

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO
DE RESINA EM *Pinus elliottii* ENGELM. -
PAPEL DE MODULADORES
BIOQUÍMICOS**

KELLY CRISTINE DA SILVA RODRIGUES

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como quesito parcial para a obtenção do Título de Doutor

Orientador: Arthur Germano Fett-Neto
Co-orientadora: Amélia T. Henriques

Porto Alegre, 2006

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a um número de pessoas (que tende ao infinito) as quais de diversas formas contribuíram para tornar possível a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, Professor **Arthur Germano Fett-Neto**, pela confiança em mim depositada, orientação incansável a qualquer hora e dia e pelo apoio incondicional em algumas das fases mais difíceis da minha vida. Por esses e outros motivos, eu costumo dizer que ele vale muito mais do que o dobro do seu peso em ouro;

Aos sócios-diretores da ÂMBAR FLORESTAL LTDA., por em conjunto me oferecerem suporte irrestrito às questões profissionais e pessoais, os Srs.:

- **Paulo César Nunes de Azevedo** por me proporcionar a oportunidade impar de participar como profissional das atividades do Setor Florestal ainda tão pouco explorado por biólogos, por suas imensas generosidade e preocupação com a questão social humana, irreverência incomum e espírito de empreendedorismo, mas acima de tudo por ser um grande amigo principalmente na adversidade, sempre muito acessível e disposto a solucionar qualquer problema quando solicitado;
- **Paulo Roberto Azevedo de Azevedo** por sua extrema praticidade e presteza na solução de problemas de sua competência;
- **Telmo Azevedo** por ser sempre muito terno e zelar (ainda que à distância) por minha segurança, saúde e conforto durante o desenvolvimento do trabalho dentro e fora da floresta.

Ao Diretor da ÂMBAR COLOFÔNIAS INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA., o Sr. **Luiz Elody Sobreiro** (o São Luiz), meu anjo-da-guarda desde o início, sempre zelando pelo meu bem-estar, por tudo o que ele representa;

Ao Engenheiro Químico **Pedro Pelissari** da ALLCHEM QUÍMICA, pela disponibilidade, pontualidade e competência na confecção das pastas e na discussão de questões de ordem química;

Ao **André Luis Azevedo de Azevedo**, um super e bem humorado apoio logístico, além de um grande amigo;

A **Maria Inez Azevedo Velho**, pela orientação profissional, conselhos maternos e divisão do quarto em dias de superlotação no Hotel;

Ao Escritório FLOPAL/ÂMBAR em Porto Alegre;

Aos grandes amigos que fiz no Escritório da Âmbar em São José do Norte, **Adriana Moreira** (para todas as festas), **Roberlei** (o "facilitador" das questões financeiras), **Lucimar** (Marzinho para os amigos), **Ana Paula Pinheiro** (sempre rindo.), Seu **João** (sem o qual o escritório "para"), Sr. **Antônio Carlos Machado**, Sr. **Petró** (Central, RG), **Claudemir Totti**; **Patrícia** (do Ministério da Magia), Dona **Gerci** (por todos os chazinhos e atenção especial), **Isabel**, **Adriana**, **Gabi** (a nossa Miss), **Rubilar** (o Binho), **Maciel**, **Juliano** (o Bengala), **Júlio César** (o Buiú), **Claitiane** (Central, RG), **Angélica** (POA), Seu **Eli** (nosso cozinheiro e trovador) pela acolhida carinhosa e consideração comigo sempre;

A **Sílvia Alvorita**, uma amiga especial (e toda a família que eu tive a sorte de conhecer, **Eduardo** e **Lêzinho**), nossos laços serão eternos;

Ao **Álvaro Eduardo Coutinho Rodrigues** (e família, **Duda** e **Leticia**), meu braço direito, meu irmão caucasóide. Muito obrigada por todo cuidado e sincera amizade de sempre, e por me fazerem sentir em casa, mesmo estando longe dela.

Aos meus fiéis escudeiros de pesagem **Jorginho**, **Paulinho**, **Marinho** (Mackmillan), Seu **Telmo**, **Forneira**, Seu **Sidney**, **Magrão**, homens fortes e trabalhadores, rudes, mas surpreendentes em essência, por todo o trabalho braçal e às vezes complicado que fizeram sem reclamar nunca, sempre com muito otimismo, solicitude, disposição e alegria;

Aos estriadores **Claudemir**, Seu **Angelino** (em Mostardas), **Evenilson** e **Abraão** por desempenharem com muita seriedade e competência a tarefa mais importante da realização desse trabalho;

Ao Sr. **Arno Barbosa**, o “**Barbosão**”, o mais desprendido dos homens, nosso generoso Santa Claus, pelo apoio logístico, a gargalhada inconfundível, e o abraço mais apertado;

Ao **Silmar** (escritório de Porto Alegre) e **Edegar** (o Ed do Taim) pelo apoio logístico e amizade;

Aos Capatazes **Edson** (o **Índio**) das Capivaras e esposa Dona **Glacy** por cederem com boa vontade sua casa (e cozinha) nos dias de pesagem, assim como por resolverem os problemas à distância sempre que solicitados, e **Jader** do Gibom, muito prestativo, responsável e competente;

Aos supervisores **Laurício Mortola** (no início), **Paulo Roldão** e **Aloir** pelo auxílio nos experimentos nos sítios Barrancos e Taim, e, em especial, ao supervisor **Nerildo**, sempre solícito, meus olhos e porta-voz nas Capivaras e Gibom, por atender minhas solicitações sempre com prioridade;

A Sra. **Terezinha Nunes de Azevedo** (em Palmares) exímia anfitriã, companhia muito doce e agradável sempre, e ao Seu **Chico** e Dona **Elza** (em Mostardas) por contribuírem de todas as formas para o melhor funcionamento dos experimentos nessa região. Muito obrigada pela generosa acolhida e hospedagem sempre;

Aos Senhores **Ney Azevedo** e **Ivo Azevedo**, os sócios-fundadores da FLOPAL, grandes visionários e empreendedores, por tornarem tudo isso possível;

Ao pessoal do Hotel Atlântico, minha segunda casa nos últimos três anos, em especial ao **Max**, **Vlady**, **Antônio** e **Michele** por tornarem mais agradável minha estada em Rio Grande;

À Professora **Janette Palma-Fett**, conselheira em horas difíceis, sempre indicando uma solução;

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal, em especial a **Joséli Schwambach** (a Schwambinha, para a qual não tem hora ruim p/ auxiliar um amigo), **Denise Russowski** (a Tigra), **Variluska Fragoso** (por cantar sempre, e muito bem) e a **Juli**, grandes e incondicionais amigas, com as quais eu posso contar sempre; e ao meu amigo **Rafa**, que se ainda estivesse por aqui certamente estaria feliz por mim;

Aos amigos do PPGBCM **Sílvia** e **Luciano Saucedo** pelo empenho e extrema eficiência na resolução de dificuldades quando solicitados e sincera amizade;

Às colegas do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em especial a **Fabiana Farias** e à **Miriam Apel** por me receberem muito bem e pelo auxílio na operação do GC-FID durante a análise das amostras;

A minha co-orientadora, Professora **Amélia T. Henriques** por disponibilizar as instalações do seu Laboratório e mão-de-obra qualificada para a operação dos equipamentos;

A CAPES pelo financiamento da bolsa de pesquisa;

A Família **Morais Martins**, que me acolheu na fase de conclusão desse trabalho, tornando minha a sua casa;

A minha avó **Doralícia Marcelina Costa da Silva** pelo zelo desde o início;

Aos meus tios **Paulo José Costa da Silva** e **Rosa Maria Lucas da Silva**, meus pais honorários, pelo apoio inestimável e incondicional sempre - e principalmente- na hora mais difícil;

Aos meus irmãos (biólogos ou não) **Ana Paula da Silva Rodrigues**, **Vinícius de Moraes da Silva Rodrigues**, **Marcello da Silva Rodrigues**, **Vanessa Rodrigues Juchem**, **Daniela Ripoll**, **Lisiane Marin Sebrão**, **Carla** e **Marcelão Almeida**, por me desejarem o melhor e estarem sempre comigo, embora privados da minha companhia na maior parte do tempo;

Aos meus pais **Véra Maria da Silva Rodrigues** (para quem nada é impossível) e **Gilberto Moraes Rodrigues**, exemplos de integridade, altruísmo, amor, força, coragem e dedicação à família, sempre incansáveis na busca de melhores recursos e condições de vida para seus filhos;

Ao **Diego Morais Corrêa**, o melhor e mais generoso homem que já conheci, pelo amor, cuidado e respeito comigo, por compreender a necessidade da minha ausência, e, principalmente por me dar o que tenho de mais precioso, a **Maria Clara**, que ainda está a caminho, mas desde sempre, já é muito amada.

O presente trabalho foi desenvolvido:

Nas instalações da empresa **ÂMBAR FLORESTAL LTDA.**: MOSTARDAS, SÃO JOSÉ DO NORTE/RS

No **LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA VEGETAL** – UFRGS

No **LABORATÓRIO DE FARMACOGNOSIA E CENTRAL ANALÍTICA DA FACULDADE DE FARMÁCIA** - UFRGS

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS:

ÂMBAR FLORESTAL LTDA.
(GRUPO FLOPAL –FLORESTADORA PALMARES)

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR
(CAPES)

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO
(CNPq)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
OBJETIVOS	15
Capítulo 1 - Optimization of oleoresin yield in <i>Pinus elliottii</i> by applying auxin and pathogenesis signaling molecules to wound panels.....	16
Introduction.....	18
Materials and Methods.....	20
Results.....	22
Discussion.....	24
References	28
Conclusões gerais e perspectivas.....	37
Referências.....	40
Anexo 1 - Oleoresin yield of <i>Pinus elliottii</i> plantations in subtropical climate: effect of tree diameter, wound shape and concentration of active adjuvants in resin stimulating paste: artigo aceito para publicação (INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS).....	45
Anexo 2 - Laudo de Análise de Solo.....	65

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Biossíntese de terpenos.....	02
Figura 2. biossíntese de α e β - pineno.....	05
Figura 3. Principais componentes da oleoresina.....	06
Figura 4. Diagrama em Bloco de <i>Pinus strobus</i>	09
Figura 5. <i>Resin tapping</i> : incisão e aplicação da pasta.....	13
Table I. Resin stimulant paste adjuvants.....	33
Figure 1. Seasonal production of oleoresin in trees grown at site B3 treated with commercial paste or plain wounding.....	34
Figure 2. Annual production of oleoresin by trees grown at the B1 site.....	35
Figure 3. Annual production of oleoresin by trees grown at the B1 and C4 sites.	36

RESUMO

A produção de oleoresina (uma complexa mistura de mono, sesqui e diterpenos) por espécies de coníferas é uma resposta de defesa contra ataques por insetos e microrganismos patogênicos. A extração de oleoresina de *Pinus elliottii* é também uma importante atividade econômica, pois seus derivados voláteis, terebintina (mono e sesquiterpenos) e breu ou rosina (diterpenos), encontram diversas aplicações na indústria química e farmacêutica. O processo de extração de oleoresina é baseado na realização de estrias seqüenciais na casca, expondo a interface entre o xilema secundário e o floema. O ferimento ativa a liberação de resina dos ductos resiníferos, sendo aplicada sobre a estria uma pasta comercial estimuladora de resina que contém ácido sulfúrico e um precursor do etileno, os quais favorecem o fluxo do produto. Até o presente estudo, havia escassez de informação sobre a fisiologia da produção de resina em *Pinus* no sul do Brasil. Neste trabalho foi realizada a investigação da produção sazonal de oleoresina por *Pinus elliottii* em diferentes sítios florestais, bem como avaliado o papel de possíveis agentes moduladores da produção de resina, selecionados com base em seu papel fisiológico geral em plantas, para inclusão em pastas estimulantes de resina. Foram monitoradas mais de 5000 árvores. Os resultados mostraram que o desempenho de produção é afetado pela temperatura e condições edáficas, sendo que o melhor rendimento está associado às estações mais quentes e a solos relativamente pobres e/ou temporariamente alagados. A produção de inverno, estação normalmente não incluída no ano de resinagem, no entanto, foi expressiva. Dentre os agentes testados como adjuvantes da pasta estimuladora de resina, destacaram-se auxina (2-4-D), ácido salicílico e extrato de levedura. Em determinadas concentrações e estações do ano estes adjuvantes agregados à pasta foram superiores na capacidade de indução de resina em relação à pasta comercial. Alguns deles (como auxina e ácido salicílico) foram capazes de substituir o precursor de etileno com rendimento de resina equivalente ou superior. Os custos dos adjuvantes de pasta identificados são bastante vantajosos em relação aos atualmente usados. Os resultados indicaram que o componente induzido da resina de *P. elliottii* possui expressiva importância, mostrando que a espécie utilizada não só é componente constitutivo de resina em respostas de defesa.

Introdução

Pinus elliottii Engelm. é uma conífera pertencente à família Pinaceae de gimnospermas, característica pela produção de resina em todos os seus gêneros. Nativa do sudeste dos EUA (Langenheim, 2003), essa espécie, amplamente cultivada em plantações subtropicais do Brasil, Índia e China, é usada na produção de resina e na indústria moveleira.

A resina sintetizada por espécies de coníferas é um exemplo de fonte natural abundante de terpenos. Terpenos são metabólitos secundários derivados biossinteticamente de um composto de 5 carbonos, o isopentenil pirofosfato – **IPP** - (Croteau *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2002; King & Dickinson, 2003; Dudareva *et al.*, 2004) e constituem a maior família de produtos naturais existente, com cerca de 30.000 metabólitos (Norin, 1996; Phillips & Croteau, 1999; Demyttenaere & De Kimpe, 2001; Langenheim, 2003). Os terpenos desempenham importantes funções na planta: atuam na atração de polinizadores e dispersores de sementes (óleos essenciais e carotenóides), na sinalização e defesa contra injúria (compostos antibióticos e fitoalexinas), contra a herbivoria (repelentes), nas interações químicas entre plantas (alelopatia) agindo como fitotoxinas competitivas, atuam também como reguladores de crescimento (giberelinas e ácido abscísico), exercem papel essencial na fotossíntese (pigmentos fotossintéticos como os carotenóides) e são componentes estruturais de membrana (fitoesteróis). Além disso, alguns terpenos constituem metabólitos farmacologicamente importantes como, por exemplo, o agente anti-tumoral *taxol* (Hezari *et al.*, 1995; Croteau *et al.*, 2000; Mahmoud & Croteau, 2002), e outros são extensivamente empregados na indústria química fina de sabores e fragrâncias (Adams *et al.*, 2003; Ancel *et al.*, 2004; Swift, 2004).

A biossíntese de terpenos pode ocorrer pela via clássica do mevalonato (no citosol), ou pela via plastídica (Lange *et al.*, 1998) na qual a DXPS (1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato sintase,

uma enzima da família das transcetolases) forma a unidade básica da biossíntese terpênica - IPP -a partir do piruvato e do gliceraldeído-3-fosfato (Figura 1). Uma vez produzido o IPP, este composto de 5 carbonos sofre isomerização formando dimetil-alil-pirofosfato, e, por sucessivas adições de outras unidades hemiterpênicas (por ação de preniltransferases) e reações de ciclização - mediadas por ciclases (Wagschal *et al.*, 1991), vai gerar as unidades básicas formadoras das diferentes classes de terpenos: geranyl pirofosfato (GPP) - monoterpênicos (C_{10}), geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) - diterpênicos (C_{20}) e tetraterpênicos (C_{40}), todos na via plastídica; farnesil pirofosfato (FPP): sesquiterpênicos (C_{15}) e triterpênicos (C_{30}) na via mevalonato-dependente. Após a formação das unidades terpênicas básicas (acíclicas) até a síntese completa das unidades

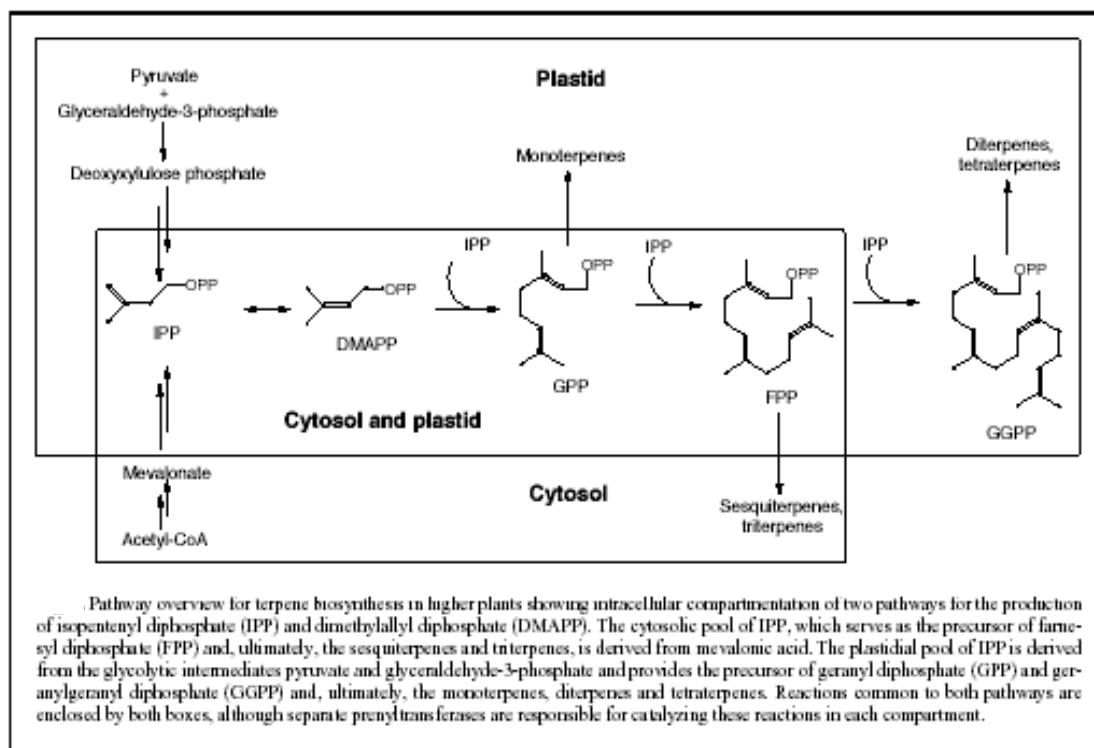


Figura 1. Biossíntese de terpenos (Phillips & Croteau, 1999)

definitivas, ocorrem reações de fusão e acoplamento de unidades (*e. g.* GPP+GPP na síntese de carotenóides), de prenilação adicional e outras reações de modificação responsáveis pelas fases finais da biossíntese de terpenos, como oxidações, metilações e ligações a compostos fenólicos ou lipídicos, por exemplo (Phillips & Croteau, 1999; Trapp & Croteau, 2001; Mahmoud & Croteau, 2002).

Mais de 30 genes que codificam para terpeno-sintases de espécies de coníferas têm sido isolados e caracterizados (Langenheim, 2003), sendo as terpeno-sintases de *Pinus* spp. e principalmente as de *Abies grandis* as enzimas mais amplamente estudadas, em função de sua fácil adaptação em casas de vegetação e por apresentarem produção de oleoresina induzível por ferimento, o que mimetiza a resposta ao ataque por besouros da casca (Katoh & Croteau, 1998; Trapp & Croteau, 2001). As monoterpeno-sintases de *A. grandis* são proteínas solúveis monoméricas, com 50-70 kDa e pH ótimo médio entre 6.8 e 7.8. Requerem um íon metal divalente para catálise (Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Fe^{2+}), têm atividade estimulada por cátions monovalentes (preferencialmente K^+), e apresentam pouca diferença em relação às suas similares, isoladas de espécies de *Pinus* (Trapp & Croteau, 2001), para as quais Mg^{2+} se mostra inefetivo como cofator (Savage *et al.*, 1994). As terpeno-sintases podem sintetizar produtos únicos ou múltiplos, a limoneno-sintase, capaz de produzir limoneno, mirceno, α e β -pineno (Langenheim, 2003), e a felandreno-sintase de *Pinus contorta*, a qual produz α e β -pineno, 3-careno e β -felandreno, são exemplos de enzimas capazes de gerar múltiplos produtos (Savage *et al.*, 1994). A biossíntese de alfa e beta pineno está esquematizada na Figura 2.

A resina das coníferas é composta de turpentina (ou terebintina), a fração volátil mono e sesquiterpênica, e de rosina (ou breu), a fração não-volátil diterpênica (Phillips & Croteau, 1999; Martin *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003). Em *Pinus elliottii* a terebintina é composta

principalmente de α e β -pineno e a rosina por ácidos abiéticos e pimáricos (Langenheim, 2003) (Figura 3).

Tanto a terebintina quanto o breu apresentam grande demanda pelo comércio internacional. A produção mundial de óleo de terebintina em 1995 foi de cerca de 230.000 toneladas, e vem aumentando a cada ano. A terebintina pode ser fracionalmente destilada para gerar seus constituintes majoritários, α e β -pineno em estado puro (Swift, 2004). Monoterpenos, amplamente distribuídos na natureza (com mais de 400 estruturas) e principais componentes da fração volátil da resina de coníferas (Phillips & Croteau, 1999; Mahmoud & Croteau, 2002), constituem adequados substratos precursores, os quais são ideais materiais de partida para a produção biotecnológica de *Aromas Naturais* (Demyttenaere & De Kimpe, 2001), compostos orgânicos voláteis encontrados em alimentos e perfumes, os quais produzem seu caráter organoléptico distintivo (Hagedorn & Kaphammer, 1994). Os aromas terpenóides variam amplamente e incluem o floral, o frutífero (cítrico), o mentolado e o apimentado. Diferentes isômeros de um dado terpenóide podem ter aromas variáveis (King & Dickinson, 2003). Dessa forma, a transformação microbiológica de monoterpenos facilmente disponíveis (presentes em altas concentrações na terebintina, por exemplo) e de baixo custo, como α e β -pineno, têm interesse comercial significativo para a aplicação na indústria de aromatizantes e flavorizantes (Hagedorn & Kaphammer, 1994; Keulen *et al.*, 1998; Yoo *et al.*, 2001; King & Dickinson, 2003), a qual consome aproximadamente 30.000 toneladas de pinenos por ano (Swift, 2004), utilizadas para produzir uma diversa gama de produtos (Lindmark-Henriksson *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2005). A rosina de *Pinus* tem abundante aplicação industrial incluindo a produção de borrachas sintéticas, colas, materiais adesivos, material à prova d'água, tintas de impressora,

revestimentos, revestimentos de papel, emulsificadores de polimerização, entre outros (Stubbs *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 2001).

O significado ecológico da síntese da resina está diretamente relacionado ao mecanismo de defesa da planta contra os insetos predadores da casca e seus fungos patogênicos, agentes

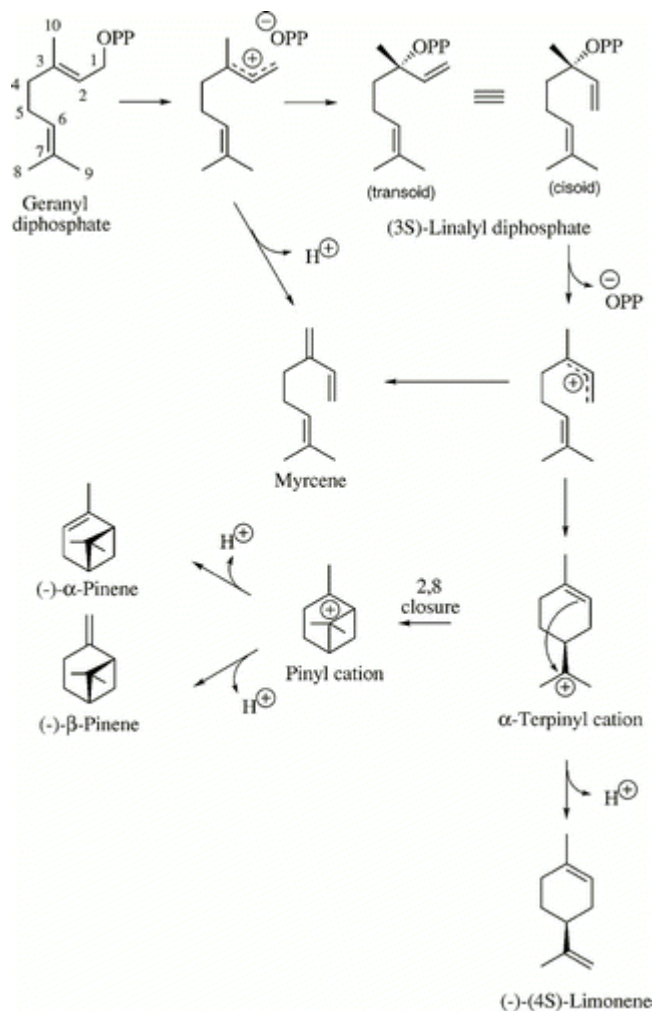


Figura 2. Biossíntese de α e β -pineno (Trapp & Croteau, 2001).

responsáveis pelas principais doenças que afetam as espécies de coníferas. Populações de besouros da casca (Coleoptera: Scolytidae) são muitas vezes as mais importantes e agressivas pestes em florestas de coníferas (Reeve 1997; Phillips & Croteau, 1999; Warren *et al.*, 1999; Strom *et al.*, 2002; Veysey *et al.*, 2003; Wullschleger, *et al.*, 2004). O ciclo de vida dos

besouros da casca começa com a fase de dispersão, quando besouros pioneiros (adultos) abandonam a árvore (morta previamente), escolhem e atacam um novo hospedeiro, utilizando recursos táteis, visuais e principalmente olfativos. Muitas espécies têm habilidade de transformar compostos da terebintina em derivados oxigenados que são empregados como atrativos sexuais ou feromônios de agregação para sinalizar ataque em massa em um hospedeiro selecionado (Norin, 1996; Paine *et al.*, 1997; Raffa, 2001).

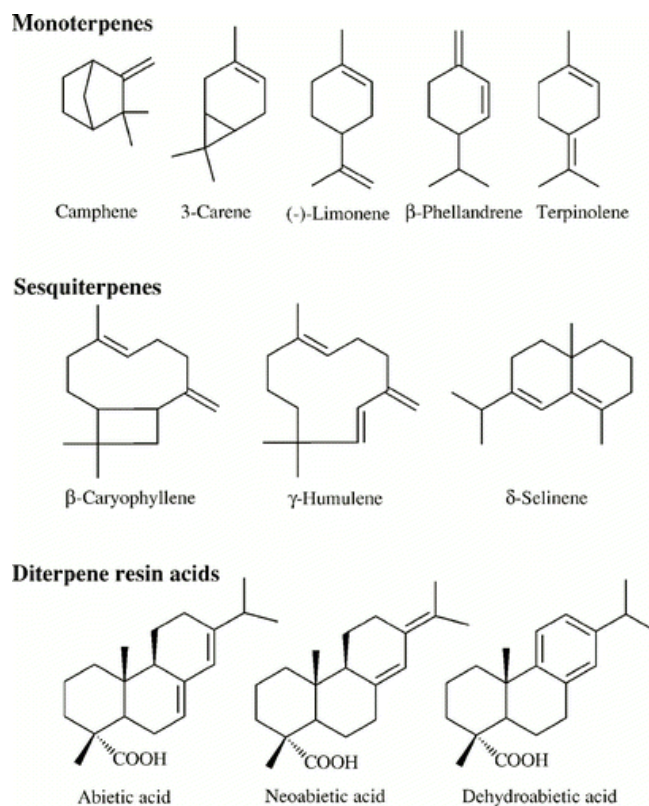


Figura 3. Principais componentes da oleoresina (Phillips & Croteau, 1999).

A partir do estabelecimento do primeiro orifício, galerias vão sendo formadas através do tecido cambial onde os insetos copulam e deixam seus ovos que deverão eclodir e iniciar nova fase de dispersão no tempo determinado. Concomitantemente com a penetração inicial, ocorre a inoculação de fungos patogênicos, geralmente da Classe Ophiostomataceae, para os quais o besouro serve como vetor. A natureza da relação entre fungos e besouros da casca é complexa e

não totalmente entendida (Niemann & Visintini, 2004). Fungos sintetizam carboidratos a partir de compostos retirados da árvore hospedeira que servem como alimento para o inseto, e parecem ser os principais agentes responsáveis pela morte da árvore, através da combinação da produção de toxinas e do crescimento invasivo, o qual gera a obstrução dos elementos de condução do tecido vascular (Paine *et al.*, 1997; Phillips & Croteau, 1999; Trapp & Croteau, 2001) quando o ataque é bem sucedido.

Mecanismos de resistência à invasão por besouros da casca, furadores de madeira e fungos patogênicos em coníferas, incluem a secreção de oleoresina e aumento na síntese de fenólicos em torno da zona do ferimento promovido pela invasão (Hudgins *et al.*, 2004; Hudgins & Franceschi, 2004). Dependendo da espécie, a produção de resina pode ser amplamente constitutiva (resina primária), composta de material produzido e estocado em estruturas secretoras especializadas, ou induzida (resina secundária) como resultado da injúria (Nebeker *et al.*, 1993; Trapp & Croteau, 2001). A casca (periderme e floema secundário) é a primeira linha de defesa contra os organismos invasores do tronco (Hudgins & Franceschi, 2004), juntamente com o sistema de oleoresina constitutiva e a resposta de defesa induzida (Paine *et al.*, 1997; Warren *et al.*, 1999). A oleoresina mobilizada aos sítios de infecção e injúria atua como proteção contra herbívoros e patógenos, em função da sua toxicidade (Katoh & Croteau, 1998; Mahmoud & Croteau, 2002) e ação deterrente (Phillips & Croteau, 1999). Depois da exposição à atmosfera, os compostos voláteis mono- e sequiterpênicos evaporam, enquanto que os ácidos diterpênicos, responsáveis pela viscosidade da resina, polimerizam selando o ferimento (Martin *et al.*, 2004) e aumentando a possibilidade de aprisionamento dos organismos invasores na resina (Langenheim, 2003).

Dependendo da espécie, a biossíntese da oleoresina constitutiva pode ser localizada em ductos resiníferos ou cistos (“blisters”), compostos de células epiteliais que delimitam uma

cavidade central de estocagem (Mahmoud & Croteau, 2002; Martin *et al.*, 2002; Hudgins & Franceschi, 2004). Células de resina espalhadas através do tronco, como as de *Thuja plicata* (Cupressaceae) são os tipos mais simples de estruturas compartimentalizadas contendo resina. *Sequoia sempervirens* (Taxodiaceae) e os abetos verdadeiros como *Abies grandis* (Pinaceae) acumulam resina em cistos (estruturas como bolsas) localizados na madeira e na casca delimitados por uma camada de células epiteliais. Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii*), *Larix occidentalis* e Colorado blue spruce (*Picea pungens*) dispõem de uma rede de passagens constrictas de resina e ductos através do tronco. Espécies de *Pinus* contém a mais elaborada rede interconectada de ductos localizados através da madeira e da casca (Trapp & Croteau, 2001).

Os ductos resiníferos são estruturas alongadas constituídas por células epiteliais que delimitam uma cavidade de paredes não lignificadas (Figura 4). Adjacentes às células epiteliais, ocorrem células relativamente espessas denominadas células da bainha, ricas em substâncias pécicas. Os ductos ocorrem no xilema secundário de *Pinus* e são horizontais (dispostos radialmente) e verticais (Langenheim, 2003). Em *Pinus*, os canais de resina são longos e muitas vezes dispersos em sua distribuição se tornando mais afastados à distância do centro de injúria, e devem ser considerados como sendo (pelo menos em parte) controlados por fatores externos. Auxinas induzem a formação de ductos verticais de resina, assim como promovem o crescimento radial da madeira. A formação de ductos verticais induzidos não inicia imediatamente após a aplicação destes indutores de diferenciação, mas somente cerca de um mês depois, à semelhança com o “*time gap*” verificado entre o início da atividade cambial e a formação do ducto em condições naturais. No primeiro anel de crescimento, os ductos se desenvolvem do câmbio imediatamente após a formação de 0-4 camadas de traqueídeos; o aumento no número de canais se dá por divisão tangencial. Os ductos radiais se localizam

dentro de raios com modelo fusiforme e podem estabelecer conexões com os ductos verticais.

Não existem ductos verticais no floema e conexões entre ductos verticais ocorrem somente no

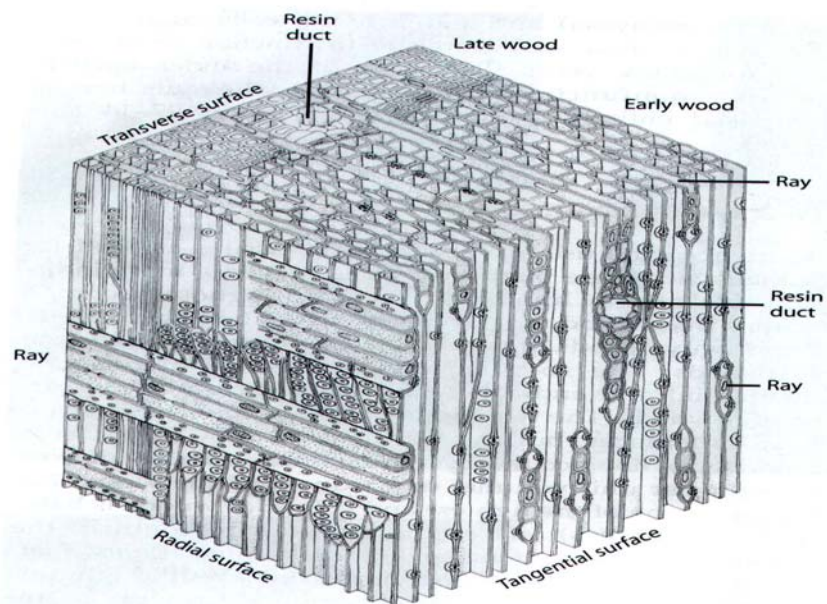


Figura 4. Diagrama em bloco do xilema secundário de *P. strobus* (Raven *et al.*, 1992).

mesmo plano radial (Fahn, 1982; Langenheim, 2003).

Em espécies que carecem de ductos e passagens extensivas de resina estocada (*Abies*, *Tsuga*, *Cedrus*, etc.) a defesa contra a infestação por besouros da casca deve ser baseada na produção de resina induzida, a qual não é realizada por células epiteliais de estruturas secretoras, mas preferencialmente por células de parênquima que circundam o sítio da injúria (Trapp & Croteau, 2001). Abetos que carecem de um sistema de ductos interconectado, ainda

podem formar ductos traumáticos, os quais normalmente estão ausentes em tecidos não injuriados (Hudgins & Franceschi, 2004).

Economicamente, coníferas (particularmente *Pinus* spp.) vêm sendo quimicamente estimuladas para a produção de resina desde a década de 70 (McReynolds & Kossuth, 1982). A extração de resina no Brasil iniciou a partir da década de 80, em florestas de *P. elliottii* implantadas com a utilização dos incentivos fiscais das décadas de 60 e 70. Atualmente, o Brasil juntamente com a Indonésia compõe o segundo lugar em exportação mundial de goma resina, sendo que a China ocupa o primeiro posto nesse ranking (Neves *et al.*, 2001). Em 2005/2006, a produção brasileira de goma resina está estimada em 91000 toneladas, movimentando cerca de 40 milhões de dólares americanos; a maior produção de goma resina ocorre em São Paulo (~50%) e no Rio Grande do Sul (~25%) (www.aresb.com.br, acesso em 25/01/06).

A produção de resina em escala comercial é uma atividade essencialmente extrativista e rentável, em função do alto valor agregado da resina. Fazendas de resinagem constituem grandes extensões de terra com elevado número de árvores em franca atividade resineira. A produção anual média por indivíduo varia de 2,0 a 5,0 Kg, e o valor de mercado de uma tonelada de resina bruta gira em torno de US\$ 300,00 (Coppen & Hone, 1995).

Qualidade e quantidade dos componentes da resina são atributos decisivos na escolha da espécie de *Pinus* para a extração em nível comercial. Os critérios de qualidade do breu são geralmente avaliados segundo padrões utilizados no comércio internacional, mas não definidos como padrões definitivos e/ou obrigatórios. Apesar disso, foram descritos métodos padrões de teste de qualidade de cor de rosina (segundo a escala de cores do Departamento de Agricultura dos EUA, USDA) e “*point of softening*” que usualmente situa-se entre a faixa de 70 e 80°C.

Índices de acidez e de saponificação também são indicativos de qualidade, sendo que, quanto maiores forem os seus valores, melhor a qualidade da rosina (Coppen & Hone, 1995). Segundo a Organização Internacional de Padronização (ISO) as principais propriedades físicas requeridas para a avaliação da terebintina - para fim de utilização como solvente - são a densidade relativa, o índice de refração, a destilação (%v/v), o resíduo de evaporação (%m/m), o resíduo em volume (%v/v), o valor ácido e o “ponto de ignição” (*flash point*) em °C.

A terebintina comprada pela indústria química como fonte de isolamento para subsequente conversão em óleo de pinho, fragrâncias, e compostos aromatizantes, entre outros derivados é avaliada com base na sua composição detalhada, sendo que há maior demanda por aquela que contém conteúdo superior de pineno na sua constituição. *Pinus radiata* possui a maior quantidade (melhor qualidade) de pineno constituinte da turpentina (mais de 95%), mas é muito pobre em termos de rendimento (produção) de resina. Por esse motivo, *P. elliottii*, com a segunda melhor qualidade de terebintina (aproximadamente 90% de pineno) e o segundo melhor rendimento de resina das espécies de *Pinus* estudadas (inferior apenas a *P. caribaea*, com alta quantidade, mas má qualidade de resina) é ampla e preferencialmente cultivado e indicado para a prática da extração em escala comercial (Coppen & Hone, 1995). Dessa forma, embora todos os pinheiros sejam capazes de produzir resina, tanto a qualidade quanto a quantidade da terebintina e do breu podem variar consideravelmente entre as espécies de *Pinus*, em função do componente genético (próprio de cada espécie) que exerce papel importante na determinação da produção e composição da resina.

Além disso, composição e a quantidade da oleoresina pré-formada dependem do status fisiológico da planta, estação sazonal, e condições ambientais. Muitas das respostas induzíveis são um resultado de alterações na expressão gênica que influenciam a regulação bioquímica da

síntese, *turnover*, e transporte de metabólitos secundários. Se a regulação interna é muito forte, respostas induzíveis devem ser amplamente uma função do estímulo ambiental (ferimento) e do genótipo da planta (Lombardero *et al.*, 2000). Para fins comerciais, dependendo da espécie de pinheiro resinada, a quantidade de resina depende de alguns fatores. Os mais importantes incluem irradiância (Peñuelas & Llusà, 1999; Martin *et al.*, 2003), temperatura do ambiente, índice e frequência pluviométrica, diâmetro do tronco e tamanho da copa da árvore, método de extração e duração da estação resineira (Coppen & Hone, 1995; Pio & Valente, 1998). Além disso, diferentes árvores dentro de populações de uma mesma espécie variam quimicamente, sendo que árvores individuais podem variar ao longo das estações em resposta ao estresse ambiental e em função da idade (Brito *et al.*, 1978; Brito *et al.*, 1982; SQCE-ESALQ, 1984; Nebeker *et al.*, 1993; Reeve, 1997; Katoh & Croteau, 1998; Wallin & Raffa, 1999; Lombardero *et al.*, 2000; Raffa, 2001; Niemann & Visintini, 2004; Kim *et al.*, 2005).

A extração comercial de resina é feita no tronco de árvores com crescimento secundário desenvolvido. Em regiões temperadas, a atividade de extração de resina é sazonal e se estende da primavera ao outono em clima mediterrâneo (Pio & Valente, 1998), as chamadas estações de crescimento (McReynolds & Kossuth, 1982). Uma área de aproximadamente 10cm (em Portugal - sistema de face estreita) ou 20-25cm de largura (nos EUA, Brasil e outros países – face ampla) e 2,5-5,0cm de altura de casca é removida (quinzenalmente) de uma face do tronco próxima ao chão (Figura 5). A resina extraída dos canais resiníferos é coletada em diversos tipos de recipientes (sacos plásticos, materiais metálicos) presos com um arame em volta da base do ferimento. Para estimular e manter o fluxo da resina, uma pasta, contendo ácido sulfúrico é aplicada na superfície fresca do ferimento (SQCE, 1984). Além de ácido sulfúrico (entre 40 e 60% originalmente) a pasta pode conter lubrificante (para prevenir a secagem),

emulsificante (para evitar a separação das fases líquida e oleosa) e sílica pirogênica (a qual atua como agente espessante).

Diversos agentes sinalizadores estão envolvidos nos mecanismos de defesa vegetal no processo de produção de resina, tais como etileno, e os clássicos mensageiros secundários ácido jasmônico e, possivelmente, ácido salicílico (Taiz & Zeiger, 2002). Porém, outros fatores (intrínsecos e/ou extrínsecos) podem interagir e determinar alterações quantitativas e/ou qualitativas relevantes para o rendimento de resina. Muitos relatos têm indicado que a síntese de monoterpenos e a produção de etileno estão relacionadas entre si, com a injúria causada pelo ferimento, ou com o dano seguido da inoculação com fungos em espécies de *Pinus* (Lewinsohn



Figura 5. Incisão (A) e aplicação da pasta (B).

et al., 1994; Popp *et al.*, 1995^{a,b}; Hudgins & Franceschi, 2004). Por esse motivo, assim como ácido sulfúrico, o Ethrel (ácido 2-cloro-etil-fosfônico), um composto liberador de etileno (Kalev & Aloni, 1999) tem sido utilizado como componente da pasta estimulante aplicada sobre a estria desde a década de 70 (Capitani, 1982; McReynolds & Kossuth, 1982; Stubbs *et al.*, 1984; SQCE, 1984). Outros compostos, como paraquat um gerador de radicais livres (Stubbs *et al.*, 1984; Taiz & Zeiger, 2002), ácido salicílico, um conhecido mediador da expressão de vários genes relacionados à defesa (Conrath *et al.*, 2002; Hudgins & Franceschi, 2004), e metil-jasmonato (Hudgins & Franceschi, 2004; Hudgins *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004) também têm sido utilizados como elicitores de resposta de defesa em espécies de coníferas.

OBJETIVOS

Tendo em vista o alto valor de mercado atribuído à oleoresina e seus derivados (breu e terebintina), bem como a crescente importância sócio-econômica desta atividade no Brasil, é de interesse buscar a otimização da produção de resina em *Pinus elliottii* var. *elliottii*.

Sendo assim, os objetivos deste projeto foram:

- caracterizar o processo fisiológico de produção de resina por *P. elliottii* Engelm. quanto à variação sazonal de rendimento e composição da resina (componentes voláteis de maior importância semioquímica);
- identificar adjuvantes químicos individuais, com fundamento em conhecimentos fisiológicos, que possam aumentar o rendimento e a qualidade de resina por árvore;
- selecionar adjuvantes que substituam com êxito o componente de custo mais elevado da atual formulação da pasta, ou seja, o precursor de etileno.

A hipótese central de trabalho foi: “É possível modular e otimizar a produção de resina em *Pinus elliottii* por aplicação local no ferimento de co-fatores metálicos de terpeno sintases, co-fatores de ação de etileno, bem como auxinas e sinalizadores de respostas de defesa não octadecanóides?”

CAPÍTULO 1- Artigo a ser submetido à revista Industrial Crops and Products

Optimization of oleoresin yield in *Pinus elliottii* by applying auxin and pathogenesis signaling molecules to wound panels

Running title: PINE RESIN, AUXIN AND PATHOGENESIS SIGNALS

Authors: RODRIGUES, KELLY C.S.^{1,2} AND FETT-NETO, ARTHUR G.^{1*}

¹Centro de Biotecnologia – UFRGS (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular), C.P. 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil; ² Âmbar Florestal Ltda. Rua Ramiro Barcelos, 657 - CEP 96225-000 – São José do Norte, RS, Brazil
Phone: 55 51 3308 7642; FAX: 55 51 3308 7309; E-mail: fettneto@cbiot.ufrgs.br

* to whom correspondence should be addressed at ¹.

ABSTRACT

The extraction of oleoresin from *Pinus elliottii* through the bark streak method of wounding is important for supplying products to the food, pharmaceutical and chemical industries. The year oleoresin weight of approximately 2,660 28-year-old individual trees was monitored in different sites for two different years in southern Brazil. Plain wounding and wounding followed by application of a commercial resin stimulant paste, containing ethylene, were used as reference treatments. Different concentrations of auxin, paraquat, yeast extract and salicylic acid (isolated or in combination with ethylene) were tested in the paste. Higher yields were associated with spring and summer, whereas winter had lower but significant yields. Auxin, yeast extract and salicylic acid stimulated the production of oleoresin. Trees that had lower basal resin yields were more responsive to the treatments. Replacement of ethylene, the most expensive component of the commercial paste, with less costly auxin or salicylic acid yielded equivalent oleoresin production.

Key words: auxin/resin/ salicylic acid/ slash pine/terpene

Introduction

Within the relatively long life span of an individual conifer, there is a large probability that it will be attacked one or more times by herbivores and microorganisms. Pine bark beetles initiate attacks on trees by boring through the outer bark to the phloem-xylem interface and introducing spores of their fungal symbionts into the tree (Popp et al., 1995a; Paine et al., 1997; Veysey et al., 2003; Wullshchleger et al., 2004; Franceschi et al., 2005). In conifers, the expression of many constitutive biochemical defense mechanisms is enhanced following microbial challenge (Luchi et al., 2005; Franceschi et al., 2005). The preformed oleoresin and resin ducts systems are part of the initial defenses encountered by attacking beetles (Veysey et al., 2003; Luchi et al., 2005; Franceschi et al., 2005). After exposure to the atmosphere, the volatile mono- and sesquiterpenes evaporate, whereas the diterpene acids polymerize, sealing the wound (Trapp and Croteau, 2001; Martin et al., 2005).

Maximum resin flow in conifers has been associated with late spring and summer months (FAO, 1995; Pio and Valente, 1998; Kim et al., 2005) or with periods of moderate moisture deficit (Paine et al., 1997; Lombardero et al., 2000; Wallin et al., 2003). Higher mineral nutrient availability in the soil has been related to lower resin yield in *Pinus taeda* (Warren et al., 1999). Oleoresin production has also been elicited by inoculation with pathogenic fungi (Popp et al., 1995a, 1995b; Luchi et al., 2003) and compounds like ethylene (McReynolds and Kossuth, 1982; SQCE, 1984; Popp et al., 1995b) and methyl jasmonate (Franceschi et al. 2002; Martin et al., 2005; Hudgins et al., 2004; Hudgins and Franceschi, 2004). The production of ethylene induced by jasmonic acid upon wounding

appears to be important in terpene biosynthesis and resin flow (Popp et al., 1995b; Hudgins and Franceschi, 2004). Moreover, oxidative stress has also been correlated with oleoresin production; when paraquat, a bipyridylium herbicide, is applied to bole xylem tissue prior to cutting it induces lightwood formation (resin soaking) within the trunk of living pines (Stubbs et al., 1984).

Turpentine (mono and sesquiterpenes) and rosin (diterpenes) are produced from the oleoresin and used in a variety of applications in the chemical, pharmaceutical and food industries (Stubbs et al., 1984; FAO, 1995; Lee et al., 2001). In southern Brazil there are no significant occurrences of conifer bark beetles, favoring the oleoresin tapping activity. Commercial resin tapping from pine trees uses periodic bark streaking and application of resin stimulant paste to the cut, from which flowing oleoresin is harvested in appropriate containers, such as plastic bags attached to the trunk. Commercial stimulant pastes often contain sulphuric acid and ethylene precursor (2-chloroethylphosphonic acid – CEPA) (McReynolds and Kossuth, 1982; Capitani, 1982; SQCE, 1982).

Resin production as a consequence of wounding by insects and attack by fungal pathogens suggests that other factors may be able to modulate resin yield. Salicylic acid (SA), biosynthesized from benzoic acid or isochorismate, has been widely recognized as a signaling molecule involved in the defense of plants attacked by pathogens (Shah, 2003) and, therefore, is a candidate for modulating resin production. Yeast extract was capable of stimulating the activity of monoterpene cyclases in calli of *Abies grandis* (Lee et al., 2001); these enzymes are involved in the production of the major components of oleoresin. Auxins are well known inducers of the production of ethylene (Chae and Kieber, 2005) and have been shown to induce the differentiation of vertical resin canals (Fahn, 1982), both processes that are important for oleoresin flow and accumulation.

In this study, the use of auxin, paraquat, salicylic acid and yeast extract as components of resin stimulant pastes applied in the bark streak method in *Pinus elliottii* var. *elliottii* (slash pine) were analysed. The aim of this investigation was to identify physiological signals capable of eliciting resin production in adult trees of this species under field conditions for potential application in commercial resin tapping management.

Materials and Methods

Plant material and resin tapping operation

Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*) trees (28-years-old), grown in Rio Grande do Sul, city of São José do Norte (approximately 32 degrees S and 52 degrees W) were used in the experiments. The trees had not been tapped for resin prior to the start of the experiments. Resin was tapped from the trees as described by (Pio and Valente, 1998) and using the “bark streak” system of Stubbs et al. (Stubbs et al., 1984). Strips of bark, 2.5 cm wide and 2-5 mm high, were removed every 15 days from approximately one-third of the tree circumference, exposing the sapwood surface. A commercial paste (McReynolds and Kossuth, 1982; Capitani, 1982; SQCE, 1984) containing sulphuric acid and 2-chloroethylphosphonic acid (CEPA – Bayer, SP, Brazil), an ethylene-releasing compound (Kalev and Aloni, 1999), was applied to the fresh wounds to stimulate resin flux and extend the extruding period. This commercial paste (a mixture of pyrogenic silica, emulsifier, and active ingredients 20% sulphuric acid and 4.5% CEPA) was used as positive control for the treatments listed above. A negative control consisted of trees wounded in the same fashion, but without application of paste. The three outermost lines and rows of trees at the borders

of the forest were not used in the experiments to minimize differences in irradiance and wind impact.

Single modifications in the composition of the stimulant resin paste were done by including different concentrations of the synthetic auxin 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D – Sigma, MO, USA) (1, 10 and 100 mM), salicylic acid (1, 10, 100 mM – Rhodia, SP, Brazil), benzoic acid (10 mM – Sigma, MO, USA), yeast extract (water soluble portion of autolyzed yeast – Biobrás, MG, Brazil) (5, 50 and 500 ppm) and paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride – Syngenta, SP, Brazil) (2 % v/v). Paraquat was also tested in three concentrations (0.5, 2 and 4 % v/v) in aqueous solutions sprayed directly on the wounding panel. Salicylic acid and auxin containing pastes were also studied without addition of CEPA in order to determine their capacity to replace the ethylene precursor. All chemicals used in the essays were reagent grade. The treatments and rationale for application are listed in Table I. Fifty trees were tested for each treatment level in the experiments. Each assay was carried out at least in 2 different sites.

After each season (approximately every 90 days), resin flow was harvested in open plastic bags placed at the base of the wounds and weighed on a field digital balance after careful removal of rainwater. The yield of the various seasons for each tree was added to obtain the year yield in the modified paste tests. The experiments involved trees growing at four previously not tapped sites (B1, B3, C4 and C5). Sites B1 and C4 were characterized by better drainage, the latter being located in a higher elevation. Sites B3 and C5 had higher water availability, being partially waterlogged or close to a lake, respectively. Sites of same letter code were within 500 m from each other. Resin biomass was measured beginning in September 2002 and continuing through early April 2005. A total of 2,660 trees were

monitored. All experiments were conducted at ÂMBAR FLORESTAL LTDA. forest installations.

Soil analysis

At site B1 and B3, soil analyses examined the content of clay, water, organic matter, and mineral nutrients. Samples were taken from three depths (30, 60 and 90 cm) in 10 spots per site in late spring 2002. Within each site samples from same depths were combined and analyzed at the Soil Analyses Laboratory, School of Agronomy, UFRGS, following standard methods of soil analyses.

Statistical analyses

Analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey test were used for data evaluation. Data were transformed to log when necessary to fit the ANOVA requirements of variance homogeneity. In every case, a $P \leq 0.05$ was used (Sokal and Rohlf, 1981).

Results

The analysis of seasonal variation in resin yield in site B3 showed that higher yields were observed in summer and spring for trees treated with commercial paste, and in spring for trees that suffered plain wounding without resin stimulant paste application (Figure 1). In autumn and winter, trees under commercial paste treatment displayed lower amounts of resin (Figure 1). Similar results were observed for trees of site B1 (data not shown). Within the time frame of the experiments herein described, no negative

impact on tree vigour (*e.g.* overall growth, needle production and color) was observed in any of the treatments evaluated, independent of their effects on oleoresin yield. Since the overall seasonal oleoresin yield was similar throughout the experiments both with commercial and modified stimulant pastes, further data is expressed as annual yield.

Trees at site B1 treated with paste containing yeast extract and CEPA had slightly increased oleoresin yield (about 0.5 Kg per tree per year), but this increase was not significantly higher than the yield seen for commercial paste (Figure 2A). Trees of site B3 treated with yeast extract and CEPA had lower resin yield compared to the commercial paste control (data not shown).

Initial tests carried out in the spring of 2003 showed that paraquat applied as spray in water (at 0.5, 2 and 4% v/v) with or without CEPA on tree wounds did not result in resin yield improvement relative to the commercial paste; in fact paraquat without CEPA generally yielded lower amounts of oleoresin than the control paste. Paraquat in spray at 0.5, 2 and 4% (v/v) containing CEPA was unable to induce oleoresin yields above those of the control paste-treated trees in site B1 (Figure 2B); the highest concentration had lower resin yield compared to the commercial control. Resin production of trees treated with paraquat at 2% in the stimulant paste with CEPA was generally equivalent to that of the control paste treated trees. The same treatment without CEPA had a similar performance (data not shown). Tests with paraquat in paste in trees of the B3 site yielded similar or lower resin yields compared to commercial paste treated trees.

Site B3 generally showed a better resin yield than B1 across the seasons (*e.g.* 2003/2004 year average for commercial paste in Kg/tree B1 = 3.7, B3 = 4.4; for bark streak only B1 = 2.2, B3=2.6). Since the genetic background and prior history of exploitation were similar across sites, a soil analysis was carried out. Compared to B3, the soil at B1,

with lower resin yield, had higher content of clay and several mineral nutrients (K, Mn, Mg, S, Ca, Cu and Zn), was better drained and contained detectable amounts of aluminum. Site B3, with higher resin yield, was relatively sandy, partially waterlogged, and poorer in content of minerals mentioned above; however, B3 soil had higher content of phosphate and no detectable aluminum.

The inclusion of 10 mM salicylic acid (SA) in the paste containing CEPA increased resin yield of trees from the B1 site (Figure 2C). Similar results were obtained with SA and the SA precursor benzoic acid (BA) at the same concentration in trees of sites C4 and C5 (data not shown). SA was also tested as active adjuvant in stimulant paste devoid of CEPA in trees of sites C4. The SA based-paste was equally effective as the commercial paste (Figure 3A).

Auxin supplementation of CEPA containing paste showed better resin yield in B1 site trees compared to commercial paste (Figure 2D). Auxin (1 ppm) containing paste without CEPA induced resin yield equivalent to control paste (Figure 3B). For trees growing in the B3 site, auxin treatments, both with and without CEPA, generally yielded resin in amounts equivalent to those of the control paste (data not shown).

Discussion

In temperate areas resin tapping is a seasonal activity that is only performed in the growing seasons (McReynolds and Kossuth, 1982; Coppen and Hone, 1995; Pio and Valente, 1998), which also correspond to the time of higher monoterpene emissions in conifers (Kim et al., 2005). In the current study, similar results were obtained; however, in the milder climate of southern Brazil, winter resin represents up to 30% of the annual yield.

Lower temperatures normally lead to a depression in resin yield (Coppen and Hone, 1995; Pio and Valente, 1998), particularly in *P. elliotii* (Brito et al., 1978). In addition, the influence of photoperiod cannot be disregarded since ethylene biosynthesis is induced by light and is circadianly regulated (Chae and Kieber, 2005).

The role of paraquat in oleoresin production is apparently to act as a catalyst by forming oxidizing compounds that disrupt the cellular structure of the living xylem parenchyma cells (Stubbs et al., 1982), maximizing the wound response. The limited effect of paraquat on oleoresin induction in the present experiments may be the result of differences in climate, mobility in the stem and chemical stability under field conditions.

Callus tissue of *Abies grandis* displayed a 7-fold increase in monoterpene synthase activity upon treatment with yeast extract (Lewinsohn et al., 1994). CEPA containing paste supplemented with yeast extract was not significantly effective in improving resin yield of trees at site B1, but had a negative effect on yield of trees at site B3. A possible reason for this distinct effect on sites may be the composition and physical structure of the soil.

Better nutrient availability has been related to lower resin yield in *Pinus taeda* (Warren et al., 1999), presumably due to a diversion of carbon to growth biomass and phenolic compounds instead of terpene accumulation. Competition between growth processes and oleoresin production was reported for *P. taeda* (Lorio and Sommers, 1986). Waterlogged soils are known to increase ethylene production (Grichko and Glick, 2001), which may improve resin yield. Such features probably make trees grown at site B3 overall better for basal resin yield and, therefore, less responsive to stimulant adjuvants. The application of yeast extract in this case may lead to inhibitory concentrations of ethylene and/or the triggering of phenolic-based defenses, draining metabolic resources away from terpene production.

SA supplementation in paste with CEPA was capable of improving resin yield in lower basal yield sites, such as B1. BA also had that capacity. Used in the absence of CEPA, SA showed a resin inducing capacity similar to the CEPA containing control paste. The positive effect of SA is probably related to its role as a signaling molecule of defense in plants, particularly against pathogens, by inducing oxidative stress and the activation of defense-related genes, including those of secondary metabolism (Shah, 2003). Luchi et al. (2005) observed that wounding and/or fungal inoculation increased systemic resin flow in 5-year old *Pinus nigra*. Our results indicate that resin yield of most of the treatments with wounding followed by paste application differ from plain bark streak. Trees of *Pinus taeda* mass inoculated with bark beetle associated fungi had higher resin yields than control trees just wounded to similar extent, indicating that some of the induced resin is produced in response to the presence of the fungi (Klepzig et al., 2005). SA-induced resin production may also result from crosstalk between SA and jasmonate/ethylene regulated defense responses, cooperatively activating jasmonate regulated defense pathways. Positive interactions between SA, ethylene and jasmonate have been reported for pathogen responses, including fungal infections (Rojo et al., 2003). Jasmonate has been closely linked to resin production in gymnosperms, (Erbilgin et al., 2006; Zeneli et al., 2006) perhaps stimulating ethylene biosynthesis in ray parenchyma cells and resin ducts (Hudgins and Franceschi, 2004).

Auxin increases the expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase genes, encoding for a rate-limiting enzyme in ethylene biosynthesis (Song et al., 2005; Chae and Kieber, 2005). The positive effect of paste supplementation with the stable auxin 2,4-D on resin yield of trees could be a result of the induction of ethylene. Trees exposed to auxin containing paste devoid of CEPA were able to yield equivalent or higher

amounts of resin compared to control paste-treated trees. Moreover, the higher impact of auxin treatments in sites of lower basal resin yield may reflect variations in endogenous ethylene concentrations. Auxin may further increase resin yield due to its effect on resin duct differentiation.

This study showed that resin yield in field grown *P. elliottii* adult trees was up-regulated by non-octadecanoid signaling molecules related to pathogen responses, as well as auxin. Of the compounds examined, paraquat and yeast extract were not effective, whereas salicylic acid, and auxin were capable of significantly inducing resin production, particularly in lower yielding sites. Replacement of CEPA by auxin or salicylic acid was effective for oleoresin production, suggesting an interaction between these molecules and ethylene in this process. The possibility of cost reduction in resin stimulating paste production by the replacement of CEPA by these adjuvants without loss of oleoresin yield was also demonstrated.

Acknowledgments

Financial support from Âmbar Florestal Ltda. – São José do Norte – RS - Brazil (grant-in-aid of research) and bursaries from the Brazilian Research Funding Agencies CNPq and CAPES are gratefully acknowledged. The authors thank Álvaro Eduardo Coutinho Rodrigues for support in the field work and M.Sc. Joséli Schwambach for assistance in the statistical analyses.

References

- Brito, J.O., Barrichelo, L.E.G., Couto, H.T.Z., Capitani, L.R., Neves, M.A., 1982. Fast method to estimate the resin production in *Pinus* trees. IPEF: Forest Research Institute ESALQ-USP, Brazil, No148.
- Capitani, L.R. 1982. First results of the ethrel use on resin-tapping of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* at RESA. IPEF: Forest Research Institute ESALQ-USP, Brazil No.147.
- Chae, H.S., Kieber, J.J., 2005., *Eto Brute?* Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. Trends in Plant Science 10, 291-296.
- Coppen, J.J., Hone, G.A., 1995. Gum naval stores: turpentine and rosin from pine resin. (Non-Wood Forest Products 2) 71p. Natural Resources Institute, FAO, Rome.
- Erbilgin, N., Krokene, P., Christiansen, E., Zeneli, G., Gershenzon, J., 2006. Exogenous application of methyl jasmonate elicits defenses in Norway spruce (*Picea abies*) and reduces colonization by the bark beetle *Ips typographus*, Oecologia 148, 426-436.
- Fahn, A., 1982. Plant Anatomy, 3rd ed. Pergamon Press, Oxford, pp. 310-350.
- FAO, 1995. Flavor and fragrances of plant origin. 111p. (Non-Wood Forest Products 1). Natural Resources Institute, FAO, Rome.
- Franceschi, V.R., Krokling, E., Christiansen, E., 2002. Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (Pinaceae) stems induces defense related responses in phloem and xylem, Am. J. Bot. 89, 578-586.
- Franceschi, V.R., Krokene, P., Christiansen, E., Krokling, T., 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests, New Phytol. 167, 353-376.

- Grichko, V.P., Glick, B.R., 2001. Ethylene and flooding stress in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 1-9.
- Hudgins, J.W., Christiansen, E., Franceschi, V.R., 2004. Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. *Tree Physiol.* 24, 251-264.
- Hudgins, J.W., Franceschi, V.R., 2004. Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. *Plant Physiol.* 135, 1-16.
- Kalev, N., Aloni, R., 1999. Role of ethylene and auxin in regenerative differentiation and orientation of tracheids in *Pinus pinea* seedlings. *New Phytol.* 142, 307-313.
- Kim, J-C., Kim, K-J., Kim, D-S., Han, J-S., 2005. Seasonal variations of monoterpene emissions from coniferous trees of different ages in Korea. *Chemosphere* 59, 1685-1696.
- Klepzig, K.D., Robison, D.J., Fowler, G., Minchin, P.R., Hain, F.P., Allen, L., 2005. Effects of mass inoculation on induced oleoresin response in intensively managed loblolly pine. *Tree Physiol.* 25, 681-688.
- Lee, H-J., Ravn, M.M., Coates, R.M., 2001. Synthesis and characterization of abietadiene, levopimaradiene, palustradiene, and neoabietadiene: Hydrocarbon precursors of the abietane diterpene resin acids. *Tetrahedron* 57, 6155-6177.
- Lewinsohn, E., Worden, E., Croteau, R., 1994. Monoterpene cyclases in Grand fir callus cultures: modulation by elicitors and growth regulators. *Phytochemistry* 36 (3), 651-656.
- Lombardero, M.J., Ayres, M.P., Lorio Jr., P.L., Ruel, J.J., 2000. Environmental effects on constitutive and inducible resin defenses of *Pinus taeda*. *Ecol. Lett.* 3, 329-339.

- Lorio, P.J., Sommers, R.A., 1986. Evidence of competition for photosynthates between growth processes and oleoresin synthesis in *Pinus taeda* L., *Tree Physiol.* 2, 301-306.
- Luchi, N., Ma, R., Capretti, P., Bonello, P., 2005. Systemic induction of traumatic resin ducts and resin flow in Austrian pine by wounding and inoculation with *Sphaeropsis sapinea* and *Diplodia scrobiculata*. *Planta* 221, 75-84.
- Martin, D.M., Gershenzon, J., Bohlmann, J., 2003. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant Physiol.* 132, 1586-1599.
- McReynolds, R.D., Kossuth, S.V., 1982. CEPA (2-chloroethylphosphonic acid) In: Sulfuric acid paste increases oleoresin yields. Forest Service, USDA, Southeastern Forest Experiment Station, Asheville.
- Paine, T.D., Raffa, K.F., Harrington, T.C. 1997., Interactions among Scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 179-206.
- Pio, C., Valente, A.A., 1998. Atmospheric fluxes and concentrations of monoterpenes in resin-tapped pine forests. *Atmos. Environ.* 32 (4), 683-691.
- Popp, M.P., Johnson, J.D., Lesney, M.S., 1995a. Characterization of the induced response of slash pine to inoculation with bark vectored fungi. *Tree Physiol.* 15, 619-623.
- Popp, M.P., Johnson, J.D., Lesney, M.S., 1995b. Changes in ethylene production and monoterpene concentration in slash pine and loblolly pine following inoculation with bark beetle vectored fungi. *Tree Physiol.* 15, 807-812.
- Rojo, E., Solano, R., Sánchez-Serrano, J.J., 2003. Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *J. Plant Growth Regul.* 22, 82-98.
- Shah J., 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 365-371.

- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1981. Biometry. W.H. Freeman, San Francisco, 859 pp.
- Song, J-D., Kim, J-H., Lee, D-H., Rhew, T.H., Cho, S.H., Lee, C-H., 2005. Developmental regulation of the expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidase genes in hypocotyls of etiolated mung bean seedlings. *Plant Sci.* 168, 1149-1155.
- SQCE, 1984. Ethephon: Results of first year of resin-tapping in *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Sector of Chemistry, Cellulose and Energy, Silviculture Department – ESALQ- USP, No.7, São Paulo State.
- Stubbs, J., Roberts, D.R., Outcalt, K.W., 1984. Chemical Stimulation of lightwood in southern pines. General Technical Report SE-25. Forest Service, USDA, Southeastern Forest Experiment Station, Asheville.
- Trapp, S., Croteau, R., 2001. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 52, 689-724.
- Veysey, J., Ayres, M.P., Lombardero, M.J., Hofstetter, R.W., Klepzig, K.D., 2003. Relative suitability of Virginia pine and Loblolly pine as host species for *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae). *Environ. Entomol.* 32 (3), 668-679.
- Wallin, K.F., Kolb, T.E., Skov, K.R., Wagner, M.R., 2003. Effects of crown scorch on Ponderosa pine resistance to bark beetles in Northern Arizona. *Environ. Entomol.* 32 (3), 652-661.
- Warren, J.M., Allen, H.L., Booker, F., 1999. Mineral nutrition, resin flow and phloem phytochemistry in loblolly pine. *Tree Physiol.* 19, 655-663.

Wullschleger, S.D., McLaughlin, S.B., Ayres, M.P., 2004. High-resolution analysis of stem increment and sap flow for loblolly pine trees by southern pine beetle. *Can. J. For. Res.* 34, 2387-2393.

Zeneli, G., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T., Gershenzon, J., 2006. Methyl jasmonate treatment of mature Norway spruce (*Picea abies*) trees increases the accumulation of terpenoid resin components and protects against infection by *Ceratocystis polonica*, a bark beetle-associated fungus. *Tree Physiol.* 26, 977-988.

Table I. Resin stimulant paste adjuvants

ADJUVANT	CONCENTRATIONS	SITES TESTED	RATIONALE FOR USE
Salicylic Acid	1.0 – 10.0 and 100.0 mM	B1 and B3 with CEPA in paste	pathogen signaling molecule [28]
	10 mM	C4 and C5 both with and without CEPA in paste	
Benzoic Acid	10 mM	C4 and C5 with CEPA in paste	precursor of salicylic acid [28]
Yeast Extract (for microbiological use)	5, 50 and 500ppm	B1 and B3 with CEPA in paste	simulates pathogen attack; induces monoterpene synthase activity in callus culture [17]
Paraquat (C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂)	2 % (v/v)	B1 and B3 with and without CEPA in paste	ROS generator, namely superoxide; induces lightwood formation [32]
	paraquat at 0.5, 2 and 4%	B1 and B3 sprayed directly on wound with CEPA	
2-4-D (2,4-dichloro phenoxyacetic acid)	1.0 – 10.0 e 100.0 ppm	B1 and B3 with and without CEPA in paste	increases the number of vertical resin ducts [6]; promotes transcription activation of genes involved in ethylene biosynthesis [3]

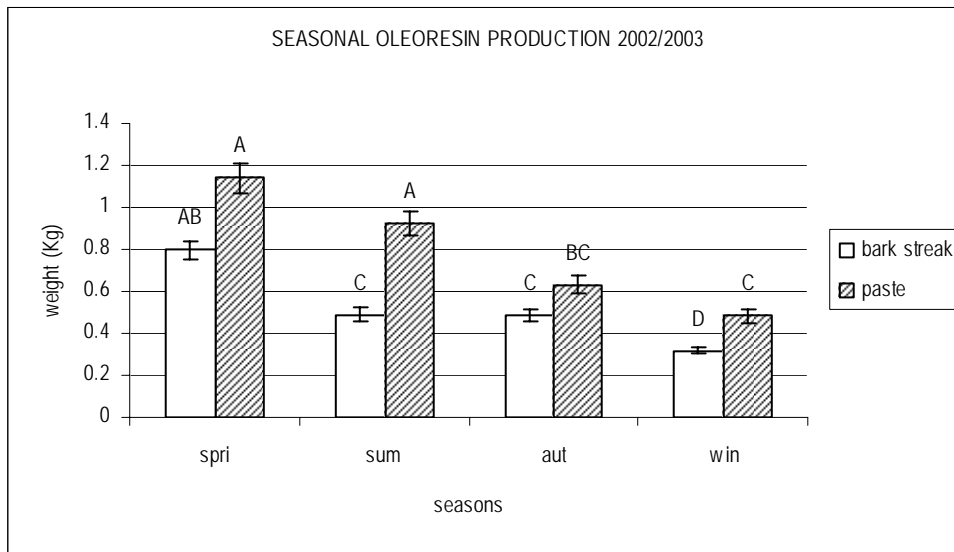


Figure 1. Seasonal production of oleoresin in trees grown at site B3 treated with commercial paste or plain wounding. Bars sharing a letter are not significantly different by Tukey test ($P \leq 0.05$)

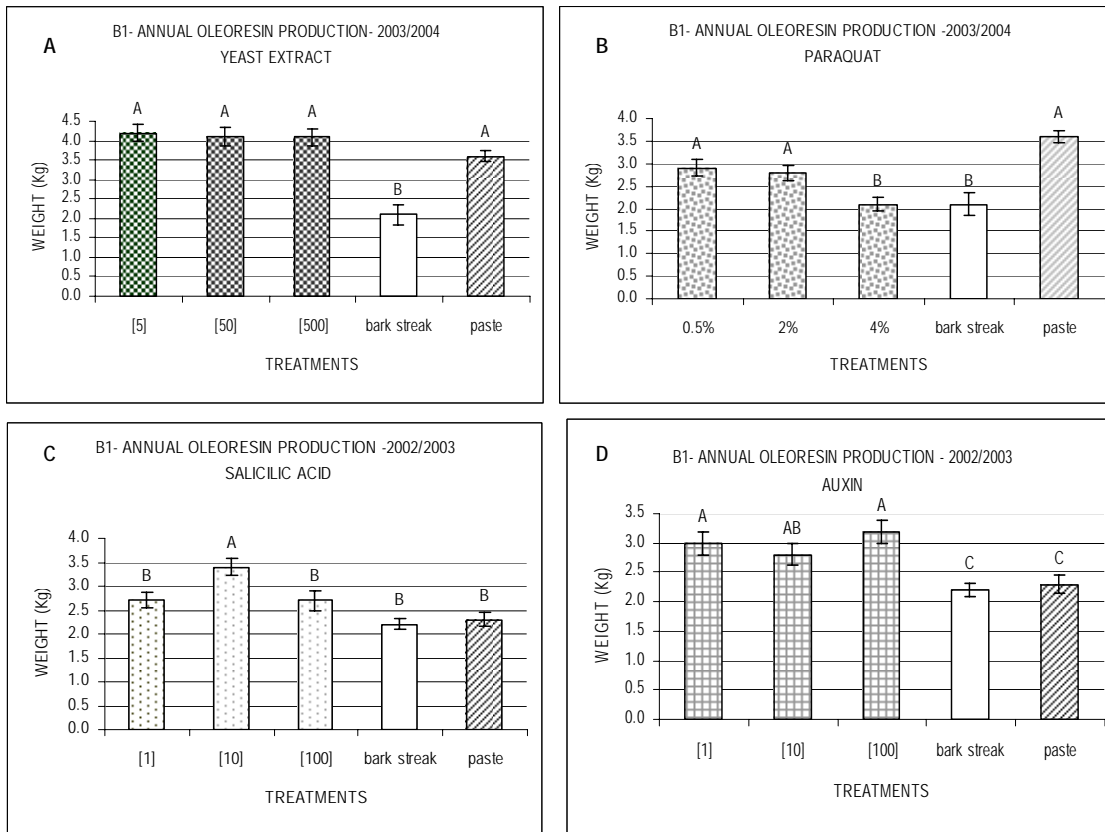


Figure 2. Annual production of oleoresin by trees grown at the B1 site. Numbers under yeast extract and auxin indicate ppm, numbers under SA indicate mM of adjuvant added to paste with the ethylene precursor CEPA. Numbers under Paraquat are % (v/v) of adjuvant in spray with CEPA. Paste = commercial resin stimulating paste. Bark streak = plain wounding. Bars sharing a letter do not differ by a Tukey test ($P \leq 0.05$)

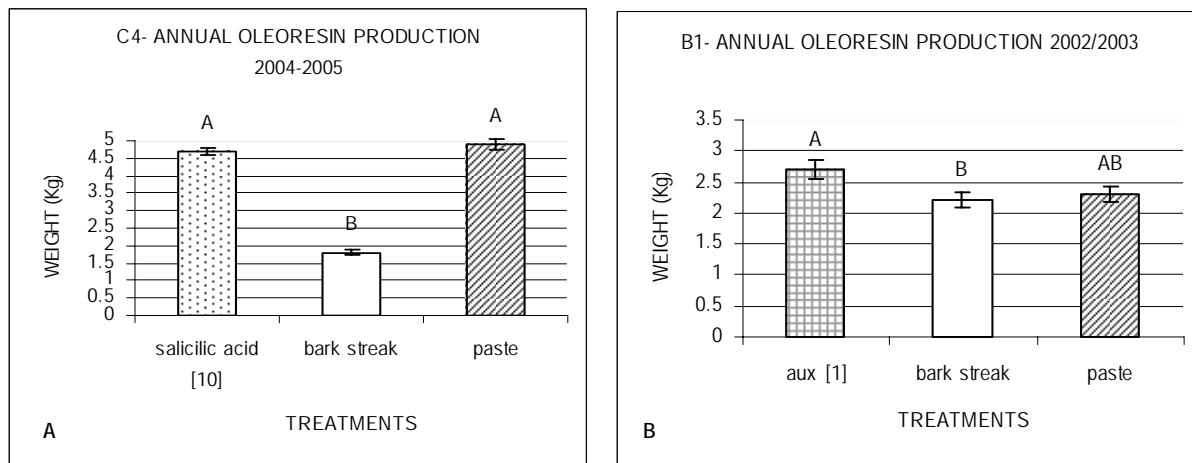


Figure 3. Annual production of oleoresin by trees grown at the B1 and C4 sites. Aux = auxin (2,4-D). Numbers following treatment codes indicate mM (SA), ppm (auxin) of adjuvant added to paste devoid of CEPA. Paste = commercial resin stimulating paste. Bark streak = plain wounding. Bars sharing a letter do not differ by Tukey test ($P \leq 0.05$)

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

De acordo com a literatura, um fator importante que influencia na quantidade de resina a ser sintetizada é a condição climática do local onde os indivíduos se desenvolvem, sendo a mais favorável aquela que não apresente variações bruscas de temperatura e extremos de disponibilidade de água como um período anual de congelamento, por exemplo, condição que limita a prática de resinagem durante o inverno em regiões com estações bem definidas. Por outro lado, nas estações mais quentes (e nos períodos mais quentes do dia) a produção de resina pelas árvores tende a ser maior.

Acerca dos resultados obtidos, foi possível observar que influência da temperatura (na região estudada) e da disponibilidade de água atua de maneira diversa daquela citada para a resinagem em regiões temperadas, e parece depender também das condições edáficas às quais os indivíduos estão submetidos. Regiões de maior alagamento, (B3, por exemplo) não necessariamente são as menos favorecidas em termos de rendimento de resina. Da mesma forma, o inverno (estação na qual comercialmente não ocorre a prática da resinagem) não demonstra ser uma estação limitante na produção de resina, sendo que, dependendo dos índices de déficit hídrico em determinada estação (baixos como no verão de 2004, por exemplo), a produção de inverno pode ser equivalente ou superior a de outra estação mais indicada para a extração de resina, embora tenha sido essa a mais seletiva em termos de resposta aos tratamentos utilizados. As diferenças observadas podem ser em virtude da região da localização dos experimentos e do “micro-clima” gerado pela presença de grandes corpos d’água nas proximidades, os quais possivelmente tornariam as variações de temperatura mais amenas dentro de cada estação.

Embora muitos autores classifiquem o gênero *Pinus* como não passível de ser estimulado quimicamente como os abetos, por exemplo, (a exsudação em *Pinus* seria meramente a da resina constitutiva estocada pela árvore não apresentando mecanismo relevante de resposta à indução com elicitores) os resultados indicam um acréscimo de no mínimo 50% na produção naquelas árvores tratadas quando comparadas com àquelas somente submetidas ao ferimento. Além disso, a indução de resina com os diferentes moduladores/estimulantes químicos da pasta indutora foi superior também à pasta comercial, mesmo no primeiro ano de resinagem, sendo mantidos rendimentos similares pelo menos no ano seguinte. Portanto, conclui-se que, pelo menos em parte, a produção de resina no gênero é substancialmente induzível.

Tendo em vista o alto valor comercial atribuído à resina, é de interesse das indústrias de resinagem o manejo e a seleção dos indivíduos maiores produtores de resina (super resinosos), a fim de propagar seus genótipos aumentando o número de cópias desses indivíduos na população, além de buscar a otimização da produção de resina nesses e em outros indivíduos com menor média anual de produção de resina. Durante a realização do presente estudo foram identificados e selecionados indivíduos com um padrão de rendimento superior na produção de resina (acima da média populacional), para os quais se pretende desenvolver métodos para a propagação clonal (*in vitro* e/ou em casa de vegetação) a partir de testes de propagação clonal por mini-estaquia em casa de vegetação ou micro-propagação *in vitro*, envolvendo essencialmente modificações no metabolismo de auxinas e na nutrição mineral, onde serão avaliados parâmetros de enraizamento e sobrevivência em solo após 6 meses. A partir destes dados de produção de oleoresina e dos indivíduos selecionados, há também interesse em procurar marcadores moleculares ligados à característica de super-resinoso, com vistas ao melhoramento genético do plantel de florestas para exploração de oleoresina.

Além disso, ensaios de resinagem em larga escala e em escala comercial (compreendendo talhões com 250.000 indivíduos) estão sendo implantados para testar ação da melhor pasta selecionada nas diferentes estações (incluindo o inverno), não composta por CEPA, o componente de custo mais elevado na composição atual da pasta comercial, visando a substituição (pelo menos em parte da safra resineira) desse composto na pasta, e assim, uma redução significativa dos custos de produção.

Por fim, análises em coluna quiral da terebintina devem ser realizadas para observar se os tratamentos exercem resposta enantio-seletiva na síntese dos componentes voláteis da resina, gerando novas possibilidades de abordagem e aplicação na indústria química fina farmacêutica e de sabores e fragrâncias. Implicações de química ecológica destas variações devem também ser analisadas, podendo contribuir para maior eficiência no manejo de florestas de *Pinus elliottii*. Da mesma forma, a análise de componentes diterpênicos não voláteis da resina (breu) também deverá ser buscada, pois, apesar de um valor semio-químico relativamente menor nas interações das árvores com insetos, estes componentes também participam das respostas de defesa em *Pinus* e possuem alto valor comercial na indústria química.

REFERÊNCIAS

- Adams, A., Demyttenaere, J., De Kimpe, N. 2003. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)- (-)- limonene to α -terpineol by *Penicillium digitatum* – investigation of the culture conditions. *Food Chemistry* 80:525-534.
- Ancel, J. E., Maksimchuk, N. V., Simakova, I. L., Semikonelov, V. A. 2004. Kinetic peculiarities of α -pinene oxidation by molecular oxygen. *Applied Catalysis A: General* 272: 109-114.
- Brito, J. O.; Barrichelo, L. E. G.; Couto, H. T. Z.; Capitani, L. R.; Neves, M. A. 1982. Método rápido para estimar a produção de resina em árvores de *Pinus*. IPEF: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais; ESALQ-USP. Circular técnica n°148.
- Brito, J. O.; Barrichelo, L. E. G.; Gutierrez, L. E.; Trevisan, J. F. 1978. Resina de *Pinus* implantadas no Brasil: resinagem e qualidade de resinas de pinheiros tropicais: comparações entre espécies e época de resinagem. IPEF: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais; ESALQ-USP. Circular técnica n°35.
- Capitani, L. R. 1982. Primeiros resultados do uso do ethrel na resinagem de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* na Reflorestadora Sacramento “RESA” LTDA. IPEF: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais; ESALQ-USP. Circular técnica n°147.
- Conrath, U.; Pieterse, C. M. J.; Mauch-Mani, B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, vol. 7, n° 5, 210-216.
- Coppen, J. J. W. & Hone, G.A. 1995. Gum naval stores: turpentine and rosin from pine resin. *Non-Wood Forest Products 2*. Natural Resources Institute, FAO, Rome.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N.G. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W. & JONES, R. L. (org.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, ASPP, Rockville, p.1251-1268.
- Demyttenaere, J. & De Kimpe, N. 2001. Biotransformation of terpenes by fungi study of the pathways involved. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11:265-270.
- Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, G. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135: 1893-1902.
- Fahn, A. 1982. *Plant Anatomy*, 3rd edition, Pergamon Press, Oxford, p. 310-350.
- Hagedorn, S. & Kaphammer, B. 1994. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:773-800.

Hagedorn, S. & Kaphammer, B. 1994. Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:773-800.

Hezari, M.; Lewis, N. G. & Croteau, R. 1995. Purification and characterization of tax-4(5), 11(12)-diene synthase from Pacific Yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 322 n°2:437-444.

Hudgins, J. W.; Christiansen, E.; Franceschi, V. R. 2004. Induction of anatomically based defense responses in stems of diverse conifers by methyl jasmonate: a phylogenetic perspective. *Tree Physiology*, 24: 251-264.

Hudgins, J. W. & Franceschi, V. R. 2004. Methyl jasmonate-induced ethylene production is responsible for conifer phloem defense responses and reprogramming of stem cambial zone for traumatic resin duct formation. *Plant Physiology*, 135: 1-16.

Kalev, N. & Aloni, R. 1999. Role of ethylene and auxin in regenerative differentiation and orientation of tracheids in *Pinus pinea* seedlings. *New Phytol.*, 142, 307-313.

Katoh, S. & Croteau, R. 1998. Individual variation in constitutive and induced monoterpene biosynthesis in Grand fir. *Phytochemistry*, 47, n°4, 577-582.

Keulen, F., Correia, C. N., Fonseca, M. M. R. 1998. Solvent selection for the biotransformation of terpenes by *Pseudomonas putida*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5:295-299.

Kim, J-C.; Kim, K-J.; Kim, D-S.; Han, J-S. 2005. Seasonal variations of monoterpene emissions from coniferous trees of different ages in Korea. *Chemosphere*, 59:1685-1696.

King, A. J. & Dickinson, J. R. 2003. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and large yeasts. *FEMS Yeast Research* 3:53-62.

Lange, B. M., Wildung, M.R., McCaskill, D., Croteau, R. 1998. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2100-2104.

Langenheim, J. 2003. *Plant Resins: Chemical Evolution Ecology Ethnobotany*. Oregon: Timber Press, Inc., 2003. 586pp.

Lee, H., Ravn, M. & Coates, R. M. 2001. Synthesis and characterization of abietadiene, levopimaradiene, palustradiene, and neoabietadiene: hydrocarbon precursors of the abietane diterpene resin acids. *Tetrahedron*, 57: 6155-6157.

Lewinsohn, E.; Worden, E.; Croteau, R. 1994. Monoterpene cyclases in grand fir callus cultures: modulation by elicitors and growth regulators. *Phytochemistry*, vol. 36, n°3, 651-656.

- Lindmark-Henriksson, M., Isaksson, D., Sjödin, K., Högberg, H., Vaňek, T., Valterová, I. 2003. Transformation of α -pinene using *Picea abies* suspension culture. *J. Nat. Prod.* 66:337-343.
- Lombardero, M. J.; Ayres, M. P.; Lorio Jr., P. L.; Ruel, J. J. 2000. Environmental effects on constitutive and inducible resin defenses of *Pinus taeda*. *Ecology letters*, 3:329-339.
- Mahmoud, S. S. & Croteau, R. B. 2002. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, vol. 7, n°8, 366-373.
- Martin, D. M.; Gershenzon, J.; Bohlmann, J. 2003. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant Physiology*, 132:1586-1599.
- Martin, D., Tholl, D., Gershenzon, J. and Bohlmann, J. 2002. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway Spruce stems. *Plant Physiol.* 129:1003-1018.
- McReynolds, R. D. & Kossuth, S. V. 1982. CEPA (2-chloroethylphosphonic acid) in sulphuric acid paste increases oleoresin yields. Forest Service, United States Department of Agriculture, Southeastern Forest Experiment Station, Olustee, FL, U.S.A. 32072.
- Neves, G. A.; Martins, C. A.; Miyasava, J.; Moura, A. F. 2001. Análise econômico-financeira da exploração de *Pinus resinífero* em pequenos módulos rurais. Monografia de Especialização em Agrobusiness/ MBA, USP-São Paulo 48pp.
- Nebeker, T. E.; Hodges, J. D.; Blanche, C. A. 1993. Host response to bark beetle and pathogen colonization. In: Schowalter, T. D. and Filip, G. M. (eds.) *Beetle-Pathogen Interactions in Conifer forests*. Academic Press Inc. Copyright. Pp. 157-169.
- Niemann, K. O. & Visintini, F. 2004. Assessment of potential for remote sensing detection of bark beetle-infested areas during green attack: a literature review. Mountain Pine Beetle Initiative, working paper 2005-2. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Pacific Forestry Centre, Department of Geography, University of Victoria, Victoria, B.C.
- Norin, T. 1996. Chiral chemodiversity and its role for biological activity. Some observations from studies on insect/ insect and insect/plant relationships. *Pure and Appl. Chem.* Vol. 68 n. 11:2043-2049.
- Paine, T. D.; Raffa, K. F.; Harrington, T. C. 1997. Interactions among Scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annu. Rev. Entomol.*, 42:179-206.
- Peñuelas, J. & Llusà, J. 1999. Short-term responses of terpene emission rates to experimental changes of PFD in *Pinus halepensis* and *Quercus ilex* in summer field conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 42: 61-68.

- Phillips, M. A. & Croteau, R. 1999. Resin-based defenses in conifers. *Trends in Plant Science*. Vol 4 n° 5, 184-190.
- Pio, C. A., Valente, A. 1998. Atmospheric Fluxes and Concentrations of Monoterpenes in Resin- Tapped Pine Forests. *Atmospheric Environment*. Vol. 32 n°4, 683-691.
- Popp, M. P.; Johnson, J. D.; Lesney, M. S. 1995^a. Changes in ethylene production and monoterpene concentration in slash pine and loblolly pine following inoculation with bark beetle vectored fungi. *Tree Physiology*, 15:807-812.
- Popp, M. P.; Johnson, J. D.; Lesney, M. S. 1995^b. Characterization of the induced response of slash pine to inoculation with bark vectored fungi. *Tree Physiology*, 15:619-623.
- Raffa, K. F. 2001. Mixed message across multiple trophic levels: the ecology of bark beetle chemical communication systems. *Chemoecology*, 11:49-65.
- Raven, P., H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. 1992. *Biologia Vegetal*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 728p..
- Reeve, J. D. 1997. Predation and bark beetle dynamics. *Oecologia*, 112: 48-54.
- Savage, T. J.; Hatch, M. W. & Croteau, R. 1994. Monoterpene synthases of *Pinus contorta* and related conifers: a new class of terpenoid cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, n°6:4012-4020.
- Serra, S., Fuganti, C., Brenna, E. 2005. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology* vol. 23 n. 4.
- SQCE, 1984. Ethephon: Resultados do primeiro ano de resinagem em *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Setor de Química, Celulose e Energia, Departamento de Silvicultura – ESALQ-USP, Circular técnica n°7.
- Strom, B. L. Goyer, R. A. Ingram Jr., L. L. Boyd, G. D. L.; Lott, L. H. 2002. Oleoresin characteristics of progeny of loblolly pines that escaped attack by the southern pine beetle. *Forest Ecology and Management*, 158:169-178.
- Stubbs, J.; Roberts, D. R.; Outcalt, K. W. 1984. Chemical Stimulation of lightwood in southern pines. General Technical Report SE-25. United States Department of Agriculture, Forest Service, Southeastern Forest Experiment Station, Asheville, North Carolina.
- Swift, K. A. D. 2004. Catalytic transformation of the major terpene feedstocks. *Topics in Catalysis*. Vol. 27 n. 1-4:143-155.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*, 3rd edition, Sunderland, Sinauer, 2002, 690p.

- Trapp, S. & Croteau, R. 2001. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 52:689-724.
- Veysey, J.; Ayres, M. P.; Lombardero, M. J.; Hofstetter, R. W.; Klepzig, K. D. 2003. Relative suitability of Virginia pine and Loblolly pine as host species for *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae). *Environ. Entomol.*, 32(3): 668-679.
- Wagschal, K.; Savage, T. J. Croteau, R. 1991. Isotopically sensitive branching as a tool for evaluating multiple product formation by monoterpene cyclases. *Tetrahedron*, vol., 47, n°31, 5933-5944.
- Wallin, K. F & Raffa, K. F. 1999. Altered constitutive and inducible phloem monoterpenes following natural defoliation of jack pine: implications to host mediated interguild interactions and plant defense theories. *Journal of Chemical Ecology*, 25, n°4, 861-880.
- Warren, J. M.; Allen, H. L.; Booker, F. 1999. Mineral nutrition, resin flow and phloem phytochemistry in loblolly pine. *Tree Physiology*, 19: 655-663.
- Wullschleger, S. D.; McLaughlin, S. B. Ayres, M. P. 2004. High-resolution analysis of stem increment and sap flow for loblolly pine trees by southern pine beetle. *Can. J. For. Res.* 34:2387-2393.
- Yoo, S. K., Day, D. F., Cadwallader, K. R. 2001. Bioconversion of α - and β -pinene by *Pseudomonas* sp. Strain PIN. *Process Biochemistry* 36: 925-932.

ANEXO 1- artigo aceito para publicação (INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS)

Oleoresin yield of *Pinus elliottii* plantations in subtropical climate: effect of tree diameter, wound shape and concentration of active adjuvants in resin stimulating paste

Authors: RODRIGUES, K.C.S.^{1,2}, AZEVEDO, P.C.N.², SOBREIRO, L. E.² PELISSARI, P.², AND FETT-NETO, A.G.^{1*}

¹Centro de Biotecnologia – UFRGS (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular), C.P. 15005, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil; ² Âmbar Florestal Ltda. Rua 24 de Outubro, 1557 - 2º andar - Conj. 501 - CEP 90510-003 - Porto Alegre, RS, Brazil
Phone: 55 51 3308 7642; FAX: 55 51 3308 7309; E-mail: fettneto@cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT

The production of oleoresin from *Pinus* trees is a relevant economic activity in developing countries, since it provides terpenes used in the chemical industry. The oleoresin production by trees of *Pinus elliottii* in southern Brazil was investigated. Trees of approximately 28 years of age were individually analyzed for oleoresin yield using the bark streak method of wounding for resin tapping. Plain wounding and wounding followed by application of commercial resin stimulant paste, composed of an ethylene precursor (CEPA) and sulphuric acid, were used as reference treatments. The optimum concentrations of CEPA and sulphuric acid in the stimulant paste were investigated in relation to oleoresin yield, as well as the shape of wound and tree diameter. The replacement of CEPA with auxin in the resin stimulant paste was also evaluated. The results showed that both horizontal and V-shaped streaks are equivalent for oleoresin yield. Trees with larger diameter at breast height, defined as the trunk diameter 1.4 m above the ground, (22-23.5 cm) yielded more oleoresin than their smaller counterparts (18-19.5 cm). Oleoresin yield was equivalent with stimulant pastes containing between 1.5 and 4.5% CEPA. Trees exposed to stimulant pastes containing from 3 to 4.5% CEPA had average year oleoresin yield above 5 Kg. The use of 20% sulphuric acid in the stimulant paste resulted in higher oleoresin yields. Auxin (2,4-D at 1mM) was effective in replacing CEPA in the stimulant paste, particularly in smaller DBH trees or after one year of application in larger DBH individuals. In conclusion, cost reductions on the resin tapping operation can be achieved by adjusting stimulant paste components and managing subsets of trees in specific fashion based on DBH ranges.

Key words: oleoresin, slash pine, auxin, ethylene, tree diameter, wound shape

1. Introduction

Pine tree tapping for oleoresin is a relevant activity, particularly in developing countries, with both economic and social benefits (Coppen and Hone, 1995). From the oleoresin, turpentine (mono and sesquiterpenes) and rosin (diterpenes) are produced. These products are used in solvents, cleaning agents for paints and varnishes, production of flavor and fragrances in the pharmaceutical and food industry, perfume, disinfectants, synthetic rubber, coatings, paper sizing, polymerization emulsifiers, adhesive tackifiers, printing ink resins, and waterproofing material (Stubbs et al., 1984; Coppen and Hone, 1995; FAO, 1995; Lee et al., 2001; Kelkar et al., 2006).

China is the leading producer of rosin in the world. The rosin industry involves more than 250,000 people, and covers most provinces in southern China, where many pine species (including *Pinus massoniana*, *P. elliottii*, *P. kesiya* and *P. yunannensis*) have been established for resin tapping (Wang et al., 2006).

Brazil has large extensions of pine forest plantations (7 million ha in 1994-1995), which yield resin (60,000 – 65, 000 t per year in the mid 1990s), rosin (36,000 t per year in 1987-89) and gum turpentine (8,000 t per year in 1987-89) besides wood products (FAO, 1999). In 2006-2007, the oleoresin production in Brazil was approximately 106,000 tons, sold at an average price of US\$ 530.00 per ton; the state of Rio Grande do Sul contributed 19,600 tons produced by forests of *P. elliottii* (ARESB, 2007). In southern Brazil, there are no significant occurrences of conifer bark beetles, favoring the oleoresin tapping activity. Current commercial resin tapping from pine trees at this location uses periodic bark streaking

and application of resin stimulant paste to the cut, from which oleoresin is harvested in appropriate containers, such as plastic bags attached to the trunk.

Most of the commercial stimulant pastes have two chemically active components, sulphuric acid and an ethylene precursor (2-chloroethylphosphonic acid – CEPA) (McReynolds and Kossuth, 1982), which are applied to the exposed fresh surface, to increase resin flux and to extend the extruding period. The extrusion of resin peaks immediately after the cutting, decreasing with time (Capitani, 1982; SQCE, 1984; Pio and Valente, 1998). The most expensive component of the resin stimulant paste is CEPA and the rational use of this adjuvant or its replacement by cheaper alternatives are sought by the Brazilian oleoresin industry. Auxins are phytohormones well known for inducing the production of ethylene (Chae and Kieber, 2005); in addition, auxin has been shown to induce the differentiation of vertical resins canals (Fahn, 1982).

Oleoresin production is essentially a defense response of the tree; the preformed oleoresin and resin duct systems are part of the initial defenses encountered by bark beetles and other herbivores (Trapp and Croteau, 2001). After exposure to the atmosphere, the volatile mono- and sesquiterpenes evaporate, whereas the diterpene acids polymerize, sealing the wound. Members of the Pinaceae, with complex resin duct systems, are often regarded as relying primarily on stored oleoresin (Trapp and Croteau, 2001).

For commercial purposes, depending on the species being tapped, the quantity of resin that can be obtained from a particular group of trees may be influenced by a number of factors. Environmental factors such as light, temperature and moisture status can greatly affect the emission of volatiles and the resin yield (Peñuelas and Lusià, 1999; Martin et al., 2003; Dudareva et al., 2004). In grand fir (*Abies grandis*), for example, light and water

stresses greatly reduce the constitutive level of monoterpene cyclase activity and abolish the wound-induced response (Lewinsohn et al., 1994). Monoterpene emission rates in slash pine (*Pinus elliottii*) are not influenced directly by light, but increase exponentially with temperature (Tingey et al., 1980).

Besides, diameter and crown size of the tree, method of tapping and length of tapping season can influence the yields obtained (Coppen and Hone, 1995). In temperate zones, this activity is clearly seasonal and extends from spring to autumn, the seasons of highest growth (McReynolds and Kossuth, 1982; Pio and Valente, 1998). This practice is often followed in subtropical climates of southern Brazil.

Commercial resin tapping is normally carried out on the trunk of fully-grown trees. However, the DBH (diameter at breast height) tapping limit can differ. In China, trees start to be tapped when their DBHs reach 20cm. In other countries, the limit is 20-25cm (Coppen and Hone, 1995; Wang et al., 2006).

Tapping periodicity and stimulant application are variable too. At some locations in China, re-wound time is 10 days and no stimulant paste is applied on the wound (Wang et al., 2006), albeit in some species of *Pinus*, studies showed that wounding alone led to a lower increase in monoterpene level when compared with those treated with elicitors (Croteau et al., 1987).

In this study, we investigated both paste and tree factors affecting the oleoresin yield obtained by the bark streak method in *Pinus elliottii* var. *elliottii* (slash pine) forests of southern Brazil. Aiming at the improvement and increased efficiency of the pine tapping activity, oleoresin yield was evaluated with various concentrations of sulphuric acid and CEPA in the resin stimulant paste, as well as with the use of auxin to replace CEPA.

Moreover, the effects of DBH and wound-shape on oleoresin production from this species were also examined.

2. Material and methods

2.1 Resin tapping operation

Experiments were carried out with 28 year-old slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*) trees, grown in Rio Grande do Sul (southernmost state of Brazil), city of São José do Norte (approximately 32 degrees of south latitude and 52 degrees of west longitude). The forest used in the study had not been tapped for resin prior to the experiments. The resin tapping operation was done according to Pio and Valente (1998) using the “bark streak” system (Stubs et al., 1984). Strips of bark, 2.5 cm wide and 2-5 mm high, were removed every 15 days from approximately one-third of the tree circumference, exposing the sapwood surface.

A commercial paste (McReynolds and Kossuth, 1982) containing sulphuric acid (reagent grade) and 2-chloroethylphosphonic acid (CEPA – Bayer, SP, Brazil), an ethylene-releasing compound, was applied to the fresh wounds to stimulate resin flux and extend the extruding period. Paste and its variants were manufactured by Alchem Rio Grande, RS, Brazil. This commercial paste (a mixture of pyrogenic silica, emulsifier, and active ingredients 20% sulphuric acid and 4.5% CEPA) applied to V-shaped wounds was used as a positive control for the experiments. For most experiments, a negative control consisting of trees wounded in the same fashion, but without application of paste was included. In all

assays, the three outermost lines and rows of trees at the borders of the forest were not used in the experiments to minimize differences in irradiance and wind impact.

After each season (spring – september to november, summer – december to february, fall - march to may, approximately 90 days each), resin flow was harvested in open plastic bags placed at the base of the wounds and weighed on a field digital balance after careful removal of rain water by decantation. The yield of the various seasons for each tree, including the winter (june to august) in the CEPA and sulphuric acid experiments, was added to obtain the average yearly yield of each treatment. The experiments with wound shape, DBH and auxin were carried out for two consecutive years. In all of the experiments, for each treatment 50 replicates (individual trees) were sampled.

2.2 Treatments

The effect of wound shape, V-shaped versus horizontal, was investigated in trees with and without paste application. The effect of DBH was analyzed in trees of two ranges of diameter, 18-19.5 and 22-23.5 cm, using the V-shaped wounding with and without paste application. A test paste with sulphuric acid (20%) and 1 mM 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, Sigma, Saint Louis, USA) without CEPA was evaluated in V-shaped wounded trees of the two diameter ranges for two consecutive years compared to the corresponding positive control.

A range of concentrations of sulphuric acid in the stimulant paste (0, 2.5, 5, 10, 15 and 20 % w/w) was examined in relation to oleoresin yield. All other paste components were

kept constant. Concentrations of CEPA (0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 % w/w) were also evaluated in a similar setting.

2.3 Statistical analyses

Analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey test were used for data evaluation to indicate significance. Data were transformed to log when necessary to fit the ANOVA requirements of variance homogeneity. Otherwise, non-parametric Welch ANOVA was applied followed by Dunnett's C. In every case, a $P \leq 0.05$ was used (Sokal and Rohlf, 1981).

3. Results

Oleoresin yield in paste treated trees was not significantly affected by the shape of the wound (Fig.1). Both V-shaped and horizontal streaks yielded similar amounts of resin. In the first year of tapping, trees not treated with paste and wounded by horizontal streaks had slightly higher oleoresin production compared to those wounded with vertical streaks (Fig. 1a). However, in the second year this difference was no longer observed (Fig. 1b).

The use of stimulant paste increased oleoresin production to a similar extent in trees treated with both wound patterns. The application of paste promoted resin yield especially in the first year of tapping (Fig. 1a). The resin yield of trees not treated with paste was similar in both years (Fig. 1).

Oleoresin yield was significantly higher in paste-treated trees with larger DBH, compared to that of smaller DBH trees treated in the same fashion. Higher yields were also observed for larger DBH trees not treated with paste (Fig. 2). This pattern was consistently

observed in both years. Once again, although the use of paste promoted resin yield in both years evaluated, more pronounced effects were seen in the first year, whereas trees not exposed to paste displayed equivalent resin yields in both years.

The association of higher oleoresin production with larger DBH was also seen in the second year of the experiment in which the replacement of CEPA with 2,4-D was analyzed. Larger DBH trees treated with both CEPA or 2,4-D-based pastes had higher oleoresin yield (Fig. 3b). However, this was not seen for trees treated with 2,4-D-based paste in the first year (Fig. 3 a). In this case, smaller DBH trees had higher oleoresin yield. In comparison to similar trees treated with CEPA-based paste, larger DBH trees treated with 2,4-D-based paste yielded less resin in the first year; however, in the second year, trees treated with 2,4-D-based paste had the highest resin yield (Fig. 3b). Smaller DBH trees treated with CEPA or 2,4-D had equivalent oleoresin yield in both years examined (Fig. 3 a and b).

The dose-response profile of oleoresin yield to different concentrations of sulphuric acid in the stimulant paste containing 4.5% CEPA is shown in Figure 4a. Best oleoresin production was observed with 20% sulphuric acid. The other concentrations of sulphuric acid yielded amounts of resin equivalent to those of trees treated with paste without sulphuric acid.

The dose-response profile of oleoresin yield to different concentrations of CEPA in stimulant paste containing 20% sulphuric acid is depicted in Figure 4b. Oleoresin production was similar in trees treated with paste containing CEPA in concentrations from 1.5 to 4.5%, although those treated with paste containing 2.5% CEPA yielded lower resin amounts than the ones exposed to paste containing 4.5% of the adjuvant (Figure 4b). Trees exposed to

stimulant pastes containing from 3 to 4.5% CEPA had average year oleoresin yield above 5 Kg per tree (Figure 4b).

The inclusion of the winter season in the oleoresin harvest schedule resulted in an increase of approximately 30% in the overall oleoresin yield compared to trees exploited only during the commercial period of the year (spring/summer/fall). This can be observed by comparing the first year yield of V shaped wounded trees without stimulant paste under the commercial year tapping schedule (Figure 1A) versus the yield of equivalent trees exploited in a full year tapping schedule (Figure 4A, bark streak bar). The same is seen in the yield comparison between V shaped wounded trees treated with stimulant paste during the commercial year (Figure 1A) versus trees under the same treatment for a full year, including winter (Figure 4A).

4. Discussion

The data clearly showed a positive effect of paste application on oleoresin yield, indicating that, under the conditions investigated, this system is advantageous in relation to plain wounding. The active components of the commercial paste, sulphuric acid and CEPA, play important roles in maintaining resin flow and maximizing the wound-related defense response (McReynolds and Kossuth, 1982). The lack of effect of wound shape in oleoresin yield is of ergonomic importance, because V-shaped streaks are easier to make than horizontal ones, especially as the resin panel increases in height. Possible differences in the number of resin ducts intercepted by wounding the trunk in V-shape or horizontal fashion do not seem to have a significant impact in paste-stimulated resin yield. However, the higher

first-year yield of trees not treated with paste suggests that horizontal streaks may intercept more resin ducts (particularly axial) than V-shaped ones (Wiedenhoeft and Miller, 2005).

The higher yields of paste-treated trees in the first year of tapping compared to the second may be related to the release of stored oleoresin. Trees not treated with paste had lower and stable production of oleoresin in both years, indicating that paste treatment was relevant for yield improvement even in the release of stored oleoresin. The better yields of higher DBH trees, both paste treated and untreated may also be related to larger stocks of oleoresin.

The replacement of CEPA by 2,4-D proved to be effective from the first year of application in low DBH trees, but a transient depression in oleoresin yield was seen in higher DBH trees treated with 2,4-D in the first year; in the second year, however, this same treatment showed recovery and promoted the highest resin yields. Auxin may stimulate resin yield through the induction of ethylene production by promoting the transcription of genes encoding aminocyclopropane carboxylic acid synthase, involved in the biosynthesis of the gaseous phytohormone (Chae and Kieber, 2005); moreover, auxin-stimulated differentiation of axial resin canals could have contributed to the positive effect of auxin on oleoresin yield (Fahn, 1982). The initial reduction followed by a delayed increase in resin production by larger DBH trees treated with auxin may reflect differences in the relative contribution of the resin duct differentiation component of the wound response. It is possible that higher DBH trees have a stronger canal differentiation response, causing an initial depression in oleoresin yield due to carbon diversion toward duct and secretory cell formation, followed by significant increases in the subsequent year as the canals mature.

The concentration of active components currently employed in the commercial resin stimulant paste varied in the dose-response profile of oleoresin production. Sulphuric acid at the conventional concentration (20% w/w) yielded the best response. Further increases in concentration were not employed due to the potential of causing strong damage to trees and higher risks for operators. The concentration of CEPA, however, gave a similar response in resin yield from 3% w/w in paste and up. Lowering the content of CEPA in resin stimulant paste is of interest for operation costs reduction.

The apparent contribution of winter time oleoresin in the overall yield indicated that, in subtropical climates of southern Brazil, year round harvest is viable. The absence of very long continuous periods of low temperature and the rare occurrence of below freezing temperatures appear to help oleoresin flow and production. It has been previously shown that temperature was more important than light for monoterpene emissions from needles of slash pine saplings (Tingey et al., 1980). Future investigations should address specific requirements of seasonal oleoresin production.

5. Conclusions

Under subtropical conditions of southern Brazil, higher oleoresin yields from *Pinus elliottii* depended on the use of stimulant pastes containing sulphuric acid and CEPA as active components. Horizontally and V - shaped wounding yielded equivalent amounts of oleoresin when applied in paste-treated trees, favoring the use of the latter, ergonomically more effective. Generally, higher DBH trees were associated with larger oleoresin yields. The auxin 2,4-D was able to effectively replace CEPA as active ingredient of the stimulant

paste in both first and second year of resin tapping in smaller DBH trees, but the same treatment caused an yield depression in larger DBH trees during the first year, followed by an increase in the second year. These results indicate that cost reductions on the resin tapping operation may be achieved by adjusting and modifying stimulant paste components, as well as by selecting and managing subsets of trees based on DBH ranges in specific fashion.

Acknowledgments

Financial support from Âambar Florestal Ltda. – São José do Norte – RS - Brazil (grant in aid of research) and the bursaries from Brazilian Research Funding Agencies CNPq and CAPES are gratefully acknowledged. The authors thank Âambar staff for support in the field work and M.Sc. Luciano da Rocha Correa (Departamento de Botânica, UFRGS) for assistance in the statistical analyses.

References

- ARESB, 2007 (Brazilian association of resin tapping industries) <http://www.aresb.com.br/>
access in November 1st 2007.
- Capitani, L.R., 1982. First results of the ethrel use on resin-tapping of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* at RESA. IPEF: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais; ESALQ-USP. Circular técnica n°147.
- Chae, H.S., Kieber, J.J., 2005. *Eto Brute?* Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. Trends in Plant Sci. 10, 291-296.
- Coppen, J.J., Hone, G.A., 1995. Gum naval stores: turpentine and rosin from pine resin. In: Non-Wood Forest Products No. 2. Natural Resources Institute, FAO, Rome .
- Croteau, R., Gurkewitz, S., Johnson, M.A., Fisk, H.J. 1987. Biochemistry of Oleoresinosis. Plant Physiol. 85, 1123-1128.
- Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, G., 2004. Biochemistry of plant volatiles. Plant Physiol. 135, 1893-1902.
- Fahn, A. 1982. Plant Anatomy, 3rd ed. Pergamon Press, Oxford, London.
- FAO, 1995. Flavor and fragrances of plant origin. In: Non-Wood Forest Products No.1. Natural Resources Institute, FAO, Rome.
- FAO, 1999. Non-wood forest products: Study for Mexico, Cuba and South America. Forest Resource Programme 2000, FAO, Rome.

- Kelkar, V.M., Geils, B.W., Becker, D.R., Overby, S.T., Neary, D.G., 2006. How to recover more value from small pine trees: essential oils and resins. *Biomass Bioenergy* 30, 316-320.
- Lee, H-J., Ravn, M.M., Coates, R.M., 2001. Synthesis and characterization of abietadiene, levopimaradiene, palustradiene, and neoabietadiene: Hydrocarbon precursors of the abietane diterpene resin acids. *Tetrahedron* 57, 6155-6177.
- Lewinsohn, E., Worden, E., Croteau, R., 1994. Monoterpene cyclases in Grand fir callus cultures: modulation by elicitors and growth regulators. *Phytochemistry* 36, 651-656.
- Martin, D.M., Gershenzon, J., Bohlmann, J., 2003. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway spruce. *Plant Physiol.* 132, 1586-1599.
- McReynolds, R.D., Kossuth, S.V., 1982. CEPA (2-chloroethylphosphonic acid) In: sulfuric acid paste increases oleoresin yields. Forest Service, United States Department of Agriculture, Southeastern Forest Experiment Station, Olustee, FL, U.S.A. 32072.
- Peñuelas, J., Llusià, J., 1999. Short-term responses of terpene emission rates to experimental changes of PFD in *Pinus halepensis* and *Quercus ilex* in summer field conditions. *Environmental and Experimental Botany* 42, 61-68.
- Pio, C., Valente, A.A., 1998. Atmospheric fluxes and concentrations of monoterpenes in resin-tapped pine forests. *Atmospheric Environment* 32 (4), 683-691.
- Sokal R.R., Rohlf, F.J., 1981. *Biometry*. W. H. Freeman, San Francisco.
- SQCE, 1984. Ethephon: Results of first year of resin-tapping in *Pinus elliottii* var. *elliottii*. Sector of Chemistry, Cellulose and Energy, Silviculture Department – ESALQ- USP (São Paulo University), No.7, São Paulo State, Brazil.

- Stubbs, J., Roberts, D.R., Outcalt, K.W., 1984. Chemical Stimulation of lightwood in southern pines. General Technical Report SE-25. United States Department of Agriculture, Forest Service, Southeastern Forest Experiment Station, Asheville, North Carolina.
- Tingey, D.T., Manning, M., Grothaus, L.C., Burns, W.F., 1980. Influence of light and temperature on monoterpene emission rates from slash pine. *Plant Physiol.* 65, 797-801.
- Trapp, S., Croteau, R., 2001. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 52, 689-724.
- Wang, Z., Calderon, M.M., Caradang, M.G., 2006. Effects of resin tapping on optimal rotation age of pine plantation. *J. Forest Economics* 11, 245-260.
- Wiedenhoef, A.C., Miller, R.B., 2005. Structure and Function of Wood. In: R.M. Rowell (Ed.) *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*, CRC Press, Boca Raton.

Figure Captions:

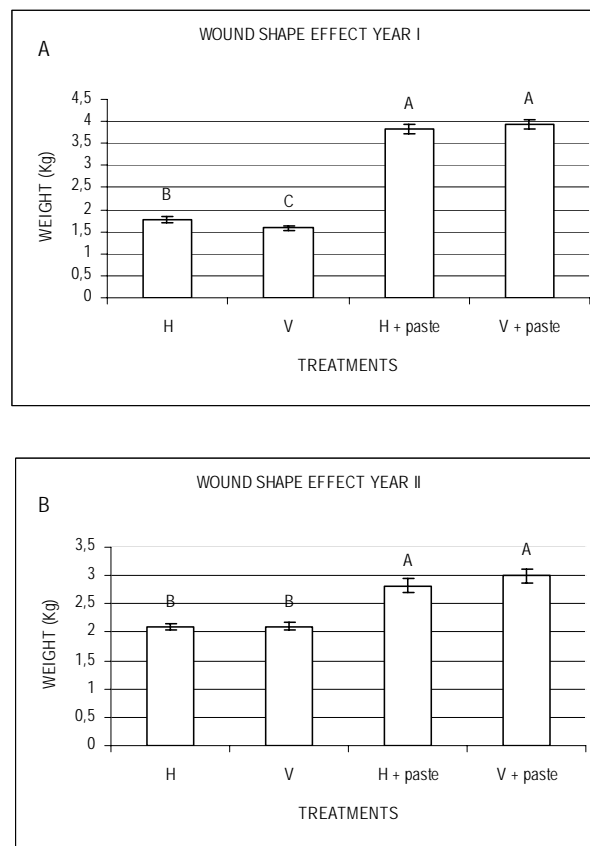


Figure 1. Effect of wound shape (H = horizontal; V = V-shaped) on oleoresin production during two consecutive commercial years (spring/summer/fall combined). A. Year I – average weight of oleoresin per tree after 16 streaks. B. Year II – average weight of oleoresin per tree after 18 streaks. Bars sharing a letter do not differ by Tukey test ($P \leq 0.05$).

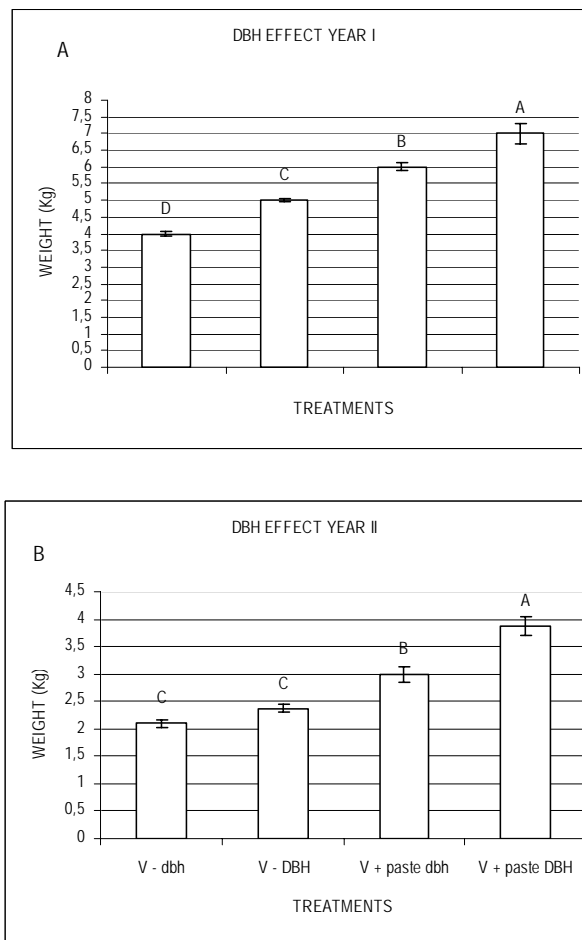


Figure 2. Effect of tree diameter at breast height (dbh = 18-19.5 ; DBH = 22-23.5 cm) on oleoresin production during two consecutive commercial years (spring/summer/fall combined). “V” indicates that trees were wounded in V-shape and “paste” indicates application of stimulant paste to wounds. A. Year I – average weight of oleoresin per tree after 16 streaks. B. Year II – average weight of oleoresin per tree after 18 streaks. Bars sharing a letter do not differ by Tukey test ($P \leq 0.05$).

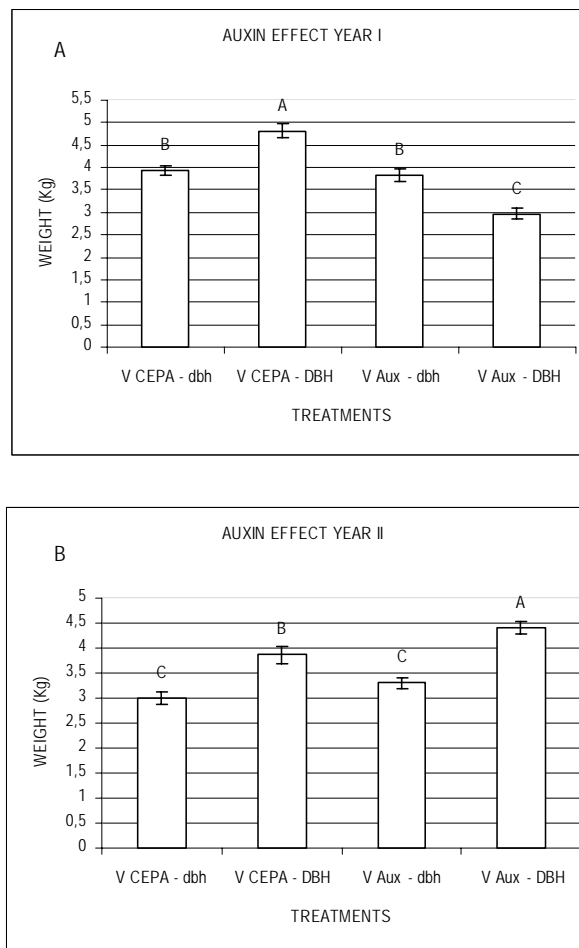


Figure 3. Effect of CEPA replacement by 2,4-D on oleoresin production during two consecutive commercial years (spring/summer/fall combined). “V” indicates that trees were wounded in V-shape and “paste” indicates application of stimulant paste to wounds. Tree diameter at breast height range is indicated as: dbh = 18-19.5 ; DBH = 22-23.5 cm. A. Year I – average weight of oleoresin per tree after 16 streaks. B. Year II – average weight of oleoresin per tree after 18 streaks. Bars sharing a letter do not differ by Tukey test ($P \leq 0.05$).

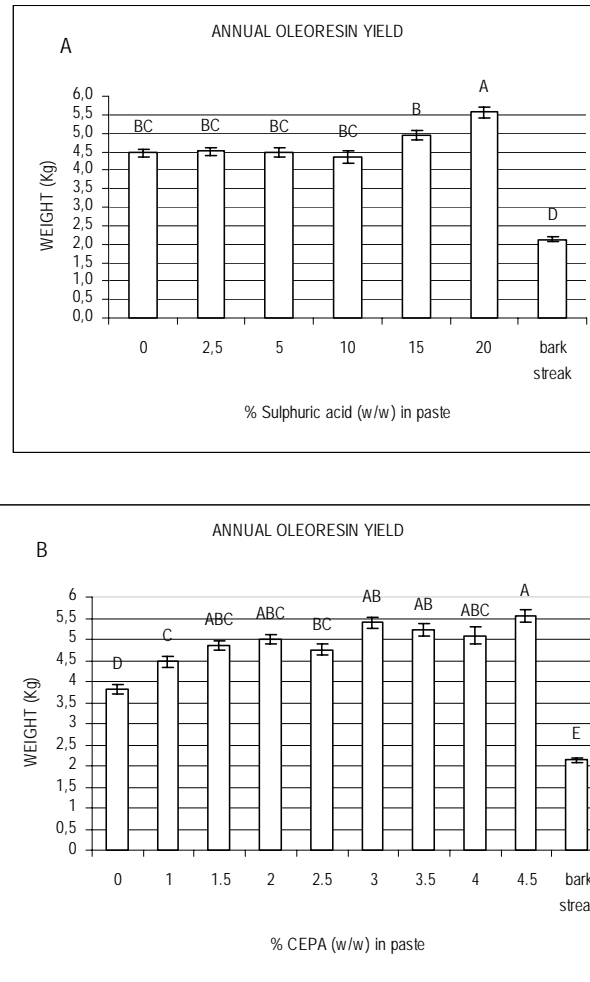


Figure 4. Annual oleoresin production per tree (4 seasons, 23 streaks) with stimulant paste supplemented with different concentrations of sulphuric acid (A) or CEPA (B). Bars sharing a letter do not differ by Dunnett's C (A) or Tukey (B) test ($P \leq 0.05$).