores, principalmente herbívoros e patógenos (Langenheim et al., 1982; Arrhenius & Langenheim, 1983). Segundo Harbone (1993) e Nishida (2002), terpenos (mono, sesqui, di e triterpenos) podem ser tóxicos, antibióticos, deterrentes alimentares ou de oviposição e, podem ainda, interferir na produção hormonal de insetos. Além disso, os terpenos podem ainda atrair predadores de herbívoros que atacam a planta, garantindo uma defesa indireta (Harbone, 1993).

Além da importância ecológica, trabalhos têm enfatizado o valor comercial dos terpenos. Dentre as leguminosas, a secreção presente em espaços secretores de folhas, caules e frutos de diferentes espécies vem sendo explorada comercialmente, sendo os terpenos um

dos mais importantes grupos de matérias-primas para as indústrias de vernizes, alimentos, fármacos, cosméticos e afins (Plowden, 1998; Veiga Jr & Pinto, 2002; Langenheim, 2003).

No que se refere aos aspectos ultraestruturais das células secretoras de terpenos, estudos envolvendo espécies de leguminosas são raros (Paiva & Machado, 2007; Rodrigues et al., 2011a,b; Milani et al., 2011; Rodrigues & Machado, 2012). De forma geral, pesquisas demonstram que células secretoras de terpenos são caracterizadas pela presença de retículo endoplasmático (liso, tubular ou rugoso) bem desenvolvido e plastídios polimórficos destituídos de tilacóides, denominados leucoplastos (Fahn, 1979; Castro & Machado, 2003; Evert 2006). A presença de uma extensa rede de retículo endoplasmático e de leucoplastos associados com retículo endoplasmático (retículo periplastidial) constituem características ultraestruturais comuns a glândulas secretoras de resina (Dell & McComb, 1978; Bosabalidis & Tsekos, 1982; Monteiro et al., 1999; Rodrigues et al., 2011a; Milani et al., 2011).

### ***Copaifera langsdorffii* (Leguminosae-Caesalpinioideae)**

O gênero *Copaifera* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae) possui 72 espécies arbóreas ocorrentes na região neotropical da América Latina e África ocidental, sendo 16 destas endêmicas do Brasil (Dwyer, 1951). As espécies deste gênero são popularmente conhecidas como copaíbas ou pau-d'óleo e encontram-se amplamente distribuídas pelo território brasileiro, sendo encontradas principalmente nas regiões amazônica e centro-oeste do país (Correa, 1984; Lorenzi, 1998). Adaptadas a uma grande variedade de ambientes, as espécies de *Copaifera* ocorrem em florestas de terra firme de solo argiloso e arenoso, terras alagadas, margens de lagos, igarapés e, geralmente, seus espécimes adultos ocupam o dossel de florestas ou emergem ocasionalmente (Alencar et al., 1979; Shanley et al., 1998; Sampaio, 2000).

*Copaifera langsdorffii* Desf., popularmente conhecida como bálsamo, copaíba, copaúba, pau-d'óleo e árvore-diesel, é a espécie de maior distribuição geográfica deste gênero (Lorenzi, 1992), sendo encontrada em ambientes caracterizados por diferentes condições de solo, disponibilidade hídrica, temperatura e, principalmente, luminosidade (Kanegae et al., 2000; Ratter et al., 2003; Haridasan, 2008; Ronquim et al., 2009). Ocorre na floresta amazônica, mata atlântica, matas de galeria, mata mesofítica de interflúvio, caatinga e cerrado, principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná (Braga, 1976; Lorenzi, 1998; Camargos et al., 2001). No estado de São Paulo, a

ocorrência de *C. langsdorffii* foi registrada em várias fisionomias do cerrado (Batalha et al., 1997; Ishara, 2010), como cerrado sensu stricto e cerradão (Durigan et al., 2005), e na floresta estacional semidecidual (Pedroni et al., 2002). É uma espécie heliófita tolerante a sombra (Salgado et al., 2001) ocorrente em matas primárias e secundárias (Lorenzi, 1998) e, segundo Ronquim et al. (2009), seu sucesso na colonização de ambientes diversificados se deve ao fato de que suas plântulas apresentam mecanismos fisiológicos que permitem a sua sobrevivência em contrastantes condições ambientais (Ronquim et al., 2009).

Os indivíduos desta espécie apresentam crescimento lento e alcançam de 10 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos (Veiga Jr & Pinto, 2002). O tronco é áspero, de coloração avermelhada, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro; as folhas são compostas pinadas com 3 a 5 pares de folíolos, com filotaxia alterna; as flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículas axilares; os frutos do tipo folículo contêm uma semente ovóide envolvida por um arilo de coloração alaranjada (Almeida et al., 1998; Lorenzi, 1998; Durigan et al., 2005). A germinação é epígea e a plântula é fanerocotiledonar (Rodrigues et al., 2011a); o sistema radicular é axial; a raiz principal é cilíndrica e branco-amarelada; as raízes secundárias são finas, curtas e cilíndricas; o colo é bem definido pela diferença de cor entre raiz e hipocótilo e pela dilatação apresentada nessa região; o hipocótilo é longo, cilíndrico, verde e ereto; os cotilédones são carnosos e avermelhados; o epicótilo é alongado, ereto e avermelhado; os eófilos são compostos, paripinados, com dois pares de folíolos avermelhados, opostos, ovóides e com nervação penínérvea, sendo possível visualizar pontuações translúcidas em toda a extensão do limbo foliolar (Guerra et al., 2006; Rodrigues et al. 2011a).

A espécie desperta grande interesse comercial por seu potencial ornamental, propriedade melífera, qualidade de sua madeira e pela produção do conhecido óleo-de-copaíba que vem sendo utilizado como biodiesel, como matéria-prima nas indústrias de vernizes, tintas, resinas e exaustivamente explorado pelas indústrias de fármacos e cosméticos (Carvalho, 1994; Almeida et al., 1998; Lorenzi, 1998; Veiga Jr e Pinto, 2002; Langenheim, 2003). Segundo Maciel et al. (2002), a espécie é considerada uma das mais importantes plantas medicinais brasileiras na atualidade sendo utilizada no tratamento de diversas doenças. Estudos relatam que o óleo-de-copaíba extraído de diversas partes da planta apresenta propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antiulcerogênica, antitumoral e cicatrizante, dentre outras (Almeida et al., 1998; Veiga Jr & Pinto 2002). Além da

importância econômica e medicinal, estudos demonstram que o óleo-de-copaíba apresenta importante papel na defesa da planta contra ataques de herbívoros e infecção de patógenos (Langenheim, 2003; Langenheim et al., 1986).

De acordo com Rodrigues et al., (2009, 2011a), a secreção popularmente conhecida como óleo-de-copaíba é produzida por espaços secretores amplamente distribuídos no corpo vegetal. Segundo os autores, cavidades e canais secretores estão presentes desde a fase de plântula até planta adulta e apresentam distribuição diferencial nos órgãos e tecidos vegetais. Assim, no córtex do caule, pulvino, pecíolo, raque e nervura principal, além do mesófilo foliar, ocorrem cavidades secretoras, enquanto que canais secretores são observados na medula do caule, pulvino, pecíolo e raque e nas faixas de parênquima axial no xilema secundário do caule e raiz. A natureza química da secreção, detectada histoquimicamente, difere entre canais e cavidades: óleos essenciais foram detectados em canais e cavidades, enquanto que resina foi detectada somente nos canais secretores (Rodrigues & Machado, 2009; Rodrigues et al., 2011a).

Feibert & Langenheim (1988) mostraram que a produção de resina difere nas folhas de plântulas e plantas jovens desta espécie em relação à luminosidade. Plântulas mantidas em pleno apresentaram maior produção de resina em relação àquelas mantidas na sombra. Da mesma forma, Langenheim et al. (1986) associaram mudanças no desenvolvimento das folhas e na produção de compostos secundários em resposta ao ataque de microlepidópteros em indivíduos adultos de *C. langsdorffii*.

Apesar da importância ecológica e econômica desta espécie e dos indícios de que fatores bióticos e abióticos podem influenciar a produção do exsudato, faltam estudos sobre a biologia do desenvolvimento do sistema secretor de *C. langsdorffii* em condições experimentais.

### **Influência de fatores exógenos nos espaços secretores em diferentes grupos vegetais**

A presença de estruturas secretoras no corpo vegetal, independentemente da ocorrência de injúrias, representa um mecanismo de defesa constitutivo (Fahn, 1988), considerado um dos mais importantes mecanismos de defesa contra a herbivoria (Langenheim, 2003). Já as estruturas formadas em resposta a injúrias ou diferentes tipos de estresses sofridos pela planta constituem um mecanismo de defesa induzido (Fahn, 1988; Langenheim, 2003). Embora exista uma predisposição genética para respostas a fatores

exógenos, as condições ambientais podem influenciar significativamente na formação das estruturas secretoras em cada espécie (Rosner & Hanrup, 2004; Moreira et al., 2008).

A influência de fatores exógenos na formação de canais e cavidades de diferentes espécies vegetais tem sido descrita por diversos autores (Langenheim et al., 1978; Russin et al., 1988; Langenheim, 2003; Eyles et al., 2004; Rosner & Hannrup, 2004; Moreira et al., 2008). Pesquisas demonstraram que a intensidade luminosa, temperatura, disponibilidade hídrica e de nutrientes, diferenças de altitude, idade da planta, ataque de herbívoros e patógenos, ferimentos artificiais, dentre outros, podem influenciar a distribuição e densidade dos espaços secretores, além de induzir mudanças quantitativas e qualitativas na secreção produzida por eles (Greenwood & Morey, 1979; Nair et al., 1980,1985; Fahn, 1988; Gedalovich & Fahn, 1985; Alfaro, 1995; Tomlin et al., 1998; Lin et al., 2001; Sheue et al., 2003; Hudgins et al., 2003,2004; Eyles et al., 2004; Rosner & Hannput 2004; Dünisch & Bass, 2006; Luis et al., 2007; Moreira et al., 2008). Entretanto, a maior parte dos estudos é dedicada a espécies de gimnospermas, sendo raros os estudos envolvendo espécies de angiospermas.

Nesse sentido, pesquisas mostraram que a temperatura mais elevada no verão no hemisfério norte induz a formação de maior número de canais de resina nos tecidos vasculares secundários de gimnospermas (Blanche et al., 1992; Larson, 1994; Wimmer & Grabner, 1997; Rigling et al., 2003). Em seu estudo sobre a influência de fatores climáticos na formação de canais de resina no xilema secundário em populações de *Picea abies* da Alemanha, Wimmer & Grabner (1997) observaram maior densidade de estruturas secretoras nas porções xilemáticas formadas durante o verão quente e seco. Os autores ressaltam que a densidade de canais de resina apresentou uma correlação positiva com a temperatura acima do normal observada nos meses de junho a agosto e que a precipitação acima do normal nos meses de maio a julho influenciou de forma negativa a densidade destas estruturas secretoras. Os pesquisadores sugerem ainda que a formação dos canais de resina nesta espécie pode ser modelada por uma combinação de diversas variáveis climáticas.

Rigling et al. (2003) investigaram a influência da temperatura e da disponibilidade hídrica no sistema secretor de *Pinus sylvestris* em populações naturais encontradas nos Alpes Suíços. Foi observada correlação positiva entre temperatura mais elevada e densidade de canais secretores e correlação negativa entre precipitação e densidade de canais de resina. Os



cientistas atribuíram os resultados ao estresse provocado pela baixa disponibilidade hídrica e alta temperatura dos verões mais quentes.

Lin et al. (2001) estudaram a variação do número de canais de resina nas folhas aciculares de *Pinus sylvestris* de acordo com a posição destas na copa da árvore. Os autores relataram que folhas localizadas em posição mais elevada e/ou mais periférica na copa apresentavam maior densidade de canais secretores do que aquelas localizadas em posição mais basal e/ou mais interna, e atribuíram essas variações ao microambiente diferencial na copa, especialmente temperatura e radiação incidente, o que pode influenciar na disponibilidade de metabólitos necessários para a formação dos canais de resina.

Estudos experimentais confirmaram a influência da temperatura e da luminosidade na formação de canais secretores de resina em espécies de *Pinus*. A produção de maior número de canais de resina no lenho de plantas jovens de *Pinus halepensis* mantidas em condições de temperatura mais elevada foi atribuída à maior e mais contínua atividade cambial no caule sob essas condições (Zamski, 1972). Da mesma forma, Johnson et al. (1997) demonstraram que ramos de *Pinus ponderosa* que receberam um envoltório protetor capaz de reduzir em 60% a radiação solar incidente sobre as folhas, apresentaram número significativamente menor de canais secretores de resina que aquelas mantidas a pleno sol. Em seu experimento combinando o efeito da elevada concentração de CO<sup>2</sup> e diferentes temperaturas na densidade de canais de resina no xilema secundário de *Pinus sylvestris*, Kilpeläinen et al. (2007) mostraram que tais fatores exercem influências contrárias no sistema secretor desta espécie. Os autores observaram maior densidade de canais de resina em condições de temperaturas mais elevadas e a diminuição na densidade desses canais sob elevada concentração de CO<sup>2</sup>. Os pesquisadores associam a formação de maior número de canais à situação de estresse ocasionado pela alta temperatura.

Ultraestruturalmente, Fahn & Benayoun (1976) observaram que em raízes de plântulas de *Pinus halepensis* mantidas no escuro, houve um maior acúmulo de material osmiofílico nas células epiteliais dos canais secretores de resina. Esses autores observaram ainda que em condições de temperatura mais elevada, as células epiteliais mostraram maior densidade do citoplasma, retículo endoplasmático mais desenvolvido e maior acúmulo de material osmiofílico, indicando maior produção de resina nessas condições.

De forma geral, os trabalhos retratam que a maior produção de canais de resina em determinadas condições pode ser resultante do estresse provocado por determinados fatores

exógenos que desencadeiam a maior produção de reguladores vegetais associados ao estresse (Fahn & Zmski, 1970; Gedalovich & Fahn, 1985; Yamamoto & Kozlowski, 1987; Rigling et al., 2003; Kilpeläinen et al., 2007). Segundo Fahn (1988), o etileno é um dos reguladores vegetais que podem estimular a formação de canais secretores. Da mesma forma, a ação do metil jasmonato mediada pelo etileno parece induzir o aumento da densidade e do tamanho de canais traumáticos de resina em coníferas formados em resposta ao ataques de herbívoros e patógenos por ativar genes relacionados com a defesa (Zulak & Bholmann, 2010).

No que se refere à influência de fatores ambientais no sistema secretor de espécies de angiospermas, os trabalhos são bastante escassos, não tendo sido encontrados estudos sobre a influência da luz ou temperatura em canais e/ou cavidades em espécies de angiospermas. Nesse sentido, os trabalhos disponíveis em literatura sobre a influência de fatores exógenos em canais e cavidades de angiospermas referem-se ao efeito da herbivoria e da injúria mecânica.

Dünisch & Bass (2006) observaram que a herbivoria também induziu a formação de canais no xilema secundário de dez espécies de Meliaceae; canais secretores estavam presentes em todas as espécies analisadas, sendo que faixas contínuas de canais traumáticos eram formadas no xilema secundário de árvores cujos meristemas primários apresentaram injúrias. Segundo Eyles et al. (2004), além de promover alterações estruturais no sistema secretor de diferentes espécies, ferimentos artificiais também podem ocasionar variações qualitativas e quantitativas da secreção produzida por *Eucalyptus globosus*. Dois anos após a poda de ramos laterais, Eyles et al. (2004) observaram que o floema formado na região de cicatrização apresentou maior densidade de cavidades secretoras de óleo do que o floema de regiões caulinares saudáveis; além disso, a quantidade total de secreção foi quatro vezes maior no floema associado ao ferimento, tendo sido observadas variações na composição da secreção produzida. Assim, sugere-se que a formação de um sistema secretor induzido em resposta a ataques de herbívoros ou ferimentos artificiais de tecidos resulta na síntese de compostos secundários deterrentes, contribuindo para a redução do desempenho ou da preferência de herbívoros e patógenos pela planta (Alfaro, 1995; Tomlin et al., 1998; Solla et al., 2006; Moreira et al., 2008).

Como já mencionado, com base na literatura, pode-se observar que a maior parte dos estudos sobre as influências de fatores ambientais bióticos e abióticos no sistema secretor de plantas é dedicada a espécies de gimnospermas, sendo raras as pesquisas com espécies de

angiospermas. Com relação às leguminosas, as informações disponíveis são ainda mais escassas e referem-se a variações na quantidade e na composição da secreção produzida, com nenhuma referência aos aspectos morfológicos e celulares das estruturas que as produzem (Janzen, 1975; Crankshaw & Langenheim, 1981; Langenheim, 1973, 2003; Langenheim et al., 1978, 1986; Langenheim & Stubblebine, 1983), como se segue abaixo.

Langenheim et al. (1978) estudaram a variação na composição da resina entre diferentes tecidos, órgãos e populações de *Hymenaea courbaril* e *H. verrucosa*. A variação na composição de sesquiterpenos foi analisada na lâmina foliar, pecíolo e caule primário. Segundo os autores, a resina produzida no pecíolo e no caule apresentou composição similar, diferindo significativamente daquela produzida na lâmina foliar. Os constituintes que ocorrem em maior proporção na resina são aqueles que apresentam maior variação entre os tecidos, entretanto, todos os constituintes da resina variaram significativamente entre as diferentes populações de mesmas espécies. A variação na composição da resina entre os diferentes tecidos e diferentes populações é atribuída à pressão seletiva exercida por herbívoros e patógenos. Segundo os autores, a maior abundância de espécies produtoras de resina encontra-se em regiões tropicais, o que provavelmente está relacionada às maiores diversidade e abundância de herbívoros e patógenos nessas regiões.

Em 1983, num estudo sobre a composição química da resina produzida na folha de indivíduos de diferentes espécies de *Hymenaea*, Langenheim and Stubblebine confirmaram que tipos químicos bem distintos ocorrem na Floresta Alta Amazônica, mas que não são comuns em outros habitats. Ausência de variação na composição da secreção foi constatada entre indivíduos adultos e plantas jovens de *H. courbaril* var. *subsessilis* e entre plântulas de *H. courbaril* var. *stilbocarpa*.

Feibert & Langenheim (1988) mostraram que a produção de resina difere nas folhas de plântulas e plantas jovens desta espécie em relação à luminosidade. Plântulas mantidas em plena luz apresentaram maior produção de resina em relação àquelas mantidas na sombra. Da mesma forma, Langenheim et al. (1986) associaram mudanças no desenvolvimento das folhas e na produção de compostos secundários ao ataque de microlepidópteros em indivíduos adultos de *C. langsdorffii*.

Estudos também relatam a influência de fatores exógenos na quantidade de secreção produzida por espécies do gênero *Copaifera*. Alencar (1982) observou em *C. multijuga* maior produção de exsudato durante a estação chuvosa; contrariamente, Oliveira et al. (2006)

relatam maior produção de exsudato em *C. reticulata* durante a estação seca. Pesquisas indicam ainda que o tipo de solo pode influenciar na quantidade da secreção produzida por espécies de *Copaifera*. Assim, *C. multijuga* produz maior quantidade de oleorresina quando vegetando em terra firme, enquanto que *C. guyanensis* produz maiores volumes de oleorresina em solo de várzea (Newton et al., 2011). Medeiros & Viera (2008) registraram que a maior produção do oleorresina em *C. multijuga* na Reserva Adolpho Duck em Manaus está relacionada a fatores bióticos, tais como infestação por cupim. Contudo, ainda não estão claros quais são os fatores envolvidos na regulação da produção da secreção e seu mecanismo de ação.

Relatos sobre a influência de fatores exógenos nos aspectos anatômicos e celulares de canais e cavidades secretores de *C. langsdorffii* não foram encontrados.

# *CAPÍTULO I*

---

Conforme estabelecido pelo programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), expresso na portaria n° 01/2010-SPG/IBB/UNESP, o capítulo apresentado a seguir foi redigido na forma de um artigo científico. Para tal, foram seguidas as normas de formatação do periódico científico *Environmental and Experimental Botany*.



ELSEVIER <http://www.elsevier.com/journals/environmental-and-experimental-botany/0098-8472/guide-for-authors>

Environmental and Experimental Botany



## **Influência da luz e temperatura em cavidades e canais secretores em plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae): estudo anatômico e ultraestrutural**

**RESUMO** - Espaços secretores estão distribuídos por todo o eixo vegetativo de *Copaifera langsdorffii*. São constituídos por epitélio secretor unisseriado e lúmen amplo e, devido à secreção produzida, representam um mecanismo de defesa constitutivo contra herbívoros e patógenos. Nas plântulas desta espécie, cavidades secretoras de óleo ocorrem no mesófilo dos eófilos e no córtex do epicótilo e hipocótilo, enquanto que canais secretores de oleorresina estão presentes na medula do epicótilo e hipocótilo. Evidências sugerem que fatores exógenos podem influenciar na produção da secreção nessa espécie; entretanto, nada se conhece sobre a influência desses fatores no desenvolvimento de canais e cavidades. Este trabalho teve como objetivo investigar a influência da luz e da temperatura na densidade e na área do lúmen de cavidades e canais secretores em plântulas de *C. langsdorffii*, além de estudar a influência da temperatura na ultraestrutura das células epiteliais. Plântulas foram mantidas em câmara climática sob 2500lux, 1250lux e 250lux e 15°C, 25°C e 35°C. Para análises anatômicas quantitativas, amostras do epicótilo e eófilos foram processadas segundo técnicas usuais em anatomia vegetal. Para análises ultraestruturais, amostras de eófilos foram preparadas de acordo com técnicas convencionais de microscopia eletrônica de transmissão. Plântulas mantidas sob 25°C/1250lux mostraram maior densidade de cavidades nos eófilos e no epicótilo, enquanto aquelas mantidas sob 25°C/2500lux apresentaram maior densidade de canais secretores. Essa resposta diferencial de cavidades e canais à luz pode estar relacionada à origem meristemática distinta dessas estruturas. Quanto à área do lúmen, cavidades e canais respondem de formas variáveis às condições de luz e temperatura. Ultraestruturalmente, as células epiteliais de plântulas mantidas sob 25°C mostraram sinais de intensa atividade secretora. Alterações estruturais em mitocôndrias, plastídios e retículo endoplasmático foram observadas em células de plântulas mantidas a 15°C e 35°C. Em plântulas mantidas sob 35°C, as células epiteliais mostraram intensos sinais de lise, indicando prejuízos à atividade secretora.

**Palavras-chave:** densidade, espaços secretores, eófilos, epicótilo, luz, temperatura, ultraestrutura celular

### **Introdução**

As plantas estão adaptadas a se desenvolver dentro de uma faixa estreita de condições ambientais (Pareek et al., 1997), sendo que cada espécie vegetal pode apresentar diferentes graus de sensibilidade em resposta a fatores ambientais (Sam et al., 2001). Pesquisas demonstram que fatores externos podem exercer efeitos vantajosos ou desvantajosos sobre o crescimento da planta, influenciando nas divisões e no metabolismo celular, no crescimento da planta, na fotossíntese e causando alterações na morfologia da planta e na ultraestrutura celular (Ciamporova & Mistrik, 1993; Taiz & Zeiger, 2009; Ishikawa, 1996).

Estudos demonstram que além de induzir mudanças qualitativas e quantitativas na secreção produzida, fatores ambientais bióticos e abióticos podem influenciar na formação, distribuição e nos aspectos morfológicos das estruturas secretoras (Russin et al., 1988; Langenheim, 2003; Eyles et al., 2004; Rosner & Hanrup, 2004; Moreira et al., 2008). Nesse sentido, pesquisas com diversas espécies vegetais têm relacionado mudanças na distribuição e na densidade de espaços secretores com fatores ambientais, sendo a grande maioria das pesquisas dedicada a espécies de gimnospermas (Zamski, 1972; Greenwood & Morey, 1979; Gedalovich & Fahn, 1985; Wimmer & Grabner, 1997; Lin et al., 2001; Grabner & Wimmer, 2006). Dentre os fatores abióticos, luz e temperatura estão entre os principais que podem causar alterações no desenvolvimento do sistema secretor em plantas. Lin et al. (2001) demonstraram que acículas de *Pinus sylvestris* localizadas na periferia da copa apresentavam maior densidade de canais de resina. Da mesma forma, estudos envolvendo a formação de canais de resina no xilema secundário de gimnospermas demonstram a influência positiva da temperatura mais elevada (Blanche et al., 1992; Wimmer & Grabner, 1997, 2000) ou maiores intensidades luminosas (Martín et al., 2010) na formação dessas estruturas.

Estudos ultraestruturais têm enfatizado a influência da temperatura na ultraestrutura de células secretoras, especialmente de gimnospermas. Nesse contexto, Fahn & Benayoun (1976) observaram maior densidade do citoplasma e retículo endoplasmático menos desenvolvido nas células epiteliais de canais de resina em plântulas de *Pinus halepensis* mantidas sob baixas temperaturas. Entretanto, para espécies de angiospermas, estudos sobre a influência da luz e temperatura no desenvolvimento de canais e/ou cavidades secretoras não foram encontrados.

*Copaifera langsdorffii* é uma espécie neotropical de Leguminosae arbórea que apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a região norte até o sudeste do

Brasil (Carvalho, 2003) em vários ecossistemas florestais e savânicos (Correa, 1984; Lorenz, 1998; Castro, 1999). É uma espécie heliófita tolerante a sombra (Salgado et al., 2001) e segundo Ronquim et al. (2009), seu sucesso na colonização de ambientes diversificados se deve ao fato de que suas plântulas apresentam mecanismos fisiológicos que permitem a sua sobrevivência em contrastantes condições ambientais.

No Brasil, *C. langsdorffii* é conhecida como copaíba, pau-d'óleo ou árvore-diesel devido à produção do óleo-de-copaíba, que é amplamente utilizado pelas indústrias de fármacos, cosméticos e biodiesel e na medicina popular (Correia, 1984; Lorenzi, 1998; Veiga & Pinto, 2002; Langenheim, 2003; Plowden, 2003). Nessa espécie, os canais e cavidades secretores do óleo-de-copaíba, genericamente denominados espaços secretores, são constituídos por epitélio secretor unisseriado e lúmen amplo e estão distribuídos por todo o eixo vegetativo da planta, estando presentes desde a fase de plântula até planta adulta (Rodrigues et al., 2011a). Nas plântulas de *C. langsdorffii*, cavidades e canais secretores apresentam distribuição diferencial. Segundo Rodrigues et al. (2011a), cavidades secretoras de óleos essenciais ocorrem no mesófilo dos eófilos e na região cortical do epicótilo e hipocótilo, enquanto que canais secretores de oleorresina, uma mistura de terpenos voláteis e não-voláteis, estão presentes na medula do epicótilo e hipocótilo.

Nessa espécie, a presença de canais e cavidades secretores de terpenos representa um mecanismo de defesa constitutivo contra herbívoros e patógenos, que se forma independente da influência de fatores exógenos (Langenheim, 2003). Entretanto, Feibert & Langenheim (1988) mostraram que a intensidade luminosa pode influenciar na produção de resina em plântulas e plantas jovens desta espécie, sendo que plântulas mantidas em pleno sol apresentam maior produção de resina em relação àquelas mantidas na sombra.

Este trabalho teve como objetivo investigar a influência da luz e da temperatura na densidade e na área do lúmen de cavidades e canais secretores em plântulas de *Copaifera langsdorffii*, além de investigar as respostas ultraestruturais das células epiteliais a diferentes temperaturas.



## **Material e Métodos**

### *Coleta de material vegetal no campo*

Para fins de obtenção de plântulas, sementes aparentemente saudáveis foram coletadas de indivíduos adultos de *C. langsdorffii* vegetando em remanescente de cerrado localizado na Reserva Particular de cerrado da Fazenda Palmeira da Serra, município de Pratânia-SP (S22°48'50.2" e W 48°44'35.8"), após a deiscência espontânea dos frutos do tipo folículo.

Ramos férteis foram coletados e exsicatas depositadas no Herbário “Irina Delanova de Gemtchujnicov” (BOTU), Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP sob o número de registro 28515.

### *Germinação de sementes e obtenção de plântulas em laboratório*

As sementes coletadas foram lavadas em álcool 70% por 1 minuto e com hipoclorito de sódio 2% durante 20 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada e colocadas em caixas acrílicas do tipo gerbox entre folhas de papel filtro umedecidas com água destilada e mantidas em câmara de germinação a 25°C sob iluminação fluorescente branca (lâmpadas Phillips, tipo luz do dia), com fotoperíodo de 12 horas, conforme Rodrigues et al. (2011a).

### *Experimentos com plântulas*

Após o eixo hipocótilo-raiz atingir cerca de 3 cm de comprimento, as plântulas foram transferidas para tubetes contendo vermiculita e mantidas em mini-câmara climática Tecnal (TE 4001-E) sob luz branca (lâmpadas Phillips, tipo luz do dia), fotoperíodo de 12 horas, umidade relativa do ar 35% e diferentes condições de luz e temperatura, conforme descrito na tabela 1. Para cada tratamento, foram selecionadas 10 plântulas (n=10).

O desenvolvimento das plântulas foi acompanhado diariamente. Amostras da região mediana do epicótilo e da região mediana dos folíolos proximais do primeiro par de eófilos foram coletadas quando estes atingiram cerca de 3 cm de comprimento e 1,5 cm de largura.

Deve-se salientar que neste trabalho, o termo plântula se refere à fase de desenvolvimento vegetal que abrange desde a emergência da raiz primária até a completa expansão do primeiro par de eófilos (Oliveira, 2001).

**Tabela 1.** Diferentes tratamentos aplicados às plântulas de *Copaifera langsdorffii*.

<b>Tratamentos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Luminosidade</b>
Tratamento 1	15°C	2500 lux = 100% de luz
Tratamento 2	15°C	1250 lux = 50% de luz
Tratamento 3	15°C	250 lux = 10% de luz
Tratamento 4	25°C	2500 lux = 100% de luz
Tratamento 5	25°C	1250 lux = 50% de luz
Tratamento 6	25°C	250 lux = 10% de luz
Tratamento 7	35°C	2500 lux = 100% de luz
Tratamento 8	35°C	1250 lux = 50% de luz
Tratamento 9	35°C	250 lux = 10% de luz

#### *Microscopia de luz*

Amostras de eofilos e epicótilo coletadas de plântulas mantidas sob cada uma das nove condições experimentais foram fixadas em FAA 50 (Johansen, 1940), desidratadas em série etílica e embebidas em resina metacrilato (Gerrits, 1991). O material foi seccionado em micrótomo rotativo semiautomático e os cortes (6 µm de espessura) corados 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® como meio de montagem. O laminário foi analisado ao fotomicroscópio Olympus® e os resultados documentados através do sistema de câmera digital acoplado.

#### *Análises quantitativas*

A densidade e a área do lúmen de canais e cavidades secretores foram mensuradas em uma área de 1mm<sup>2</sup> em cortes transversais do limbo foliolar de eofilos e do epicótilo. Tais medições foram realizadas com o auxílio do Programa Cell<sup>B</sup> Olympus-Imaging Software for Life Science Microscopy.

#### *Análises estatísticas*

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e de comparação entre médias (teste de Tukey) ao nível de 5% de probabilidade num arranjo fatorial 3x3 com dez repetições. A normalidade e a homogeneidade dos dados foram analisadas e, quando necessário, foram realizadas transformações por *log* (10) ou raiz quadrada.

### *Microscopia eletrônica de transmissão*

Para estudos ultraestruturais foram utilizadas amostras de eofilos de plântulas mantidas sob 15°C, 25°C e 35°C e 1250 lux (tratamentos 2, 5 e 8). As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 por 24 horas, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 1 hora, desidratadas em série cetônica e embebidas em Araldite (Machado e Rodrigues, 2004). As secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila (Watson, 1958) e citrato de chumbo (Reynolds, 1963), e examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Fei Tecnai, 80 kV.

## **Resultados**

### *Densidade e área do lúmen de cavidades secretoras nos eofilos*

Em todas as condições experimentais empregadas, foram observadas cavidades secretoras constituídas por epitélio unisseriado e lúmen amplo no mesofilo dos eofilos de *C. langsdorffii* (Figura 1A). Entretanto, a densidade de cavidades secretoras e a área do lúmen variaram entre os diferentes tratamentos.

Observou-se influência significativa ( $P < 0,001$ ) dos fatores luz e temperatura na densidade das cavidades secretoras nos eofilos, embora a interação entre esses fatores não tenha produzido resultados significativos ( $P > 0,05$ ; Tabela 2). Os eofilos de plântulas mantidas a 25°C mostraram valores significativamente maiores quanto à densidade de cavidades secretoras em comparação com plântulas mantidas sob 15°C e 35°C, em todas as condições de luminosidade empregadas. Independentemente da condição térmica, plântulas mantidas sob 50% de intensidade luminosa mostraram maior densidade de cavidades secretoras (Tabela 2).

Com relação à área do lúmen das cavidades secretoras dos eofilos, foi observado que este parâmetro foi influenciado de forma significativa ( $P < 0,001$ ) pelo fator luminosidade e pela interação entre os fatores luminosidade e temperatura ( $P < 0,05$ ). As análises mostraram que o fator temperatura não produziu efeito significativo ( $P > 0,05$ ) na área do lúmen das cavidades secretoras de plântulas de *C. langsdorffii* (Tabela 2). Cavidades secretoras com lúmen mais amplo foram observadas nos eofilos de plântulas mantidas a 35°C sob 100% de luminosidade (Tabela 2).

**Tabela 2.** Dados médios  $\pm$  desvio padrão da densidade e área do lúmen de cavidades secretoras nos efilos de plântulas de *Copaifera langsdorffii* (n=10) mantidas sob diferentes condições de luz e temperatura e resultado da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade.

Tratamento	Densidade (1 mm <sup>2</sup> )				Área do lúmen (µm <sup>2</sup> )			
	Luminosidade				Luminosidade			
Temperatura	100%	50%	10%	Média	100%	50%	10%	Média
15° C	2,60 $\pm$ 0,97	3,10 $\pm$ 1,20	2,10 $\pm$ 0,88	2,60 b	2795,32 $\pm$ 1229,77 Aab	2109,97 $\pm$ 514,33 Aa	2719,50 $\pm$ 783,44 Aa	2541,60
25° C	4,10 $\pm$ 0,74	5,70 $\pm$ 0,67	3,70 $\pm$ 0,95	4,50 a	2425,47 $\pm$ 476,18 Ab	2703,31 $\pm$ 954,15 Aa	1951,44 $\pm$ 420,84 Aab	2360,10
35° C	2,50 $\pm$ 0,70	3,30 $\pm$ 0,95	2,70 $\pm$ 0,67	2,83 b	3632,66 $\pm$ 921,98 Aa	2160,98 $\pm$ 1030,22 Ba	1604,47 $\pm$ 785,27 Bb	2466,00
Média	3,06 B	4,03 A	2,83 B		2951,20	2324,80	2091,80	
(ANOVA)								
FT		35,23 **				0,32 ns		
FL		12,16 **				8,19 **		
FT+FL		1,25 ns				5,98 *		

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade. \*\* significativo ao nível de 0,1% de probabilidade ( $P < 0,001$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ); ns: não significativo ( $P \geq 0,05$ ). FT: Fator Temperatura; FL: Fator Luminosidade.

### ***Densidade e área do lúmen de cavidades e canais secretores no epicótilo***

Cavidades e canais secretores foram observados respectivamente no córtex (Figuras 1B, C) e na medula (Figuras 1B, D) do epicótilo de plântulas de *C. langsdorffii*, em todos os tratamentos empregados. Entretanto, diferenças significativas para a densidade e a área do lúmen de cavidades e canais secretores foram encontradas (Tabela 3).

A influência da temperatura ( $P < 0,05$ ), luminosidade ( $P < 0,001$ ) e interação entre esses fatores ( $P < 0,001$ ) na densidade de cavidades secretoras no córtex do epicótilo foi significativa. Os resultados obtidos para plântulas mantidas a 25°C e 50% de luz diferiram daqueles observados para os demais tratamentos, mostrando-se significativamente maiores (Tabela 3). Da mesma, os fatores luminosidade ( $P < 0,05$ ), temperatura ( $P < 0,001$ ) e a interação entre eles ( $P < 0,001$ ) exerceram influência significativa na área do lúmen das cavidades secretoras no epicótilo (Tabela 3). Os maiores valores foram observados em plântulas submetidas aos tratamentos de 25°C sob 10% de luz e de 15°C a 100% de luz; entretanto, para o lúmen de cavidades mantidas a 100% os valores observados não diferiram entre plântulas mantidas a 15°C e 35°C (Tabela 3).

Na região medular do epicótilo, a temperatura ( $P < 0,05$ ), a luminosidade ( $P < 0,001$ ) e a interação entre esses fatores ( $P < 0,001$ ) influenciaram na densidade dos canais secretores de forma significativa (Tabela 4). Maior densidade de canais secretores foi observada na medula do epicótilo de plântulas a 25°C a 100% de luz (Tabela 4). A influência desses fatores e a interação entre eles também foi significativa ( $P < 0,001$ ) no que se refere à área do lúmen dos canais medulares. Canais secretores com lúmen mais amplo foram observados em plântulas mantidas a 15°C sob 100% e 50% de luz (Tabela 4).

**Tabela 3.** Dados médios  $\pm$  desvio padrão da densidade e área do lúmen de cavidades secretoras no córtex do epicótilo de plântulas de *Copaifera langsdorffii* (n=10) mantidas sob diferentes condições de luz e temperatura e resultado da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade.

Tratamento	Densidade (1 mm <sup>2</sup> )				Área do lúmen (µm <sup>2</sup> )			
	Luminosidade			Média	Luminosidade			Média
Temperatura	100%	50%	10%		100%	50%	10%	
<b>15° C</b>	5,40 $\pm$ 1,58 Aa	5,90 $\pm$ 1,73 Ab	6,60 $\pm$ 1,50 Aa	5,97	817,37 $\pm$ 39,98 Aa	509,6 $\pm$ 85,54 Bab	484,94 $\pm$ 92,31 Bb	2541,60
<b>25° C</b>	4,90 $\pm$ 0,99 Ba	8,50 $\pm$ 1,78 Aa	5,50 $\pm$ 1,27 Bab	6,30	575,71 $\pm$ 49,39 Bb	628,6 $\pm$ 74,75 Ba	898,23 $\pm$ 19,24 Aa	2360,10
<b>35° C</b>	4,40 $\pm$ 1,19 Ba	6,60 $\pm$ 2,01 Ab	4,20 $\pm$ 1,47 Bb	5,23	636,17 $\pm$ 83,50 Aab	366,2 $\pm$ 89,13 Bb	355,84 $\pm$ 38,23 Bb	2466,00
Média	5,07	7,00	4,20		2951,2	2324,80	2091,80	
FT		4,09 *				11,11 **		
FL		12,37 **				5,46 *		
FT+FL		4,91 **				7,87 **		

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade. \*\* significativo ao nível de 0,1% de probabilidade (P < 0,001); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05); ns: não significativo (P > = 0,05). FT: Fator Temperatura; FL: Fator Luminosidade.

**Tabela 4.** Dados médios  $\pm$  desvio padrão da densidade e área do lúmen de canais secretores na medula do epicótilo de plântulas de *Copaifera langsdorffii* (n=10) mantidas sob diferentes condições de luz e temperatura e resultado da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade.

Tratamento	Densidade (1mm <sup>2</sup> )				Área do lúmen (µm <sup>2</sup> )			
	Luminosidade				Luminosidade			
Temperatura	100%	50%	10%	Média	100%	50%	10%	Média
<b>15° C</b>	3,90 $\pm$ 1,10 Aab	2,50 $\pm$ 1,58 Bb	3,40 $\pm$ 0,96 ABa	3,26	1776,75 $\pm$ 491,49 Aa	2158,60 $\pm$ 1176,57 Aa	1100,42 $\pm$ 427,64 Ba	1678,70
<b>25° C</b>	5,80 $\pm$ 1,39 Aa	3,40 $\pm$ 0,84 Ba	2,50 $\pm$ 1,08 Bab	3,90	1094,63 $\pm$ 266,62 Ab	532,06 $\pm$ 177,72 Bc	1228,68 $\pm$ 176,37 Aa	951,80
<b>35° C</b>	2,90 $\pm$ 0,99 ABb	3,50 $\pm$ 1,43 Aab	2,10 $\pm$ 1,28 Bb	2,83	1280,6 $\pm$ 459,30 Aab	941,31 $\pm$ 333,83 Ab	599,20 $\pm$ 211,24 Bb	940,40
Média	4,20	3,13	2,66		1384,00	1210,70	976,20	
FT		4,22 *				21,92**		
FL		10,02 **				8,81 **		
FT+FL		5,69 **				12,44 **		

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey em 5 % de probabilidade. \*\*significativo ao nível de 0,1% de probabilidade (P < 0,001); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05); ns: não significativo (P > = 0,05). FT: Fator Temperatura; FL: Fator Luminosidade.

### ***Ultraestrutura das células epiteliais das cavidades secretoras nos eofilos***

As células epiteliais das cavidades secretoras dos eofilos de plântulas mantidas a 25°C caracterizam-se pelo formato piramidal e por apresentar paredes delgadas com plasmodesmos amplos (Figuras 2A, B), citoplasma abundante e elétron-denso, vacúolos pequenos com inclusões lipídicas ou osmiofílicas e núcleo volumoso com regiões de condensação de cromatina dispersas no nucleoplasma (Figura 2A). No citoplasma dessas células ocorrem poliribossomos, mitocôndrias (Figura 2B), numerosos plastídios polimórficos destituídos de tilacóides (Figura 2C), dictiossomos (Figura 2D), retículo endoplasmático liso com cisternas alongadas (Figura 2B, E) e retículo endoplasmático rugoso (Figura 2F). Os plastídios apresentam matriz homogênea finamente granular (Figura 2B) podendo apresentar inclusões lipídicas (Figura 2C). Merece destaque a presença de retículo periplastidial (Figuras 2B, C). Vesículas (Figura 2E) e corpos multivesiculares (Figura 2F) foram observadas no citoplasma. Gotas de óleo volumosas foram observadas dispersas no citoplasma (Figuras 2E, G) e no interior de vacúolos (Figura 2G). A parede periclinal externa dessas células apresenta aspecto fibrilar mostrando a descamação liberação de material para o lúmen (Figuras 2E, F).

Em plântulas mantidas a 15°C, as células epiteliais mantiveram suas características de atividade secretora, como citoplasma denso e abundante rico em organelas (Figuras 3A-E), núcleo volumoso (Figuras 3A, C, E) com nucléolo evidente e regiões esparsas de condensação da cromatina (Figura 3A). A membrana plasmática mostrou-se sinuosa (Figuras 3C-D). Vacúolos de diversos tamanhos contendo inclusões membranosas (Figura 3A) ou elétron-densas (Figura 3B) foram encontrados. As mitocôndrias mostraram-se arredondadas ou discretamente elípticas e com cristas moderadamente dilatadas, além de apresentarem inclusões osmiofílicas (Figuras 3 B-E). Sinais de lise representados por áreas elétron-lucentes na matriz foram observados em algumas mitocôndrias (Figuras 3D-E). Os plastídios com formato arredondado e destituídos de tilacóides mostraram estroma elétron-denso, além de apresentarem acúmulo de inclusões osmiofílicas (Figuras 3B, C, E). Porções de retículo endoplasmático liso foram observadas no formato de cisternas alongadas (Figuras 3B, C, F) ou formando alças que envolvem porções de citoplasma (Figuras 3B-E). Foram encontradas porções de retículo endoplasmático liso bem próximas à membrana plasmática (Figura 3C), além de porções em íntima associação com os plastídios (Figuras 3C, E). Dictiossomos ativos na produção de vesículas foram encontrados (Figura 3E). No citoplasma, foram observadas numerosas vesículas dispersas e corpos multivesiculares (Figuras 3C, E). Gotas de óleo



volumosas foram encontradas no interior de vacúolos (Figura 3F) e dispersas no citoplasma, principalmente no pólo distal da célula (Figuras 3A, F). Imagens sugerem que essas gotas lipídicas podem atravessar a parede periclinal externa das células epiteliais e serem liberadas para o lúmen da cavidade secretora (Figura 3F).

As células epiteliais de plântulas mantidas a 35°C mostraram sinais de degradação mais intensos em comparação com aquelas observadas em plântulas mantidas nas demais condições experimentais. Essas células apresentaram vacuoma desenvolvido e citoplasma reduzido (Figuras 4A-B). A parede periclinal externa dessas células mostrou contorno sinuoso (Figura 4B), enquanto que a parede periclinal interna apresentou-se mais espessa (Figuras 4C, D) que nos demais tratamentos. A membrana plasmática apresentou-se sinuosa e o espaço periplasmático proeminente em algumas regiões da célula (Figuras 4C, D, J). O núcleo mostrou-se reduzido, com nucléolo compacto e com regiões esparsas de condensação da cromatina (Figura 4B). Regiões elétron-lucidas foram observadas no citoplasma dessas células indicando sinais de lise (Figura 4D). Mitocôndrias com diferentes formatos, desde elípticas até bastante alongadas, com cristas dilatadas e matriz bastante elétron-densa foram observadas (Figuras 4C-F); algumas mitocôndrias mostraram sinais de lise da matriz (Figura 4D). Os plastídios, destituídos de tilacóides, mostraram-se elétron-densos (Figuras 4A, E, F) e continham inclusões lipídicas (Figura 4E). Plastídios com sinais de degradação representados por áreas claras no estroma foram observados livres no citoplasma (Figuras 4E, F); plastídios em degradação também foram observados no interior de vacúolos (Figura 4G). Cisternas alongadas de retículo endoplasmático liso (Figura 4E) e numerosas porções em forma de alças envolvendo áreas do citoplasma (Figuras 4C, E, H) foram observadas. Gotas de óleo foram encontradas dispersas no citoplasma (Figuras 4C, J) e no interior de vacúolos (Figuras 4I, K). Acúmulos osmiofílicos foram visualizados no citoplasma das células epiteliais. (Figuras 4F, J). No interior dos vacúolos foram observadas estruturas membranosas (Figuras 4A, B), corpos multivesiculares (Figuras 4B, H), além de grumos elétron-densos e material filamentosos (Figura 4K). Pequenos grupos de material osmiofílico podem estar aderidos à superfície interna do tonoplasto (Figura 4K). Em algumas células, observou-se a ruptura do tonoplasto (Figura 4G). No lúmen de algumas cavidades secretoras foi observado acúmulo de material filamentosos (Figura 4I). A tabela 5 apresenta uma síntese dos principais resultados obtidos para as células epiteliais de cavidades secretoras nos eofilos de plântulas de *Copaifera langsdorffii* mantidas sob diferentes temperaturas.

**Tabela 5.** Principais características ultraestruturais das células epiteliais de cavidades secretoras nos eofilos de plântulas de *Copaifera langsdorffii* mantidas sob diferentes temperaturas.

	15°C	25°C	35°C
<b>Citoplasma</b>	Denso e abundante	Denso e abundante	Reduzido; lise; acúmulos osmiofílicos
<b>Núcleo</b>	Volumoso	Volumoso	Compacto
<b>Vacuoma</b>	Reduzido; inclusões lipídicas, membranosas e osmiofílicas	Reduzido; inclusões lipídicas e osmiofílicas	Desenvolvido; inclusões lipídicas, membranosas, grumos elétron-densos, material filamentosos; adesão de material osmiofílico à superfície interna do tonoplasto; ruptura do tonoplasto
<b>REL</b>	Alongado; em alças	Alongado	Alongado; em alças
<b>Mitocôndrias</b>	Cristas moderadamente dilatadas; inclusões osmiofílicas; lise na matriz	Íntegras	Cristas dilatadas e matriz bastante elétron-densa; lise da matriz
<b>Plastídios</b>	Elétron-densos; inclusões osmiofílicas	Íntegros; inclusões lipídicas	Elétron-densos; inclusões lipídicas; sinais de degradação

## Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a luz e a temperatura influenciam significativamente o desenvolvimento dos espaços secretores em plântulas de *C. langsdorffii*, evidenciado pela variação na densidade e na área do lúmen dos espaços secretores, e que canais e cavidades nessas plântulas respondem de formas diferentes a esses fatores.

Espaços secretores se diferenciam precocemente durante a ontogenia de eofilos e epicótilo de *C. langsdorffii*, (Rodrigues et al., 2011a) e, provavelmente, o desenvolvimento dessas estruturas depende do suprimento de metabólitos vindos dos cotilédones carnosos que armazenam reservas nutritivas para o desenvolvimento da plântula e da capacidade/metabolismo fotossintético dos eofilos (Hanley et al. 2004). Assim, fatores exógenos como luz e temperatura que podem influenciar os processos metabólicos das plantas e a disponibilidade de compostos de carbono, podem induzir alterações no desenvolvimento do sistema secretor (Lin et al., 2001).

A análise dos dados obtidos neste trabalho revelou que a temperatura de 25°C influenciou de forma positiva a densidade de cavidades e canais secretores em *C. langsdorffii*. Isso pode estar relacionado ao fato que esta espécie é nativa de regiões tropicais da América Latina (Veiga Jr & Pinto, 2002), onde a temperatura média anual fica em torno dos 25°C. Sabe-se que as plantas estão adaptadas a se desenvolver dentro de uma faixa estreita de condições ambientais (Pareek et al., 1997) e variações nessas condições podem influenciar o crescimento da planta (Taiz & Zeiger, 2009; Mooney et al., 1991; Went, 1953), sendo que cada espécie vegetal pode apresentar diferentes graus de sensibilidade em resposta ao ambiente (Sam et al., 2001). Assim, podemos sugerir que sob a temperatura de 25°C, os processos metabólicos de *C. langsdorffii* seriam favorecidos levando a maximização do funcionamento de enzimas, de taxas fotossintéticas e respiratórias, além da mobilização de compostos de carbono a partir dos cotilédones carnosos e de sua translocação.

Lin et al. (2001), estudando canais de resina em acículas de *Pinus sylvestris*, sugeriram que esses são processos fisiológicos importantes que culminam na maior disponibilidade de compostos orgânicos, levando à formação de maior número de canais secretores. Sob temperaturas mais elevadas, processos fisiológicos vitais são prejudicados, sendo a fotossíntese inibida antes da respiração, o que causa diminuição nas reservas de carboidratos nas plantas (Taiz & Zeiger, 2009). Da mesma forma, temperaturas mais baixas levam à diminuição da fotossíntese e da respiração, à translocação mais lenta de carboidratos

e à inibição de síntese protéica (Taiz & Zeiger, 2009). Assim, a manutenção de plântulas de *C. langsdorffii* sob temperaturas mais elevadas (35°C) ou mais baixas (15°C) em relação à de seu habitat natural (cerca de 25°C) pode ter afetado diferentes processos do metabolismo vegetal, diminuindo a disponibilidade de compostos de carbono necessários para a formação de canais e cavidades secretores. Para comprovar essa hipótese, estudos fisiológicos que envolvam registros de taxas fotossintéticas, trocas gasosas e translocação de compostos de carbonos deverão ser realizados.

Além da temperatura, a luz é um dos principais fatores exógenos que afetam a obtenção de carbono e conseqüentemente o desenvolvimento e a estrutura dos sistemas secretores Schoettle & Smith (1999). Segundo, Lin et al., (2001) variações na intensidade da radiação incidente sobre as plantas podem alterar a capacidade das folhas de drenagem de metabólitos, alterando a disponibilidade de macro e micro-nutrientes e, conseqüentemente, a disponibilidade de metabólitos de carbono. Nossos resultados mostraram que a maior intensidade luminosa (100% de luz) influenciou positivamente a formação de canais secretores na medula do epicótilo de *C. langsdorffii*, enquanto que a condição de 50% de luz favoreceu a formação de cavidades secretoras no córtex do epicótilo e no mesofilo dos eofilos. Levando em consideração que cavidades secretoras do epicótilo e dos eofilos de *C. langsdorffii* se originam a partir do meristema fundamental periférico no ápice caulinar e que canais secretores medulares se originam a partir do meristema medular (ou meristema em costela) (Rodrigues et al., 2011a), podemos sugerir que essa resposta diferencial de cavidades e canais à luz esteja relacionada à sua origem distinta e à expressão diferencial dos genes em resposta à luminosidade nos diferentes meristemas. Esses resultados corroboram estudos que demonstram que o efeito da luz pode diferir drasticamente entre diferentes órgãos de uma mesma espécie ou até mesmo entre células vizinhas (von Arnim & Deng, 1996). Assim, embora o mecanismo fundamental de resposta à luz seja similar nas diferentes espécies, tais respostas são específicas e mediadas por mudanças no nível de expressão de determinados genes (Li et al., 1993; Terzaghi & Cashmore, 1995; von Arnim & Deng, 1996).

A importância de cavidades e canais secretores de terpenos constituindo um sistema de defesa contra herbívoros e patógenos é bem conhecida em *C. langsdorffii* (Arrhenius & Langenheim, 1983; Langenheim, 2003; Rodrigues et al., 2011a). Sugerimos que nessa espécie, as cavidades secretoras de óleo localizadas no mesofilo dos eofilos e no córtex do epicótilo podem representar a primeira linha de defesa contra os ataques de herbívoros e

patógenos por serem localizadas mais externamente no corpo vegetal. Nossos resultados mostraram maior densidade de cavidades secretoras em plântulas mantidas a 25°C ou 50% de luz, o que parece ser um aspecto favorável à proteção de plântulas em áreas naturais sombreadas. Plântulas de *C. langsdorffii* presentes em áreas sombreadas demonstram ter crescimento lento e longo período de sobrevivência na vegetação de sub-bosque (Leite & Salomão, 1992; Ronquim et al., 2009), o que torna a habilidade de resistência a herbívoros e patógenos crucial para a manutenção dos indivíduos (Kitajima, 1994). Assim, a maior densidade de cavidades secretoras de óleo nessa condição poderia favorecer a proteção dos indivíduos contra ataque de herbívoros e patógenos. Sob pleno sol, os indivíduos jovens de *C. langsdorffii* apresentam crescimento vegetativo mais rápido e maior taxa de fotossíntese, resultando em maiores valores de biomassa total, altura e área foliar (Ronquim et al., 2009). Com isso, a maior abundância de canais medulares secretoras de oleorresina em plântulas de *C. langsdorffii* mantidas em maiores intensidades luminosas sugere que nessa condição o sistema defensivo interno seja mais efetivo. Esses dados corroboram as informações de Feibert & Langenheim (1988) que encontraram maior produção de resina em plântulas mantidas em pleno sol em comparação com indivíduos localizados em áreas sombreadas. Entretanto, estudos adicionais sobre o mecanismo de defesa desta espécie são necessários para confirmação desta hipótese.

Os dados obtidos neste trabalho também mostraram variações na área do lúmen dos espaços secretoras em plântulas de *C. langsdorffii* sob os diferentes tratamentos. Foi observado que cavidades e canais secretoras responderam de formas distintas e variáveis às condições de luz e temperatura quanto a esse aspecto. De forma geral, o que se pôde notar foi uma tendência a maiores valores para área do lúmen em canais e cavidades de plântulas mantidas nas condições mais extremas de luz e/ou de temperatura empregadas neste trabalho. Lúmen mais amplo foi observado em cavidades secretoras nos eófilos de plântulas mantidas a 35°C e 100% de luz e no epicótilo de plântulas mantidas a 25°C e 10% de luz e 15°C e 35°C sob 100% de luz; enquanto que canais com lúmen mais amplo foram observados no epicótilo de plântulas mantidas a 15°C sob 100% e 50% de luz. Com base nesses dados, podemos sugerir que uma provável condição de estresse tenha sido desencadeada pelas condições mais extremas de luz e/ou temperatura sob as quais as plântulas foram mantidas. Sabe-se que o estresse provocado por diferentes fatores, dentre eles luz e temperatura, pode induzir a biossíntese de etileno nas células vegetais (Taiz & Zeiger, 2009) que pode levar a produção de

enzimas hidrolíticas causando a degradação da lamela média e da matriz celular (Osborne & Sargent, 1976; Uheda & Nakamura, 2000), o que poderia explicar o aumento da área do lúmen de canais e cavidades secretoras de plântulas de *C. langsdorffii* em determinadas condições.

Pesquisas sugerem uma relação direta entre área do lúmen de espaços secretores e volume do exsudato acumulado (Chudnyi, 1974). Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para determinar se variações na área do lúmen de cavidades e canais secretores desta espécie refletem efetivamente no volume do exsudato acumulado em *C. langsdorffii*. Se essa relação for confirmada, parece que temperaturas mais elevadas poderiam favorecer o acúmulo de óleo nas cavidades secretoras, enquanto que temperaturas mais baixas aumentam a capacidade de estocagem de resina dos canais secretores. Assim, a presença de cavidades com lúmen mais amplo em plântulas sob temperaturas mais elevadas pode estar relacionada ao fato de que cavidades secretoras são estruturas mais comumente encontradas em angiospermas (Fahn, 1979), cuja maior diversificação ocorreu na faixa equatorial do globo terrestre (Judd et al., 1999) onde a temperatura é mais elevada que em regiões polares. Por outro lado, o notável desenvolvimento dos canais secretores de oleorresina em plântulas de *C. langsdorffii* mantidas a 15°C pode estar relacionado à origem evolutiva dos canais secretores de terpenos a partir de ancestrais adaptados à colonização de ambientes temperados (Fahn, 1988; Langenheim, 1990). Essa ideia é reforçada por análises filogenéticas que indicam que todas as enzimas terpeno-sintases vegetais (Trapp & Croteau, 2001) e todas as estruturas internas secretoras de resina (Denissova, 1975; Fahn, 1988) compartilham uma origem evolutiva comum, a partir de onde foram se diversificando e especializando nos diferentes grupos de plantas. No entanto, os dados obtidos neste trabalho não nos permitem concluir se a variação observada na área do lúmen de canais e cavidades se deve a danos celulares causados pelo estresse fisiológico ou se significa maior acúmulo de exsudato.

No que se refere às análises ultraestruturais, nossos resultados mostraram que variações na temperatura podem alterar os aspectos morfológicos das células epiteliais das cavidades secretoras nos eofilos de *C. langsdorffii*. As células epiteliais de plântulas de *C. langsdorffii* mantidas a 25°C apresentam características semelhantes às aquelas descritas para folhas jovens de *C. langsdorffii* em condições naturais (Rodrigues et al., 2011a). Os aspectos observados, tais como retículo endoplasmático liso bem desenvolvido, retículo periplastidial, abundância de plastídios polimórficos sem tilacóides e gotas de óleo volumosas no citoplasma

e no vacúolo são típicos de células ativas na secreção de substâncias lipofílicas (Fahn, 1979; Castro & Machado, 2006; Evert, 2006; Paiva & Machado, 2007; Rodrigues et al., 2011a,b).

Alterações ultraestruturais como retículo endoplasmático liso em formato de alças, acúmulo de grânulos osmiofílicos nos plastídios e mitocôndrias, além da dilatação das cristas e sinais de lise mitocondrial foram observadas nas células epiteliais de plântulas de *C. langsdorffii* mantidas a 15°C e 35°C. Entretanto, a presença de citoplasma denso rico em organelas, vacúolos pequenos e núcleo volumoso, além do acúmulo de numerosas gotas lipídicas indicam que a 15°C permanecem ativas em secreção e sugerem sua aclimação a baixa temperatura. Por outro lado, nas células epiteliais de plântulas mantidas sob 35°C são evidentes a baixa definição de organelas, a intensa vacuolização e a lise de organelas e do citoplasma, indicando diminuição de sua atividade secretora. Se as alterações celulares associadas a algum tipo de estresse são consequências de um efeito prejudicial causado por determinados fatores ou se são respostas adaptativas a tais condições é um assunto controverso (Pareek et al., 1997).

A presença de porções do retículo endoplasmático liso formando alças que envolvem porções do citoplasma é um aspecto notável tanto nas células epiteliais de plântulas mantidas a 15°C quanto naquelas mantidas a 35°C. Na literatura, esse evento é relatado como sendo uma característica típica do estresse provocado por baixa temperatura (Ishikawa, 1996), não tendo sido encontrados relatos de porções circulares de retículo endoplasmático em células mantidas sob temperaturas elevadas. A ocorrência de porções circulares de retículo endoplasmático foi relatada em células com atividade metabólica reduzida (Ishikawa, 1996) e sua origem foi atribuída aos níveis reduzidos de produtos da respiração e supressão de atividades fisiológicas como síntese protéica causadas pelo frio (Ishikawa, 1996). Estudos sugerem que as alças de retículo endoplasmático que envolvem porções do citoplasma originem vesículas de membrana dupla ou autofagossomas que participam do processo autofágico de morte celular (Huang & Klionsky, 2002; Thompson & Vierstra, 2005; Caca, 2010).

A maior elétron-densidade da matriz das mitocôndrias e maior dilatação de suas cristas, como observado, principalmente, nas células de plântulas mantidas a 35°C, podem indicar alterações no status de energia mitocondrial resultante da diminuição dos níveis de ATP (Kandasamy & Kristen, 1989; Pareek et al., 1997). Segundo Li et al. (2012) alterações estruturais observadas em mitocôndrias podem ser decorrentes do aumento dos níveis de

espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) os quais podem causar danos à proteínas, DNA e lipídios, tais como aqueles das membranas celulares (Noctor & Foyer, 1998; Niyogi, 1999; Imlay, 2003; Apel & Hirt, 2004). Da mesma forma, a abundância de glóbulos eletrôn-densos nos plastídios e mitocôndrias das células epiteliais de *C. langsdorffii* sob 15°C é um sintoma comum em casos de estresse provocado por temperaturas baixas e resultante da atividade de ROS (Hudák and Salaj, 1999). Segundo Ciamporová & Mistrik (1993) grânulos densos na matriz mitocondrial ou no estroma de plastídios podem representar acúmulos de proteínas que se precipitam em decorrência de algum tipo de estresse. A presença de acúmulos osmiofílicos no citoplasma das células epiteliais de plântulas mantidas a 35°C também pode ser um aspecto comum resultante do estresse provocado pela elevada temperatura causado pela desorganização dos componentes celulares e a ruptura das membranas internas que provocam a liberação de grânulos presentes nos plastídios ou mitocôndrias (Gross & Parthier, 1994; Sam et al., 2001). Ainda, as inclusões osmiofílicas encontradas nos vacúolos dessas células epiteliais podem representar proteínas desnaturadas de baixo peso molecular (Parsell et al., 1994; Pareek et al., 1997; Sam et al., 2001). Segundo Sam et al. (2001), essas proteínas podem proteger o mRNA contra a degradação induzida pelo estresse provocado pela temperatura elevada.

A observação de citoplasma reduzido com sinais de lise e degradação de organelas nas células epiteliais de plântulas de *C. langsdorffii* mantidas sob 35°C pode ser resultante da expansão de um vacúolo lítico ocasionada pela absorção e degradação de porções do citoplasma (van Doorn and Woltering, 2005; van Doorn et al., 2011), liberando hidrolases capazes de digerir todo o protoplasto, incluindo a membrana plasmática (van Doorn, 2011). A degradação de organelas, lise de porções do citoplasma e a intensa vacuolização observadas nessas células são consistentes com relatos de danos celulares causados por altas temperaturas (Sam et al., 2001; Vani et al., 2001; Zhang et al., 2005; Swidzinski et al., 2002, Fan and Xing, 2004, Burbridge et al., 2006, Reape et al., 2008) e indicam prejuízos à sua atividade secretora.

Em conclusão, nossos resultados mostraram maior desenvolvimento do sistema secretor, representado pela maior densidade de cavidades e canais secretores em plântulas de *C. langsdorffii* mantidas sob 25°C a 50% e 100% de luz, respectivamente, sugerindo maior proteção nessas condições. Isso nos permite inferir que plântulas dessa espécie teriam um sistema secretor desenvolvido em ambientes com diferentes condições de luminosidade, o que



pode colaborar com a ampla distribuição de *C. langsdorffii* em vários domínios fitogeográficos brasileiros. Nossos dados mostraram ainda que sob 25°C as células epiteliais mostraram sinais de intensa atividade secretora e que condições mais extremas de temperaturas, principalmente temperaturas mais elevadas, podem provocar alterações estruturais na maquinaria celular responsável pela síntese, acúmulo e eliminação da secreção, alterando sua capacidade secretora; esse é um aspecto que merece atenção, uma vez que são previstos aumentos de 1,5 a 6°C na temperatura global para os próximos anos (Houghton et al., 2001). Pesquisas adicionais sobre a influência da luz e temperatura no sistema secretor interno de plântulas de *C. langsdorffii*, envolvendo estudos fisiológicos, ecológicos, fitoquímicos e genéticos serão essenciais para determinar a complexa resposta funcional desse sistema aos fatores abióticos e sua implicação na interação da planta com o ambiente.

### Referências Bibliográficas

- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373–399.
- Arrhenius, S., Langenheim, J.H., 1983. Inhibitory effects of *Hymenaea* and *Copaifera* leaf resins on the leaf fungus *Pestalotia subcuticularis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 11, 361-366.
- Blanche, C.A., Lorio, P.L., Sommers, R.A., Hodges, J.D., Nebeker, T.E., 1992. Seasonal cambial growth and development of loblolly pine: xylem formation, inner bark chemistry, resin ducts, and resin flow. *Forest Ecology and Management* 49, 151-165.
- Burbridge, E., Diamond, M., Dix, P.J., McCabe, P.F., 2006. Use of cell morphology to evaluate the effect of a peroxidase gene on cell death induction thresholds in tobacco. *Plant Science* 171, 139–146.
- Cacas, J.-L. 2010. Devil inside: does plant programmed cell death involve the endomembrane system?. *Plant, Cell and Environment* 33, 1453–1473.
- Carvalho, P.E.R., 2003. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.1. 1039pp.
- Castro, M.M., Machado, S.R., 2006. Células e tecidos secretores. In: Appezzato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S.M. (Eds), *Anatomia Vegetal*. Viçosa: UFV.

- Castro, A.A.J.J.; Martins, F.R.; Tamashiro J.Y.; Sherperd, G.J. 1999. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86, 192-224.
- Ciamporová, M., Mistrík, I., 1993. Ultrastructural response of root cells to stressful conditions. *Environmental and Experimental Botany* 33, 11-26.
- Chudnyi, A.V., 1974. The importance of investigating the resin duct system in Scots pine wood in selection for resin productivity. *Genetika selektsiya, semenovodstvo i introduktsiya lesnykh porod* 225-243.
- Correa, M.P., 1984. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal.,
- Denissova, G.A., 1976. Comparative study of the secretory vesicles in species of the genus *Dictamnus* (Rutaceae) in the flora of the USSR. *Rastitel'nye Resursy* 12, 24-40.
- Evert, R.F. 2006. *Esau's Plant Anatomy. Meristems, Cells and Tissues of the Plant Body – Their structure, function and development*. 3rd ed. John Wiley and Sons: New Jersey.
- Eyles, A., Davies, N.W., Mohammed, C.M., 2004. Traumatic oil glands induced by pruning in the wound-associated phloem of *Eucalyptus globules*: chemistry and histology. *Trees* 18, 204-210.
- Fahn, A., 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press: London.
- Fahn, A., 1988. Secretory tissues and factors influencing their development. *Phyton* 28, 13-26.
- 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 (4), 857-863.
- Fan, T., Xing, T., 2004. Heat shock induces programmed cell death in wheat leaves. *Biologia Plantarum* 48 (3), 389-394.
- Feibert, E.B., Langenheim, J.H., 1988. Leaf resin variation in *Copaifera langsdorffi*: relation to irradiance and herbivory. *Phytochemistry, Great Britain* 7 (8), 2527-2532.
- Gedalovich, E., Fahn, A., 1985. Ethylene and gum duct formation in *Citrus*. *Annals of Botany* 56 (5), 571-577.
- Gerrits, P.O., 1991. The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology State University Groningen, Netherlands.
- Grabner, M., Wimmer, R., 2006. Variation of different tree-ring parameters in samples from each terminal shoot of a Norway spruce tree. *Dendrochronologia* 23, 111–120.

- Greenwood, C., Morey, P., 1979. Gummosis in honey mesquite. *Botanical Gazette* 140, 32-38.
- Gross, D., Parthier, B., 1994. Novel natural substances acting in plant growth regulation. *Journal of Plant Growth Regulation* 13, 93-114.
- Hanley, M.E. Fenner, M., Whibley, H., Darvill, B., 2004. Early plant growth: identifying the end point of the seedling phase. *New Phytologist* 163, 61-66.
- Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguier, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A., 2001. Climate change 2001: the Scientific Basis. Contributions of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Cambridge Univ. Press).
- Huang, W.P., Klionsky, D.J., 2002. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Structure Function* 27, 409-20.
- Hudák, J., Salaj J., 1999. Effect of low temperatures on the structure of plant cells. In: *Handbook of Plant and Crop Stress*, 2nd ed. (Ed. Pessaraki M). Marcel Dekker Press, New York, 441-464 pp.
- Imlay, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews Microbiology* 57, 395-418.
- Ishikawa, H.A., 1996. Ultrastructural features of chilling injury: injured cells and the early events during chilling of suspension-cultured mung bean cells. *American Journal of Botany* 83, 825-835.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg E.A., Stevens, P.F., 1999. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates: Massachusetts.
- Kandasamy, M.K., Kristen, U., 1989. Ultrastructural responses of Tabaco pollen to heat shock. *Protoplasma* 153, 104-110.
- Kitajima K. 1994. Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. *Oecologia* 8, 419-428
- Langenheim, J.H., 2003. *Plant resins: chemistry, evolution, ecology, ethnobotany*. Timber Press: Cambridge.
- Leite, A.M.C., Salomão, A.N., 1992. Estrutura populacional de regenerantes de Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em mata ciliar do Distrito Federal., *Acta Botânica Brasilica* 6, 123-133.
- Li, D.-M., Guo, Y.-K., Li, Q., Zhang, J., Wang, X.-J., Bai, J.-G., 2012. The pretreatment of cucumber with methyl jasmonate regulates antioxidant enzyme activities and protects

chloroplast and mitochondrial ultrastructure in chilling-stressed leaves. *Scientia Horticulturae* 143, 135–143.

- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R.G., Last, R.L., 1993. *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell* 5, 171-179.
- Lin, J., Sampson, D.A., 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.
- Lorenzi, H., 1998. *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Plantarum: Nova Odessa.
- Machado, S.R., Rodrigues, T.M., 2004. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 27, 135-147.
- Martín, J.A., Esteban, L.G., Palacios, P., Fernández, F.G., 2010. Variation in wood anatomical traits of *Pinus sylvestris* L. between Spanish regions of provenance. *Trees* 24, 1017–1028.
- Mooney H.A., Winner W.E., Pell E.J., 1991. *Response of plants to multiple stresses*. San Diego: Academic Press.
- Moreira, X., Sampedro, L., Zas, R., Solla, A., 2008. Alterations of the resin canal system of *Pinuspinaster* seedlings after fertilization of healthy and of a *Hylobiusabietis* attacked stand. *Trees* 22, 771-777.
- Niyogi, K.K., 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 50, 333–59.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 49, 249–79.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368-373.
- Oliveira, D.M.T., 2001. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Tephrosieae. *Revista Brasileira de Botânica* 24, 85-97.
- Osborne, D.J., Sargent, J.A., 1976. The positional differentiation of ethylene-responsive cells in rachis abscission zones in leaves of *Sambucus nigra* and their growth and ultrastructural changes at senescence and separation. *Planta (Berl.)* 130, 203-210.
- Paiva, E.A.S., Machado, S.R., 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.

- Pareek, A., Singla, S.L., Grover, A., 1997. Short-term salinity and high temperature stress-associated ultrastructure alterations in young leaf cell of *Oryza sativa* L. *Annals of Botany* 80, 629-639.
- Plowden, C., 2003. Production ecology of Copaíba (*Copaifera* spp.) oleoresin in the eastern Brazilian Amazon. *Economic Botany* 57 (4), 491-501.
- Reape, T.J., Molony, E.M., McCabe, P.F., 2008. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany* 59 (3), 435-444.
- Reynolds, E.S., 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, T.M., Teixeira, S.P., Machado, S.R., 2011a. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae-Caesalpinioideae). *Flora* 206, 585-594.
- Rodrigues, T.M., Santos, D.C., Machado, S.R. 2011b. 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.
- Roquim, C.C., Prado, C.H.B.A., Souza, J.P., 2009. Growth, photosynthesis and leaf water potential in young plants of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinaceae) under contrasting irradiances. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 21 (3), 197-208.
- 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, W.A., Uchytel, T.F., Feistner, G., Durbin, R.D, 1988. Developmental changes in content of foliar secretory cavities of *Tagetes erecta* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 75, 1787-1793.
- Salgado, M.A.S., Rezende, A.V., Felfili, J.M., Franco, A.C., Sousa-Silva, J.C., 2001. Crescimento e repartição de biomassa em plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf. Submeticas a diferentes níveis de sombreamento em viveiro. *Brasil Florestal* N° 70.
- Sam, O., Núñez, M., Ruiz-Sánchez, M.C., Dell'Amico, J., Falcón, V., Rosa, M.C.de la, Seoane, J., 2001. Effect of a brassinosteroid analogue and high temperature stress on leaf ultrastructure of *Lycopersicon esculentum*. *Biologia Plantarum* 44 (2), 213-218.
- Schoettle, A.W., Smith, W.K., 1999. Interrelationships among light, photosynthesis and nitrogen in the crown of mature *Pinus contorta* spp. *latifolia*. *Tree Physiology*. 19, 13-22.

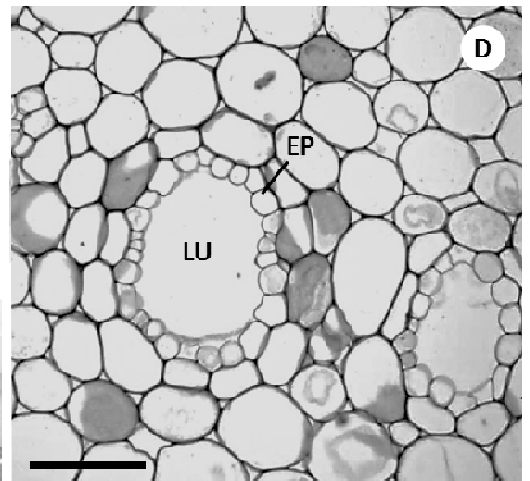
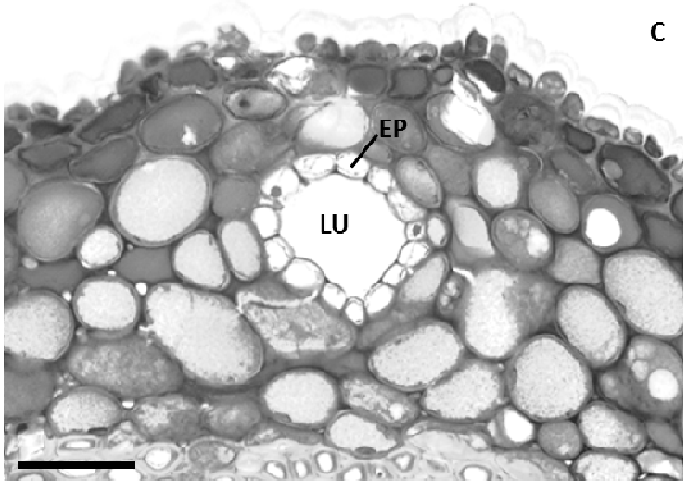
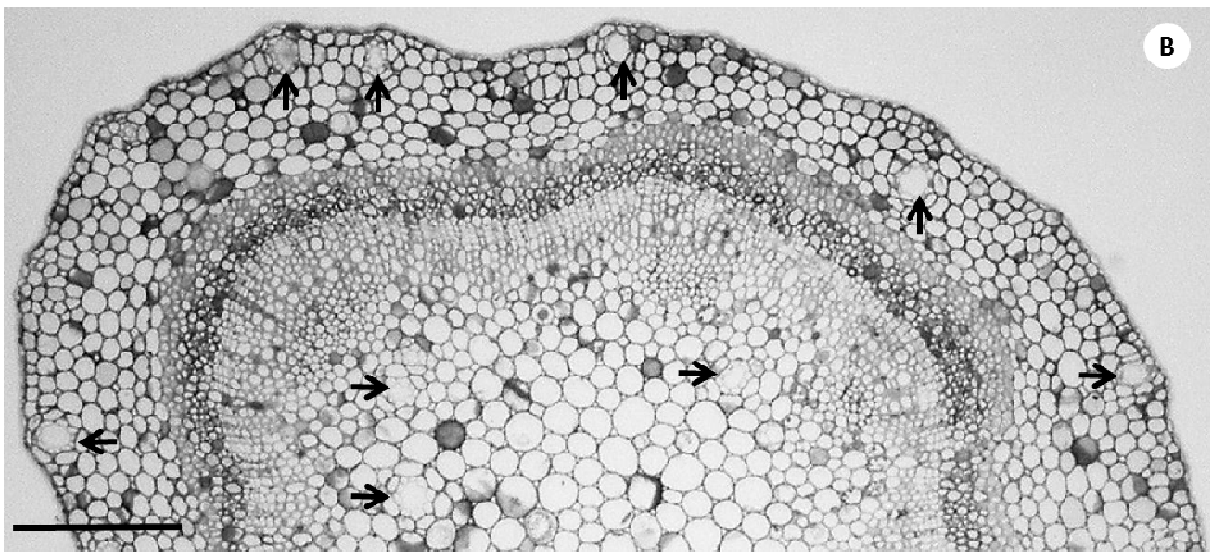
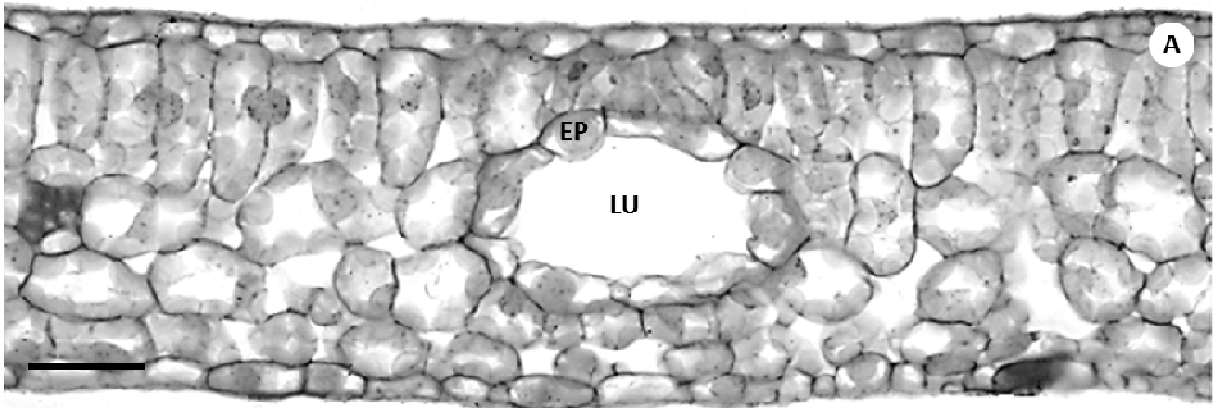
- Swidzinski, J.A., Sweetlove, L.J., Leaver, C.J., 2002. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 30 (4), 431-446.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2009. *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 848p.
- Terzaghi WB, Cashmore AR., 1995. Lightregulated transcription. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 46, 445–74.
- Thompson, A.R., Vierstra, R.D., 2005. Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Plant Biology* 8, 165–173.
- Trapp, S., Croteau, R.B., 2001. Genomic Organization of Plant Terpene Synthases and Molecular Evolutionary Implications. *Genetics* 158, 811–832.
- Uheda, E., Nakamura, S., 2000. Abscission of *Azolla* branches induced by ethylene and sodium azide. *Plant Cell Physiol* 41 (12), 1365-1372.
- Van Doorn, W.G., Woltering, E.J., 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Science* 10, 117–122.
- Van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois P., Hara-Nishimura,I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.A.J., Petersen, M., Smertenko, A., Taliany, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V., 2011. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation* 18, 1241-1246.
- Vani, B., Saradhi, P.P., Mohanty, P., 2001. Characterization of high temperature induced stress impairments in thylakoids of rice seedlings. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 38, 220–229.
- Veiga Jr., V.F., Pinto, A.C., 2002. O gênero *Copaifera* L. *Química Nova* 25, 273-286.
- Von Arnim, A., Deng, X., 1996. Light control of seedling development. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 47, 215–43.
- Watson, M.L., 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysics and Biochemistry Citology* 4, 475.
- Went, F.W., 1953. The effect of temperature on plant growth. In *Annual Review of Plant Physiology* 4: 347-358. Stanford, California.
- Wimmer, R., Grabner, M., 1997. Effects of climate on vertical resin duct density and radial growth of orway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] *Trees* 11, 271 –276.
- Wimmer, R., Grabner, M., 2000. A comparison of tree-ring features in *Picea abies* as correlated with climate. *IAWA Jour.* 21 (4), 403-416.

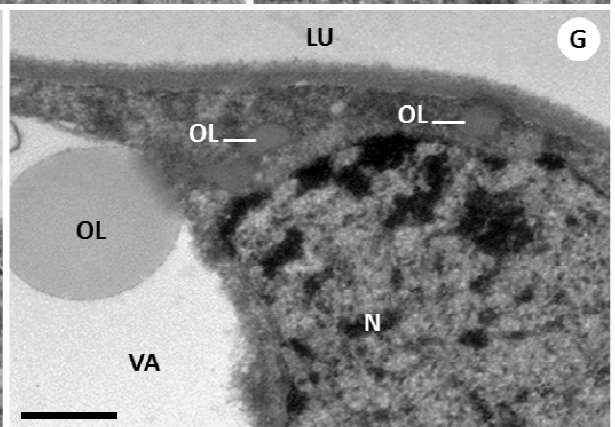
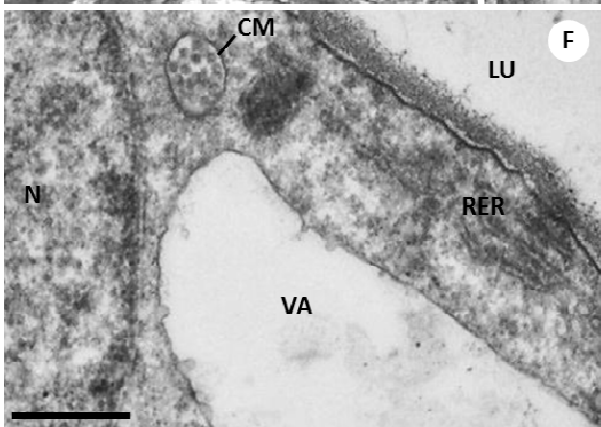
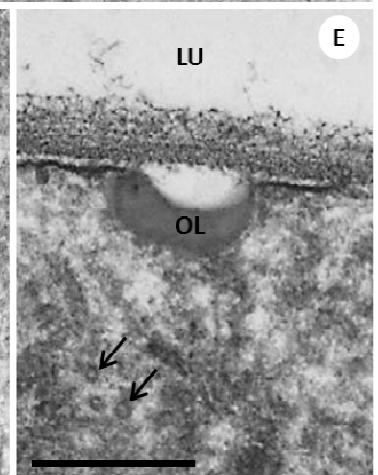
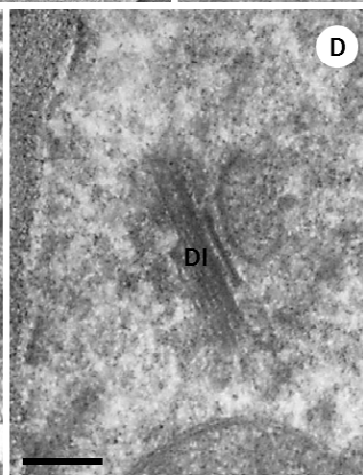
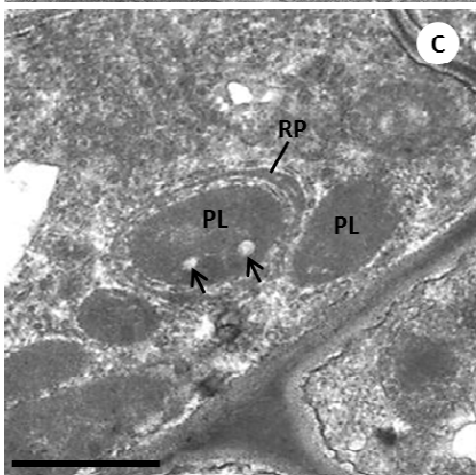
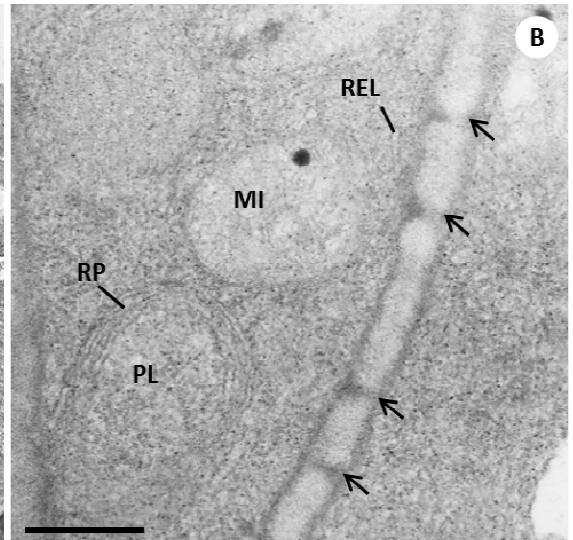
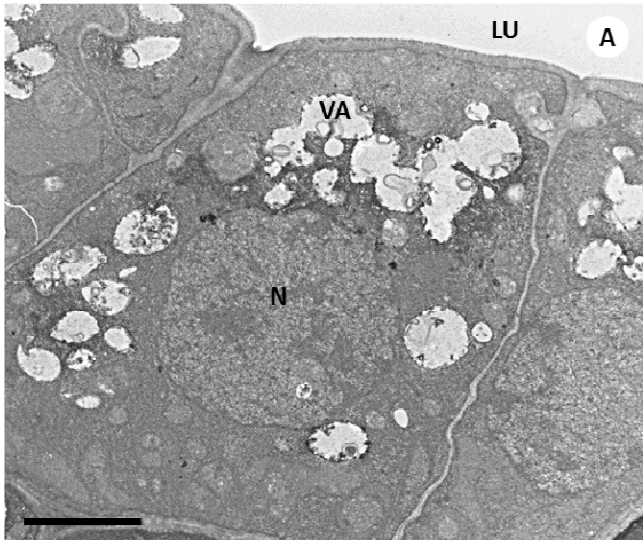
- Zamski, E. 1972. Temperature and photoperiodic effects on xylem and vertical resin duct formation in *Pinus halepensis* Mill. Israel Journal of Botany 21, 99 – 107.
- Zhang, J.; Huang, W.; Liu, Y.; Pan, Q. Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. *Jingxiu*) under cross-temperature stresses. Journal of Integrative Plant Biology 47(8), 959-970.

## ***FIGURAS***

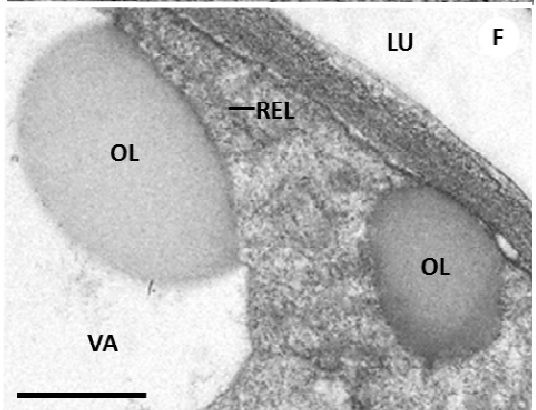
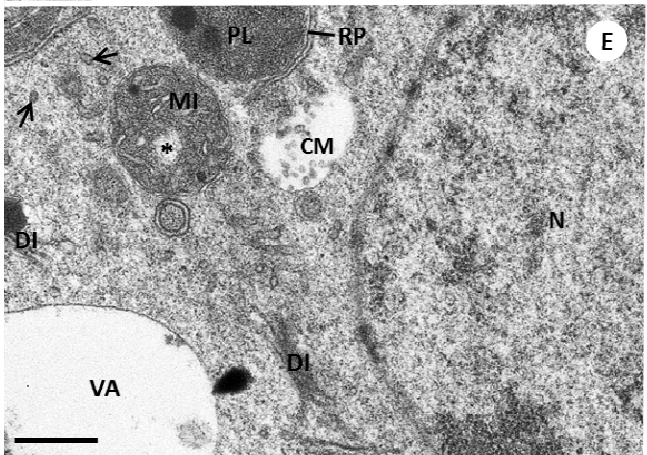
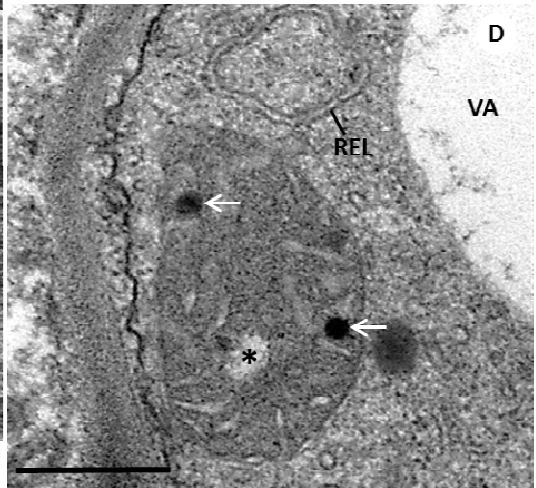
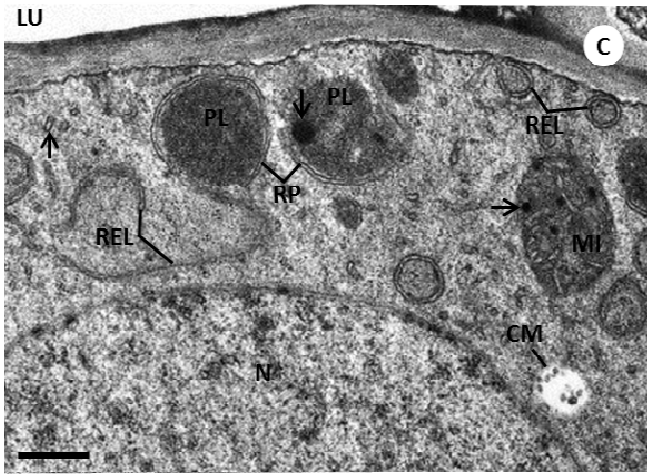
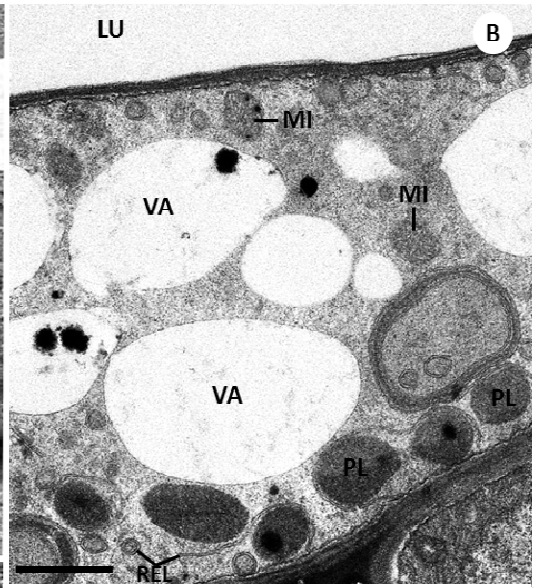
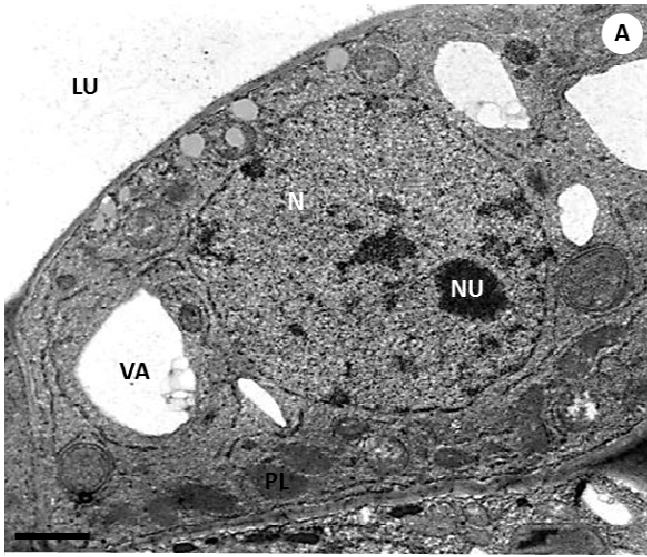
---



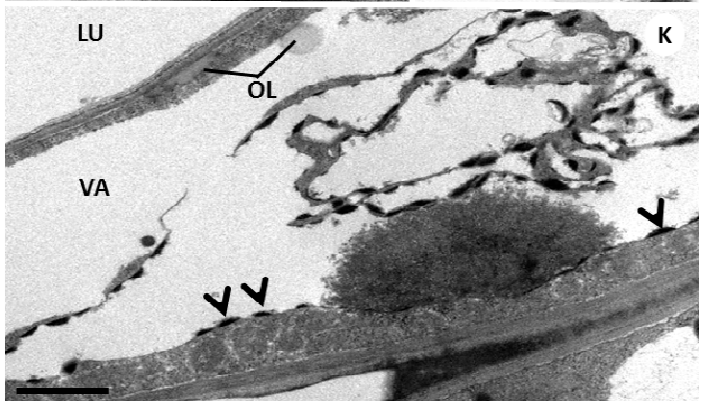
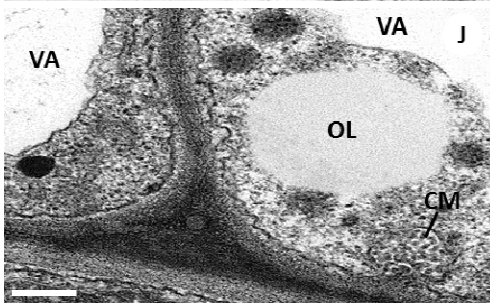
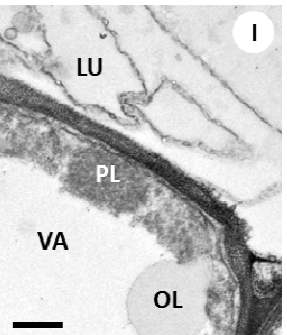
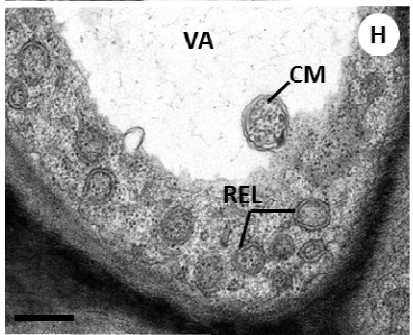
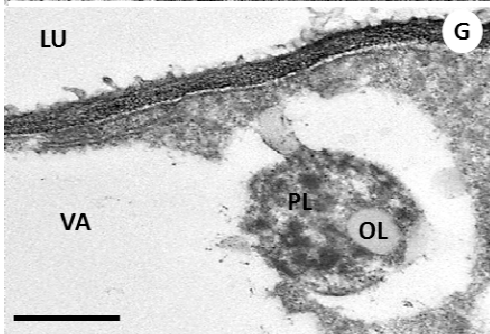
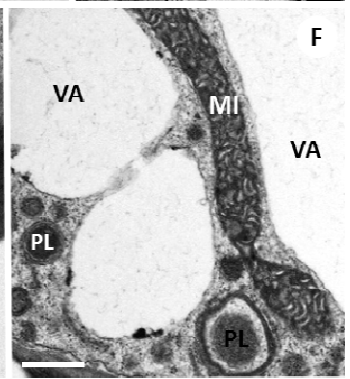
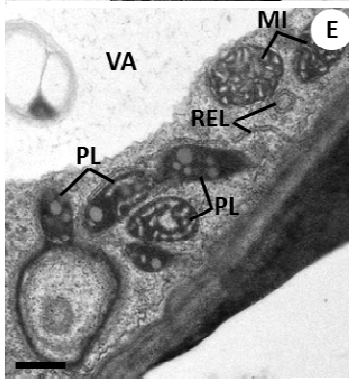
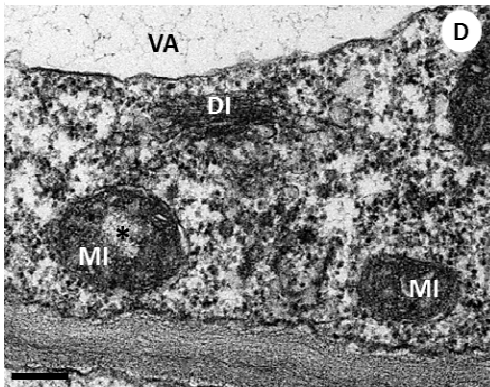
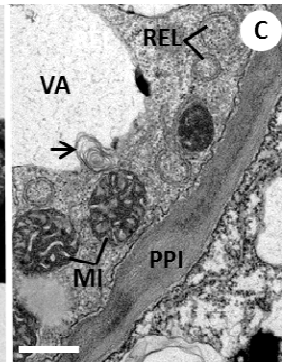
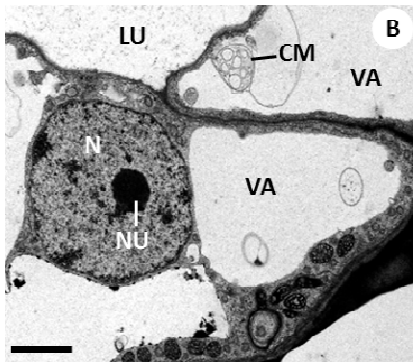
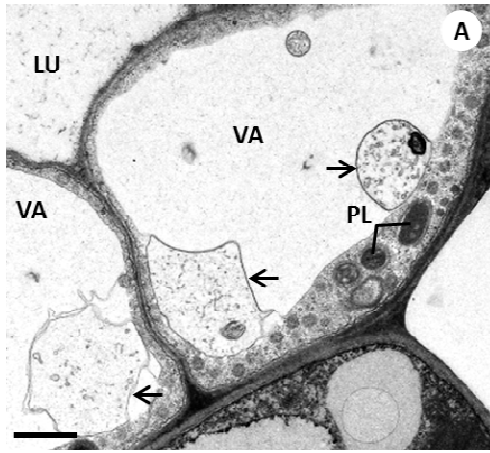












## LEGENDA DAS FIGURAS

**Figuras 1. A-D.** Fotomicrografias de plântulas de *Copaifera langsdorffii* mantidas a 25°C e 1250 lux. **A.** Secção transversal de eofilo mostrando cavidade secretora no mesofilo. EP = epitélio secretor; LU= lúmen. **B-D.** Secções transversais do epicótilo. **B.** Aspecto geral mostrando cavidades (setas) no córtex e canais (seta) na medula. **C.** Detalhe mostrando cavidade secretora no córtex do epicótilo. EP = epitélio secretor; LU= lúmen. **D.** Detalhe mostrando canal secretor na medula do epicótilo. EP = epitélio secretor; LU= lúmen. **Barras:** **A, C e D** = 50µm; **B** = 150µm.

**Figura 2. A-G.** Eletronmicrografias (MET) de células epiteliais de cavidades secretoras nos eofilos de plântulas de *C. langsdorffii* mantidas a 25°C. **A.** Aspecto geral mostrando paredes delgadas, citoplasma denso e abundante, núcleo (N) volumoso e vacúolos (VA) pequenos. LU=lúmen. **B.** Detalhe mostrando parede com plasmodesmos (setas), além de ribossomos, retículo endoplasmático liso (REL), mitocôndria (MI) e plastídio (PL) associado a retículo periplastidial (RP). **C.** Porção celular mostrando numerosos plastídios (PL). Observar inclusões lipídicas (seta) e retículo periplastidial (RP). **D.** Detalhe mostrando dictiossomo (DI) ativo na produção de vesículas. **E.** Pormenor mostrando vesículas (setas) no citoplasma e gota de óleo (OL) próxima a parede periclinal externa. LU=lúmen. **F.** Porção celular mostrando núcleo (N), retículo endoplasmático rugoso (RER) e corpo multivesicular (CM). VA= vacúolo; LU=lúmen. **G.** Detalhe mostrando numerosas gotas de óleo (OL) no citoplasma e no interior do vacúolo (VA). N=núcleo; LU=lúmen. **Barras:** **A** = 5µm; **C** = 1µm; **E, F e G**= 0,5µm; **B e D**=0,2µm.

**Figura 3. A-F.** Eletronmicrografias (MET) de células epiteliais de cavidades secretoras nos eofilos de plântulas de *C. langsdorffii* mantidas a 15°C. **A.** Aspecto geral mostrando citoplasma abundante rico em organelas, vacúolos (VA) pequenos e núcleo (N) volumoso com nucléolo (NU) evidente. PL=plastídio. Observar numerosas gotas de óleo no pólo distal da célula. LU=lúmen. **B.** Célula com citoplasma abundante contendo numerosas mitocôndrias (MI) e plastídios (PL) com grânulos elétron-densos e retículo endoplasmático liso (REL). Observar acúmulos osmiofílicos no interior de vacúolos (VA). LU=lúmen. **C.** Detalhe mostrando citoplasma denso rico em polirribossomos e vesículas dispersas (seta preta).

Observar plastídios (PL), mitocôndrias (MI) e retículo endoplasmático liso (REL) alongado ou formando alças que envolvem porções do citoplasma. As setas brancas indicam inclusões osmiofílicas nos plastídios e mitocôndrias. N=núcleo; CM=corpo multivesicular; RP=retículo periplastidial., **D.** Detalhe mostrando membrana plasmática sinuosa, retículo endoplasmático liso (REL) em formato de alça e mitocôndria com cristas pouco dilatadas contendo inclusões osmiofílicas (setas brancas) e regiões de lise (\*) da matriz sinais. VA=vacúolo. **E.** Porção celular mostrando citoplasma rico em polirribossomos e vesículas dispersas (setas pretas). Observar dictiossomos (DI), mitocôndria (MI) com sinal de lise (\*) na matriz e plastídio (PL) associado a retículo periplastidial (RP). N=núcleo; VA=vacúolo. **F.** Imagem mostrando gota de óleo (OL) volumosa no citoplasma próxima a parede periclinal externa (PPE) e no interior de vacúolo (VA). REL=Retículo endoplasmático liso; LU= Lúmen. **Barras:** **A e B** = 1µm; **C, D, E e F** = 0,5µm.

**Figura 4. A-K.** Eletronmicrografias (MET) de células epiteliais de cavidades secretoras nos eofilos de plântulas de *C. langsdorffii* mantidas a 35°C. **A.** Aspecto geral mostrando citoplasma reduzido e vacúolo (VA) proeminente com inclusões membranosas (setas). PL=plastídio; LU=lúmen. **B.** Células mostrando vacúolos (VA) volumosos. Nota-se núcleo (N) com nucléolo compacto (NU). CM=corpo multivesicular; LU=lúmen. **C.** Detalhe mostrando parede periclinal interna (PPI) espessa, mitocôndrias (MI) com cristas dilatadas e retículo endoplasmático liso (REL) em formato de alça. A seta indica inclusão membranosa no interior do vacúolo (VA). **D.** Pormenor mostrando mitocôndrias (MI) com sinais de lise (\*) na matriz. DI=dictiossomos; VA=vacúolo. **E.** Detalhe da figura B mostrando plastídios (PL) elétron-densos contendo gotas elétron-opacas e sinais de lise. Observar mitocôndrias (MI) elétron-densas com cristas dilatadas, retículo endoplasmático liso (REL) e vacúolo (VA). **F.** Porção celular mostrando mitocôndria (MI) elétron-densa alongada e com cristas dilatadas, plastídios (PL) com sinais de lise e vacúolos (VA) volumosos. **G.** Plastídio (PL) em degradação no interior do vacúolo (VA). OL=gota de óleo; LU=lúmen. **H.** Observar abundância de retículo endoplasmático liso (REL) em formato circular no citoplasma periférico e corpo multivesicular (CM) no interior do vacúolo (VA). **I.** Gota de óleo (OL) no interior do vacúolo (VA), plastídio (PL) em degradação acúmulo de material filamentoso no lúmen (LU) da cavidade. **J.** Detalhe mostrando gota de óleo (OL) volumosa e corpos osmiofílicos no citoplasma. CM=corpo multivesicular; VA=vacúolo. **K.** Célula mostrando

vacúolo (VA) volumoso contendo grumos e filamentos de material osmiofílico. As pontas de setas indicam acúmulo de material osmiofílico aderido ao tonoplasto. OL=gota de óleo.

**Barras: B = 2 $\mu$ m; A e K = 1 $\mu$ m; C, E, F, G, H e I = 0,5 $\mu$ m; D e J = 0,2 $\mu$ m.**

## ***CONSIDERAÇÕES FINAIS***

---



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho avaliou a influência da luz e da temperatura no desenvolvimento do sistema secretor de uma espécie arbórea de leguminosa nativa do Brasil. Mais especificamente, foi estudada a influência da luz e da temperatura na densidade e na área do lúmen de cavidades e canais secretores em plântulas de *Copaifera langsdorffii*, além das respostas ultraestruturais das células epiteliais a diferentes temperaturas.

Atualmente, frente às mudanças climáticas globais, a realização de pesquisas visando compreender os ajustes do sistema secretor das plantas a fatores associados ao estresse torna-se cada vez mais necessária. A inexistência de pesquisas experimentais nesta área envolvendo espécies nativas de leguminosas de valor comercial estimulou o desenvolvimento deste trabalho.

A escolha desta espécie deveu-se à sua ampla distribuição em vários domínios fitogeográficos brasileiros e à sua importância na economia nacional devido à produção do óleo utilizado na produção de biodiesel, nas indústrias de fármacos e cosméticos e na medicina popular, além do papel ecológico da secreção na proteção da planta contra herbívoros e patógenos.

Os resultados obtidos mostraram que, apesar da presença de canais e cavidades secretores ser um aspecto constitutivo determinado geneticamente em *C. langsdorffii*, fatores exógenos, como luz e temperatura, influenciam de forma significativa o desenvolvimento do sistema secretor desta espécie.

A maior densidade de cavidades secretoras de óleo observada em plântulas de *C. langsdorffii* mantidas sob 25°C e 50% e de canais secretores de oleoresina em plântulas sob 25°C e 100% pode estar relacionada ao sucesso desta espécie na colonização de diferentes ambientes caracterizados por diferentes intensidades luminosas. O fato de serem os canais e cavidades os sítios de produção de substâncias biologicamente ativas faz com que essas estruturas secretoras tenham papel fundamental na proteção das plantas contra herbívoros e patógenos e, portanto, na sobrevivência das plântulas aos ataques externos.

A resposta diferencial de cavidades e canais secretores à luminosidade é um aspecto interessante e que merece estudos mais aprofundados nas áreas de biologia molecular, fisiologia e ecologia vegetal.

No que se refere à área do lúmen, cavidades e canais respondem de formas variáveis às condições de luz e temperatura. Entretanto, neste estudo não foi possível identificar se o aumento na área do lúmen em determinadas condições se deve a um processo de degradação de lamela média e afastamento celular causado pelo estresse gerado por condições mais extremas de luz e/ou temperatura ou se representam um aumento na capacidade de armazenamento do exsudato produzido pelas células epiteliais. Estudos adicionais envolvendo análises ultraestruturais aprofundadas, testes citoquímicos para marcação da degradação de parede celular e análise da produtividade da secreção em plântulas nessas condições poderão colaborar para o entendimento deste aspecto.

Pôde-se também observar que células de plântulas mantidas em condições mais extremas de temperatura (15°C e 35°C) apresentam alterações ultraestruturais em comparação com aquelas mantidas a 25°C evidenciadas por sinais de lise em diferentes compartimentos celulares, principalmente em células mantidas a 35°C. Tais alterações poderiam comprometer a capacidade secretora dessas células levando à menor proteção dos indivíduos contra herbívoros e patógenos. Estudos futuros envolvendo aspectos ecológicos e fisiológicos, além de marcações para espécies reativas de oxigênio (ROS) e morte celular, além de técnicas fitoquímicas que indiquem a maior ou menor produção de secreção em determinadas condições podem corroborar nossos resultados.

Espera-se que os resultados obtidos neste estudo possam subsidiar pesquisas em diferentes áreas da Botânica, programas de manejo e uso racional de *C. langsdorffii*, além de contribuir com a conservação da espécie estudada e dos ambientes onde ela ocorre.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alencar, J.C., 1982. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne Leguminosae, na Amazônia central., Produção de óleo-resina. Acta Amzônica 12, 15-89.
- Alfaro, R.I., 1995. An induced defense reaction in white spruce to attack by the white pine weevil, *Pissodes strobi*. Canadian Journal Forest Research 25, 1725–1730.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55, 373–399.
- Arrhenius, S., Langenheim, J.H., 1983. Inhibitory effects of *Hymenaea* and *Copaifera* leaf resins on the leaf fungus *Pestalotia subcuticularis*. Biochemical Systematics and Ecology 11, 361-366.
- Batalha, M.A., Aragaki, S., Mantovani, W., 1997. Variações fenológicas das espécies do cerrado de Emas - Pirassununga, SP. Acta Botanica Brasilica 11, 61-78.
- Blanche, C.A., Lorio, P.L., Sommers, R.A., Hodges, J.D., Nebeker, T.E., 1992. Seasonal cambial growth and development of loblolly pine: xylem formation, inner bark chemistry, resin ducts, and resin flow. Forest Ecology and Management 49, 151-165.
- Bosabalidis, A., Tsekos, I., 1982. Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. I. Early stages of the gland cells differentiation. Protoplasma 112, 55–62.
- Braga, P.I.S., 1976. Atração de abelhas polinizadoras de Orchidaceae com auxílio de iscas-odores na campainha, campinara e floresta tropical úmida da região de Manaus. Ciência e Cultura, Campinas 28 (7), 767-773.
- Burbridge, E., Diamond, M., Dix, P.J., McCabe, P.F., 2006. Use of cell morphology to evaluate the effect of a peroxidase gene on cell death induction thresholds in tobacco. Plant Science 171, 139–146.
- Cacas, J.-L. 2010. Devil inside: does plant programmed cell death involve the endomembrane system?. Plant, Cell and Environment 33, 1453–1473.
- Camargos, J.A.A., Coradin, V.T.R., Czarneski, C.M., Oliveira, D., Meguerditchian, I., 2001. Catálogo de Árvores do Brasil. 2 ed. Edições IBAMA: Brasília.
- Carvalho, P.E.R., 2003. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.1. 1039pp.
- Castro, M.M., Machado, S.R., 2006. Células e tecidos secretores. In: Appezzato-da-Glória, B., Carmello-Guerreiro, S.M. (Eds), Anatomia Vegetal. Viçosa: UFV.

- Castro, A.A.J.J.; Martins, F.R.; Tamashiro J.Y.; Sherperd, G.J. 1999. How rich is the flora of Brazilian Cerrados?. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86, 192-224.
- Ciamporová, M., Mistrík, I., 1993. Ultrastructural response of root cells to stressful conditions. *Environmental and Experimental Botany* 33, 11-26.
- Chudnyi, A.V., 1974. The importance of investigating the resin duct system in Scots pine wood in selection for resin productivity. *Genetika selektsiya, semenovodstvo i introduktsiya lesnykh porod* 225-243.
- Coelho, M.G.P., Marques, P.R., Gayer, C.R.M., Vaz, L.C.A., Nogueira, J.F. e Sabino, K.C.C. (2001) Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. *Journal of Ethnopharmacology* 77, 159-164.
- Correa, M.P., 1984. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal.,
- Crankshaw, D.R., Langenheim, J.H. 1981., Variation in terpenes and phenolics through leaf development in *Hymenaea* and its possible significance to herbivory. *Biochemical Systematics and Ecology* 9, 115-124.
- Dell, B., McComb, J.A., 1978. Plant resins – their formation, secretion and possible functions. *Advances in Botanical Research* 6, 276–316.
- Denissova, G.A., 1976. Comparative study of the secretory vesicles in species of the genus *Dictamnus* (Rutaceae) in the flora of the USSR. *Rastitel'nye Resursy* 12, 24-40.
- Dünisch, O., Bass, P., 2006. On the origin of intercellular canals in the secondary xylem of selected Meliaceae species. *IAWA Bull.* 27, 281-297.
- Durigan, G., Franco, G.A.D.C., Pastore, J.A., Aguiar, O.T., 1997. Regeneração natural da vegetação de Cerrado sob floresta de *Eucalyptus citriodora*. *Revista do Instituto Florestal* 9 (1), 71-85.
- Dwyer, J.D. 1951. The Central American, West Indian and South American species of *Copaifera* (Caesalpinaceae). *Brittonia* 7 (3) 143-172.
- Evert, R.F. 2006. *Esau's Plant Anatomy. Meristems, Cells and Tissues of the Plant Body – Their structure, function and development.* 3rd ed. John Wiley and Sons: New Jersey.
- Eyles, A., Davies, N.W., Mohammed, C.M., 2004. Traumatic oil glands induced by pruning in the wound-associated phloem of *Eucalyptus globules*: chemistry and histology. *Trees* 18, 204-210.
- Fahn, A., 1979. *Secretory tissues in plants.* Academic Press: London

- Fahn, A., 1988. Secretory tissues and factors influencing their development. *Phyton* 28, 13-26.
- 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 (4), 857-863.
- Fahn, A., Zamski, E., 1970. The influence of pressure, wind, wounding and growth substances on the rate of resin duct formation in *Pinus halepensis* wood. *Israel Journal of Botany* 19, 429 – 446.
- Fan, T., Xing, T., 2004. Heat shock induces programmed cell death in wheat leaves. *Biologia Plantarum* 48 (3), 389-394.
- Feibert, E.B., Langenheim, J.H., 1988. Leaf resin variation in *Copaifera langsdorffii*: relation to irradiance and herbivory. *Phytochemistry, Great Britain* 7 (8), 2527-2532.
- Gedalovich, E., Fahn, A., 1985. Ethylene and gum duct formation in *Citrus*. *Annals of Botany* 56 (5), 571-577.
- Gerrits, P.O., 1991. The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology State University Groningen, Netherlands.
- Grabner, M., Wimmer, R., 2006. Variation of different tree-ring parameters in samples from each terminal shoot of a Norway spruce tree. *Dendrochronologia* 23, 111–120.
- Greenwood, C., Morey, P., 1979. Gummosis in honey mesquite. *Botanical Gazette* 140, 32-38.
- Gross, D., Parthier, B., 1994. Novel natural substances acting in plant growth regulation. *Journal of Plant Growth Regulation* 13, 93-114.
- Guerra, M.E.C., Filho, S.M., Gallão, M.I., 2006. Morfologia de sementes, de plântulas e da germinação de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae–Caesalpinioideae). *Cerne* 12, 322–328.
- Hanley, M.E. Fenner, M., Whibley, H., Darvill, B., 2004. Early plant growth: identifying the end point of the seedling phase. *New Phytologist* 163, 61–66.
- Harbone, J.B., 1993 Introduction to ecological biochemistry, 4th ed. London: Academic Press.
- Haridasan, M., 2008. Nutritional adaptations of native plants of the cerrado biome in acid soils. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20 (3), 183-195.
- Houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguier, M., van der Linden, P.J., Dai, X., Maskell, K., Johnson, C.A., 2001. Climate change 2001: the Scientific Basis. Contributions of

Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Cambridge Univ. Press).

- Huang, W.P., Klionsky, D.J., 2002. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Structure Function* 27, 409–20.
- Hudák, J., Salaj J., 1999. Effect of low temperatures on the structure of plant cells. In: *Handbook of Plant and Crop Stress*, 2nd ed. (Ed. Pessarakli M). Marcel Dekker Press, New York, 441-464 pp.
- Hudgins, J.W., Christiansen, E., Franceschi, V.R., 2003. Methyl jasmonate induces changes mimicking anatomical defenses in diverse members of the Pinaceae. *Tree Physiology*. 23, 361-371.
- Imlay, J.A., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews Microbiology* 57, 395–418.
- Ishara, K.R., 2010. Aspectos Florísticos e Estruturais de três Fisionomias de Cerrados no Município de Pratânia, São Paulo. Tese de doutorado, UNESP, Instituto de Biociências, Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica). Botucatu-SP.
- Ishikawa, H.A., 1996. Ultrastructural features of chilling injury: injured cells and the early events during chilling of suspension-cultured mung bean cells. *American Journal of Botany* 83, 825-835.
- Janzen, D.H., 1975. Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *American Naturalist* 104, 501-528.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill.
- Johnson, R.H., Young, B.L., Alstad, D., 1997. Responses of Ponderosa pine growth and volatile terpene concentrations to manipulation of soil water and sunlight availability. *Canadian Journal Forest Research* 27 (11), 1794-1804.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellog, E.A., Stevens, P.F., 1999. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates: Massachusetts.
- Kandasamy, M.K., Kristen, U., 1989. Ultrastructural responses of Tabaco pollen to heat shock. *Protoplasma* 153, 104-110.
- Kanegae, M.F., Braz, V, Franco, A.C., 2000. Efeitos da seca sazonal e disponibilidade de luz na sobrevivência e crescimento de *Bowdichia virgilioides* em duas fitofisionomias típicas dos cerrados do Brasil Central., *Revista Brasileira de Botânica* 23, 459-468.
- Kilpeläinen, A., Gerendiain, A.Z., Luostarinen, K., Peltola, H., Kellomäki, S., 2007. Elevated temperature and CO<sub>2</sub> concentration effects on xylem anatomy of Scots pine. *Tree Physiology* 27, 1329–1338.

- Kitajima K., 1994. Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. *Oecologia* 8, 419-428
- Langenheim, J.H., 1973. Leguminous resin-producing trees in Africa and South America. In: Meggers, S.B.J., Ayensu, E.S., Duckworth, W.D. (Eds.), *Tropical Forest Ecosystems in Africa and South America: A Comparative Review*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 89–104 pp.
- Langenheim, J.H., 2003. *Plant resins: chemistry, evolution, ecology, ethnobotany*. Timber Press: Cambridge.
- Langenheim, J.H., Clovis, C.L., Macedo, C.A., Stubblebine, W.H., 1986. *Hymenaea* and *Copaifera* leaf sesquiterpenes in relation to lepidopteran herbivory in southeastern Brazil. *Biochemical systematics and ecology* 14, 41-49.
- Langenheim, J.H., Lincoln, D.E., Stubblebine, W.H., Gabrielli, A.C., 1982. Evolutionary implications of leaf resin pocket patterns in the tropical tree *Hymenaea* (Caesalpinioideae: Leguminosae). *American Journal of Botany* 69, 595-607.
- Langenheim, J.H., Stubblebine, W.H. 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 (2), 97-106.
- Langenheim, J.H., Stubblebine, W.H., Lincoln, D.E., Foster, C.E., 1978. Implications of variation in resin composition among organs, tissues and populations in the tropical legume *Hymenaea*. *Biochemical systematics and ecology* 6, 299- 313.
- Larson, P.R., 1994. *The vascular cambium, development and structure*. Springer Verlag Berlin/ Heidelberg/ New York. 725p.
- Leite, A.M.C., Salomão, A.N., 1992. Estrutura populacional de regenerantes de Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em mata ciliar do Distrito Federal., *Acta Botânica Brasilica* 6, 123-133.
- Lerstern, N.R., Curtis, J.D., 1986. Tubular cavities in white snakeroot, *Eupatorium rugosum* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 73, 1016-1021.
- Lin, J., Sampson, D.A., Ceulemans, R., 2001. The effect of crown position and tree age on resin-canal density in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Canadian Journal of Botany* 79, 1257-1261.
- Li, D.-M., Guo, Y.-K., Li, Q., Zhang, J., Wang, X.-J., Bai, J.-G., 2012. The pretreatment of cucumber with methyl jasmonate regulates antioxidant enzyme activities and protects chloroplast and mitochondrial ultrastructure in chilling-stressed leaves. *Scientia Horticulturae* 143, 135–143.



- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R.G., Last, R.L., 1993. Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-6 irradiation. *The Plant Cell* 5, 171-179.
- Lorenzi, H., 1998. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum: Nova Odessa.
- Luis M., Gričar, J., Čufar, K., Raventós, J., 2007. Seasonal dynamics of wood formation in *Pinus halepensis* from dry and semi-arid ecosystems in Spain. *IAWA Journal* 28 (4), 389–404.
- Maciel, M.A.M.M., Veiga Jr, V.F., Pinto, A.C., 2002. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova* 25 (3), 429-438.
- Machado, S.R., Rodrigues, T.M., 2004. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 27, 135-147.
- Marcati, C.R., Angyalossy-Alfonso, V., Benetati L., 2001. Anatomia comparada do lenho de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae Caesalpinioideae) de floresta e cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 24, 311-320.
- Martín, J.A., Esteban, L.G., Palacios, P., Fernández, F.G., 2010. Variation in wood anatomical traits of *Pinus sylvestris* L. between Spanish regions of provenance. *Trees* 24, 1017–1028.
- Medeiros, R.S., Vieira, G., 2008. Sustainability of extraction and production of copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brasil. *Forest Ecology and Management* 256, 282-288.
- Metcalf, C.R., Chalk, L., 1950. *Anatomy of the Dicotyledons*, vol. 1. Oxford: Clarendon Press.
- Milani, J.F., Rocha, J.F., Teixeira, S.P., 2012. Oleoresin glands in copaíba (*Copaifera trapezifolia* Hayne: Leguminosae), a Brazilian rainforest. *Tree* 26, 769–775.
- Monteiro, W.R., Fahn, A., Caldeira, W., Castro, M.M., 1999. Ultrastructural observations on the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* DC (Asteraceae). *Flora* 194, 113–126.
- Mooney H.A., Winner W.E., Pell E.J., 1991. *Response of plants to multiple stresses*. San Diego: Academic Press.
- Moreira, X., Sampedro, L., Zas, R., Solla, A., 2008. Alterations of the resin canal system of *Pinuspinaster* seedlings after fertilization of healthy and of a *Hylobiusabieties* attacked stand. *Trees* 22, 771-777.

- Nair, M.N.B., Patel, K.R., Shah, J.J., Pandalai, R.C., 1980. Effect of ethephon (2-chloroethyl phosphonic acid) on gummosis in the bark of *Azadirachta indica*. *Indian Journal of Experimental Biology* 18, 500-503.
- Newton, P., Watkinson, A. R., Peres, C.A., 2011. Determinants of yield in a non-timber forest product: *Copaifera* oleoresin in Amazonian extractive reserves Forest. *Ecology and Management* 261, 255–264.
- Nishida, R., 2002. Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera. *Annual Review Entomology* 47, 57–92.
- Niyogi, K.K., 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 50, 333–59.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 49, 249–79.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368-373.
- Oliveira, D.M.T., 2001. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Tephrosieae. *Revista Brasileira de Botânica* 24, 85-97.
- Oliveira, E.C.P., Lameira, O.A., Zoghbi, M.G.B., 2006. Identificação da época de coleta do óleoresina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju. PA. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 8, 14–23.
- Osborne, D.J., Sargent, J.A., 1976. The positional differentiation of ethylene-responsive cells in rachis abscission zones in leaves of *Sambucus nigra* and their growth and ultrastructural changes at senescence and separation. *Planta (Berl.)* 130, 203-210.
- Paiva, E.A.S., Machado, S.R., 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.
- Paiva, E.A.S., Oliveira, D.M.T., Machado, S.R., 2008. Anatomy and ontogeny of the pericarpo of *Pterodon emargiatus* Vogel (Fabaceae, Faboideae) with emphasis on secretory ducts. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 80, 455-465.
- Pareek, A., Singla, S.L., Grover, A., 1997. Short-term salinity and high temperature stress-associated ultrastructure alterations in young leaf cell of *Oryza sativa* L. *Annals of Botany* 80, 629-639.
- Pedroni, F., Sanchez, M., Santos, F.A.M., 2002. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira Botânica* 25 (2), 183-194.

- Plowden, C., 2003. Production ecology of Copaíba (*Copaifera* spp.) oleoresin in the eastern Brazilian Amazon. *Economic Botany* 57 (4), 491-501.
- Ratter, J.A., Bridgewater, S., Ribeiro J.F., 2003. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. *Edinburgh Journal of Botany* 60, 57-109.
- Reape, T.J., Molony, E.M., McCabe, P.F., 2008. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany* 59 (3), 435-444.
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208-212.
- Rigling, A., Brühlhart, H., Bräker, O.U., Foster, T., Schweingruber, F.H., 2003. Effects of irrigation on diameter growth and vertical resin duct production in *Pinus sylvestris* L. on dry sites in the central Alps, Switzerland. *Forest Ecology and Management* 175, 285-296.
- Rodrigues, T.M., Machado, S.R., 2009. Developmental and structural features of secretory canals in root and shoot wood of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Trees* 23, 1013-1018.
- Rodrigues, T.M., Teixeira, S.P., Machado, S.R. 2011a. The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae-Caesalpinioideae). *Flora* 206, 585-594.
- Rodrigues, T.M., Santos, D.C., Machado, S.R. 2011b. 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
- Roquim, C.C., Prado, C.H.B.A., Souza, J.P., 2009. Growth, photosynthesis and leaf water potential in young plants of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpiniaceae) under contrasting irradiances. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 21 (3), 197-208.
- 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, W.A., Uchytel, T.F., Feistner, G., Durbin, R.D, 1988. Developmental changes in content of foliar secretory cavities of *Tagetes erecta* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 75, 1787-1793.
- Salgado, M.A.S., Rezende, A.V., Felfili, J.M., Franco, A.C., Sousa-Silva, J.C., 2001. Crescimento e repartição de biomassa em plântulas de *Copaifera langsdorffii* Desf. Submetidas a diferentes níveis de sombreamento em viveiro. *Brasil Florestal* N° 70.

- Sam, O., Núñez, M., Ruiz-Sánchez, M.C., Dell'Amico, J., Falcón, V., Rosa, M.C.de la, Seoane, J., 2001. Effect of a brassinosteroid analogue and high temperature stress on leaf ultrastructure of *Lycopersicon esculentum*. *Biologia Plantarum* 44 (2), 213-218.
- Sampaio, P.T.B., 2000. Copaíba. In: Clay, W., Sampaio, P.T., Clement, C.R., Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização. Manaus: (INPA), 207-215 p.
- Sartori, A.L.B., Tozzi, A.M.G., 2002. Comparative leaflet anatomy in *Myrocarpus* Allemão, *Myroxylon* L. and *Myrospermum* Jacq. (Leguminosae-Papilionoideae-Sophoreae) species. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140, 249-259.
- Schoettle, A.W., Smith, W.K., 1999. Interrelationships among light, photosynthesis and nitrogen in the crown of mature *Pinus contorta* spp. *latifolia*. *Tree Physiology*. 19, 13–22.
- Shanley, P., Cymeris, M., Galvão, J., 1998. Frutíferas da Mata na Vida Amazônica. Belém: s.n., 91-98 p.
- Sheue, C.R., Yang, Y.P., Kuo-Huang, L. L., 2003. Altitudinal variation of resin ducts in *Pinus taiwanensis* Hayata (Pinaceae) needles. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 44, 305-313.
- Solereder, H., 1908. Systematic anatomy of the dicotyledons. Oxford: Clarendon Press.
- Solla A, Sánchez-Miranda A, Camarero J.J., 2006. Radial-growth and wood anatomical changes in *Abies alba* infected by *Melampsorella caryophyllacearum*: a dendroecological assessment of fungal damage. *Annals of Forest Science* 63, 293–300.
- Swidzinski, J.A., Sweetlove, L.J., Leaver, C.J., 2002. A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 30 (4), 431-446.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2009. Fisiologia vegetal. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 848p.
- Teixeira, S.P., Castro, M.M., Tozzi, A.M.G.A., 2000. Secretory cavities and pellucid dots in leaflets of *Lonchocarpus* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae). *Plant Systematics and Evolution* 221, 61-68.
- Teixeira, S.P., Gabrielli, A.C., 2000. Anatomia do eixo vegetativo de *Dahlstedtia pinnata* (Benth.) Malme e *D. pentaphylla* (Taub.) Burk. (Leguminosae, Papilionoideae). *Revista Brasileira de Botânica* 23, 1-11.
- Teixeira, S.P., Gabrielli, A.C., 2006. Taxonomic value of foliar characters in *Dahlstedtia* Malme – Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae. *Acta Botanica Brasílica* 20, 395-403.
- Teixeira, S.P., Rocha, J.R., 2012. Oil glands in the Neotropical genus *Dahlstedtia* (Leguminosae-Papilionoideae, Millettieae). *Tree* 26, 769–775

- Terzaghi W.B., Cashmore A.R., 1995. Lightregulated transcription. Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology 46, 445–74.
- Thompson, A.R., Vierstra, R.D., 2005. Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. Plant Biology 8, 165–173.
- Tomlin E.S., R.I. Alfaro, J.H., Borden, F. J.H., 1998. Histological response of resistant and susceptible white spruce to simulated white pine weevil damage. Tree Physiology 18, 21–28.
- Trapp, S., Croteau, R.B., 2001. Genomic Organization of Plant Terpene Synthases and Molecular Evolutionary Implications. Genetics 158, 811–832.
- Turner, G., 1986. Comparative development of secretory cavities in the tribes Amorphaeae and Psoraleeae (Leguminosae: Papilionoideae). American Journal of Botany 73, 1178-1192.
- Uheda, E., Nakamura, S., 2000. Abscission of *Azolla* branches induced by ethylene and sodium azide. Plant Cell Physiol 41 (12), 1365-1372.
- Van Doorn, W.G., Woltering, E.J., 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. Trends Plant Science 10, 117–122.
- Van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois P., Hara-Nishimura,I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.A.J., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, E., Zhiotovskiy, B., Bozhkov, P.V., 2011. Morphological classification of plant cell deaths. Cell Death and Differentiation 18, 1241-1246.
- Vani, B., Saradhi, P.P., Mohanty, P., 2001. Characterization of high temperature induced stress impairments in thylakoids of rice seedlings. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 38, 220–229.
- Von Arnim, A., Deng, X., 1996. Light control of seedling development. Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology 47, 215–43.
- Weiga Jr., V.F., Pinto, A.C., 2002. O gênero *Copaifera* L. Química Nova 25, 273-286.
- Wainhouse, D.; Ashburner, R.; Ward, E.; Rose. J. 1998. The effect of variation in light and nitrogen on growth and defence in Young Sitka Spruce. Functional Ecology 12, 561–572.
- Watson, M.L., 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. Journal of Biophysics and Biochemistry Cytology 4, 475.
- Went, F.W., 1953. The effect of temperature on plant growth. In Annual Review of Plant Physiology 4: 347-358. Stanford, California.

- Wimmer, R., Grabner, M., 1997. Effects of climate on vertical resin duct density and radial growth of orway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] *Trees* 11, 271 –276.
- Wimmer, R., Grabner, M., 2000. A comparison of tree-ring features in *Picea abies* as correlated with climate. *IAWA Jour.* 21 (4), 403-416.
- Yamamo, F.; Kozłowski, T.T., 1987. Effect of ethrel on growth and stem anatomy of *Pinus halepensis* seedlings. *IAWA Bull.* 8 (1), 11-19.
- Zamski, E. 1972. Temperature and photoperiodic effects on xylem and vertical resin duct formation in *Pinus halepensis* Mill. *Israel Journal of Botany* 21, 99 – 107.
- Zhang, J.; Huang, W.; Liu, Y.; Pan, Q. Effects of temperature acclimation pretreatment on the ultrastructure of mesophyll cells in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. *Jingxiu*) under cross-temperature stresses. *Journal of Integrative Plant Biology* 47(8), 959-970.
- Zulak, K.G., Bohlmann, J., 2010. Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (1), 86-97.