

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA VEGETAL

SISTEMA DE MICRORESINAGEM EM *Pinus elliottii* Engelm. PARA  
SELEÇÃO DE ADJUVANTES INDUTORES DE RESINOSE

Magnus Riffel Kerber

Orientador: Arthur Germano Fett Neto, PhD

Co-orientadora: Camila Fernanda de Oliveira Junkes

Porto Alegre – RS

2018

MAGNUS RIFFEL KERBER

SISTEMA DE MICRORESINAGEM EM *Pinus elliottii* Engelm. PARA  
SELEÇÃO DE ADJUVANTES INDUTORES DE RESINOSE

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

**Orientador(a): Arthur Germano Fett Neto**

**Co-orientadora: Camila Fernanda de Oliveira Junkes**

Porto Alegre – RS

2018

MAGNUS RIFFEL KERBER

SISTEMA DE MICRORESINAGEM EM *Pinus elliottii* Engelm. PARA  
SELEÇÃO DE ADJUVANTES INDUTORES DE RESINOSE

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Comissão Examinadora:

---

Dr<sup>a</sup> Fernanda de Costa  
Departamento de Botânica - UFRGS

---

Dr<sup>a</sup> Anna Carolina Yendo  
Centro de Biotecnologia - UFRGS

---

Dr. Arthur Germano Fett-Neto  
Centro de Biotecnologia - UFRGS

Porto Alegre – RS

2018

## **AGRADECIMENTOS**

Durante a execução deste trabalho, me recorro de muitas pessoas cujo todo apoio, suporte e carinho foram fundamentais durante essa jornada. Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador Arthur Fett por ter aberto as portas do laboratório para mim há quatro anos atrás (apesar de um ano de afastamento por intercâmbio, “o bom filho” à casa tornou). Durante as horas que passei no laboratório sob a tua supervisão adquiri aprendizado e experiência de valor inestimável, certamente minha formação como profissional foi enriquecida por fazer parte deste grupo de pesquisa.

Agradeço aos meus colegas de laboratório e de curso, o incentivo e a amizade demonstrados durante esses anos marcaram vocês em minha memória. A existência de cada um contribuiu para que eu chegasse até aqui. Guardo comigo bons momentos e lembranças, obrigado. À minha namorada Andressa, obrigado por estar sempre do meu lado e por todo teu carinho comigo, pela força que tu sempre me deste, mas principalmente obrigado por não explodir também com a expressão de certos genes ligados à loucura em certos momentos.

Gostaria de agradecer de forma imensuravelmente especial aos meus pais Elisete e Luciano por todo o apoio durante essa caminhada. Obrigado pelo incentivo sempre e por acreditarem em mim. Este momento e todas essas lembranças não seriam possíveis sem o esforço e a presença de vocês na minha vida. Obrigado por tudo o que fizeram por mim, sem vocês eu não teria chegado até aqui hoje. Dedico esta conquista a vocês.

“De que serve ao  
homem conquistar o  
mundo inteiro se  
perder a alma? ”

*Jesus Cristo*

## RESUMO

A resina terpênica de defesa exsudada por caules de *Pinus* spp. e os produtos dela derivados são usados na fabricação de diversos itens de interesse industrial, tais como aromatizantes, fármacos, tintas automotivas, tintas para impressão, adesivos, polímeros, biocombustíveis e solventes. O desenvolvimento de pastas estimuladoras de resinose é importante para ganhos de produção nas áreas de plantio atuais cultivadas com *Pinus elliottii*. Este estudo visou analisar a viabilidade de um sistema de microrresinagem para avaliação e seleção de novos adjuvantes indutores de resinose, inicialmente validando o efeito de adjuvantes reconhecidos como bons estimuladores de resinose. Tal sistema poderia reduzir de forma expressiva gastos na execução da mesma tarefa em campo, permitindo que somente adjuvantes mais promissores avancem para testes mais trabalhosos e demorados em florestas adultas. Pastas indutoras de resinose contendo CEPA (ácido 2-cloroetilfosfônico - liberador de etileno, consagrado como adjuvante ativo indutor de resina em florestas adultas), Metil Jasmonato (MeJa, conhecido como potente estimulador de resinose e biossíntese de terpenos), ou novos adjuvantes, tais como Isoleucina (Iso), inibidores de algumas vias de síntese de terpenos, entre outros potenciais adjuvantes, foram avaliados nas árvores jovens por aplicação sobre ferimentos na casca. As análises de produção de resina bruta compararam os diferentes tratamentos quanto à massa produzida da mesma. Adicionalmente, foram realizados ensaios de expressão gênica comparando MeJa, CEPA e controle não tratado (apenas com ferimento e aplicação de pasta base) a fim de detectar possíveis diferenças quanto à expressão de gene codificador de  $\alpha$ -pineno sintase, enzima relacionada à biossíntese de monoterpeno majoritário na resina, o que acabou por mostrar consistência com o perfil de produção de resina. Os resultados obtidos servem para nortear experimentos relacionados à resinose em *Pinus elliotti* e indicam alterações promissoras que podem ser feitas nas pastas indutoras de resinose, assim como revelam a viabilidade deste sistema para seleção rápida de novos adjuvantes e possivelmente de indivíduos superresinosos.

## ABSTRACT

The terpenic defense resin exuded by stems of *Pinus* spp. and the products derived from them are used in the manufacturing of various items of industrial interest, such as flavorings, pharmaceuticals, automotive paints, printing ink, adhesives, polymers, biofuels and solvents. The development of resin stimulating pastes is important for maximizing yields of production areas currently cultivated with *Pinus elliottii*. This study aimed at analyzing the viability of a microresinosis system for evaluating and selecting new resinosis stimulating adjuvants, initially validating the effect of well-known stimulants used in adult trees. This small-scale system could significantly reduce costs of carrying out the same task under field conditions, allowing that only the most promising adjuvants advance to more laborious and time-consuming evaluations in adult plants. Resinosis inducing pastes containing chloroethyl phosphonic acid (CEPA – an ethylene releasing compound, well-known as an efficient active adjuvant for resin induction in adult forests), Methyl Jasmonate (MeJa, a potent stimulator of resinosis and terpene biosynthesis) or novel adjuvants, such as Isoleucine (Iso), inhibitors of some terpene biosynthetic pathways, among other potential adjuvants were evaluated in young trees by application on bark wounds. The analyses of resin production compared the resin biomass yield provided by each of the treatments. Additionally, gene expression assays were conducted comparing MeJa, CEPA and control trees (only wounded and with application of the base paste) to detect possible differences in terms of expression of an  $\alpha$ -pinene synthase gene, encoding for an enzyme involved in biosynthesis of a major terpene component in resin, which turned out to be consistent with the resin yield profile. The results are useful to direct future resinosis experiments in *Pinus elliotti* and indicate promising alterations that may be incorporated to stimulant pastes, as well as support the viability of the system for the fast selection of paste adjuvants and possibly of superresinous individuals.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático de um tronco de <i>Pinus</i> mostrando as principais camadas de tecido que podem ser removidas durante o estriamento (adaptado de RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013).....	12
Figura 2: Métodos de extração de resina (adaptado de FETT-NETO; RODRIGUES-CORRÊA, 2012) .....	13
Figura 3: Exemplo do processo de estriamento que ocorre em áreas comerciais de plantio de <i>Pinus elliottii</i> no Rio Grande do Sul (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2012) .....	15
Figura 4: Exemplo de ferimento realizado nas plantas jovens .....	24
Figura 5: Desenho experimental - Resinose.....	26
Figura 6: Experimento de expressão gênica. ....	27
Figura 7: Comparação da produção de resina entre diferentes tratamentos (primeiro experimento)....	30
Figura 8: Cinética de produção ao longo das semanas no primeiro experimento. ....	31
Figura 9: Comparação da produção de resina entre diferentes tratamentos (segundo experimento)...	32
Figura 10: Cinética de produção ao longo das semanas no segundo experimento.....	33
Figura 11: Comparação da produção de resina entre diferentes tratamentos (terceiro experimento). ..	35
Figura 12: Cinética de produção ao longo das semanas no terceiro experimento.....	35
Figura 13: Comparação da Produção de Resina por ponto, Primeiro Experimento.....	38
Figura 14: Comparação da Produção de Resina por ponto, Segundo Experimento.....	38
Figura 15: Efeito de regeneração observado .....	40
Figura 16: Expressão gênica relativa de $\alpha$ -pineno sintase em diferentes tratamentos. ....	41
Figura 17: Comparação da produção de resina após 5 dias. ....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes compostos testados para estimulação de resinose em <i>Pinus elliottii</i> , bem como os seus mecanismos de ação e espécies testadas já descritas na literatura. ....	17
Tabela 2: Concentração dos compostos utilizados nas pastas indutoras de resinose .....	23
Tabela 3: Descrição, função, sequência e número de acesso dos genes utilizados como normalizadores e da enzima terpeno sintase analisada.....	29

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 UTILIZAÇÃO DA RESINA DE PINUS: ASPECTOS HISTÓRICOS E APLICAÇÃO INDUSTRIAL

A resina de *Pinus* é provavelmente um dos produtos naturais mais antigos utilizados pela humanidade (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013). No passado, a oleoresina foi utilizada como combustível para chamas, para impermeabilizar e preservar o casco de barcos de madeira (PAUL, 2004) e também como material selante em urnas mortuárias gregas utilizadas em cerimônias religiosas (LANGENHEIM, 2003). Atualmente a oleoresina de *Pinus* tem sido amplamente empregada como matéria-prima pela indústria química para gerar uma vasta gama de produtos derivados conforme a fração utilizada como fonte. A resina de *Pinus* pode ser dividida em duas frações principais: a fração volátil chamada de terebintina e a fração não volátil chamada de breu (MARTIN, 2002; FÄLDT et al., 2003).

A terebintina é tradicionalmente utilizada como solvente ou agente de limpeza e em tintas e vernizes, bem como na indústria química (ROME: NATURAL RESOURCES INSTITUTE, 1995). O processo de destilação fracionada é utilizado para obter os principais componentes da terebintina,  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, em sua forma pura. Alfa e beta-pineno são matérias-primas e ingredientes importantes na produção de fragrâncias e flavorizantes de alimentos, vitaminas, produtos de higiene, dentre outros (KELKAR et al., 2006; SMITA BHATIA, 2016). Já o breu é utilizado principalmente para fabricação de resinas adesivas, goma de mascar, borrachas industriais, pneus, tintas para impressoras, borrachas adesivas, materiais à prova d'água e emulsificantes (STUBBS; ROBERTS; OUTCALT, 1984; SMITA BHATIA, 2016). A aplicação diversificada da resina em variados segmentos da indústria destaca sua importância como matéria prima de grande interesse econômico.

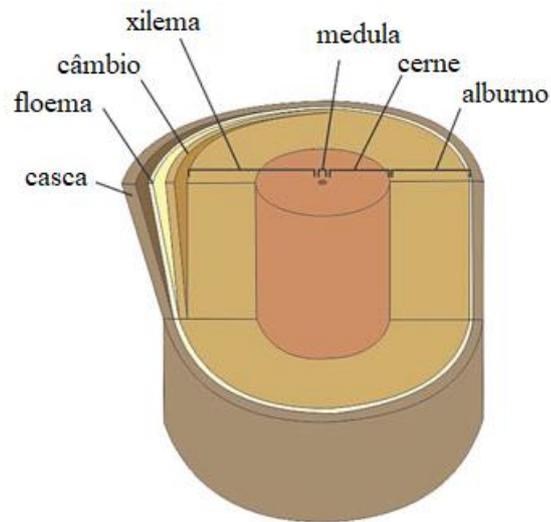
Diferentes espécies de *Pinus* foram utilizadas para extração de resina comercialmente ao longo da história em diversas partes do mundo (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013). Apesar de todas as espécies de *Pinus* serem capazes de resinar, a qualidade (composição) e a quantidade de terebintina e breu podem ser determinadas fortemente por fatores genéticos

variáveis entre espécies (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013). Por exemplo, *Pinus patula* (Schiede ex Schltdl & Cham), uma espécie exótica amplamente cultivada na África, não produz resina suficiente e a qualidade desta é pobre, incluindo menos de 10% de pinenos na composição da terebintina contra aproximadamente 90% observados na espécie *Pinus elliottii* (MIGLIORINI; BRITO; BARRICHELO, 1980). Essas características minimizam muito a possibilidade de *Pinus patula* ser escolhida para uso comercial. Analogamente, *P. kesyia* não é a primeira escolha para resinagem comercial, exceto em regiões onde pode ser estriada o ano inteiro, como nas Filipinas (LANGENHEIM, 2003). Originária da Tailândia a espécie produz pouca resina (COPPEN; HONE, 1995). Uma espécie ideal para resinagem apresentaria boa combinação de quantidade de resina e qualidade quanto à concentração de pinenos.

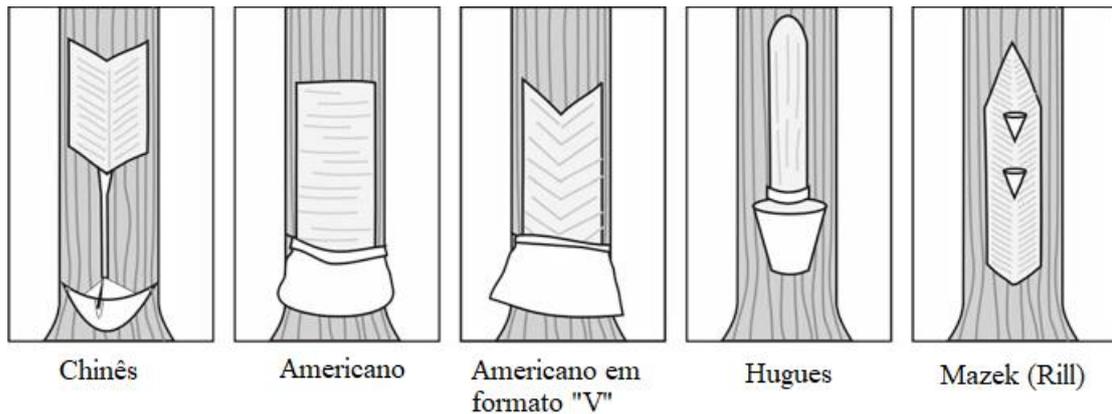
*Pinus elliottii* Engelm. é uma conífera pertencente à família *Pinaceae*, característica pela produção de resina em todos os seus gêneros. Nativa do sudeste dos EUA, essa espécie, amplamente cultivada em plantações subtropicais do Brasil, Índia e China, é usada principalmente na produção de resina e na indústria moveleira (RODRIGUES-CORRÊA, 2008). 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 qualidade inferior de terebintina), *Pinus elliottii* é ampla e preferencialmente cultivada e indicada para a prática de extração em escala comercial.

Somado aos fatores genéticos, a composição e o volume de oleoresina produzida dependem do status fisiológico da planta, sazonalidade e das condições bióticas e abióticas às quais a árvore se encontra exposta (RODRIGUES-CORRÊA, 2008; RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013). Além das influências genéticas e ambientais, a biossíntese de oleoresina pela planta pode ser fisiologicamente modulada, ao menos em parte (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013) por vias de ferimento mecânico (método de extração, frequência da remoção da casca da árvore) e/ou estímulo químico (FETT-NETO; RODRIGUES-CORRÊA, 2012). Apesar de métodos iniciais de extração de resina levarem à destruição completa de florestas inteiras de *Pinus* na França (OUDIN, 1938), variações do método-base desenvolvido na América do Norte chamado de caixa (do inglês “box”) (GRISSINO-MEYER; BLOUNT; MILLER, 2001; LANGENHEIM, 2003) foram

desenvolvidas e são aplicadas ao redor do mundo (FETT-NETO; RODRIGUES-CORRÊA, 2012). O processo de estriamento atual das árvores consiste na retirada de tecido do tronco já desenvolvido que apresenta crescimento secundário, removendo primeiramente a casca da árvore e avançando mais profundamente pelas camadas que o constituem (Figura 1) conforme diferentes métodos de extração (Figura 2).



**Figura 1:** Desenho esquemático de um tronco de *Pinus*. Os métodos de estriamento atuais empregam remoção das camadas de tecido até exposição do câmbio e xilema. Na região do tecido vascular há diversos canais resiníferos. Adaptado de (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013).



**Figura 2: Métodos de extração de resina. Adaptado de (FETT-NETO; RODRIGUES-CORRÊA, 2012).**

No método Chinês, são realizadas na casca da árvore estrias em formato “V” todos os dias de cima para baixo para expor o xilema secundário (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013). O método de Hugues foi desenvolvido pelo francês Pierre Hugues em 1844 e se tornou popular em 1860 (OUDIN, 1938). Esse método consiste em remover longas “lascas” verticais de 10 cm de largura do tronco, profundas o suficiente para alcançar o xilema secundário das plantas. Tanto no método Chinês quanto no francês de Hugues não há utilização de estimulantes químicos para exsudação de resina.

O método de Mazek é o empregado majoritariamente na Índia. Nesse sistema, faixas em formato “V” (2-3 mm de largura) são cortadas de baixo para cima em intervalos (24 h, 3 ou 7 dias), muito parecido com o sistema Americano (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013). No sistema Americano, faixas horizontais ou em “V” (2,5-3,0 cm de largura) são removidas a cada 14 dias, retiradas de aproximadamente 1/3 da circunferência do tronco, até a profundidade do câmbio ou preferencialmente até o alburno (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013). Esse método é o mais empregado em países como Brasil, Argentina, Portugal e Espanha (CUNNINGHAM, 2012). Conforme estudos comparativos sobre diferenças de produção entre o padrão em “V” e o horizontal no que diz respeito à produção de resina, não foram constatadas diferenças significativas entre os métodos de estriamento (RODRIGUES et al., 2008).

### 1.1.1 A RESINA DE *Pinus* E A ECONOMIA MUNDIAL

A Associação de Produtos Químicos de *Pinus* (PCA) ou “Pine Chemicals Association” (PCA) é uma associação mundial de empresas do ramo de oleoresina de *Pinus* sendo aberta a toda e qualquer empresa ou pessoa no ramo de fabricação ou marketing de produtos químicos derivados de árvores de *Pinus* (“Pine Chemicals Association”, 2017). A associação promove pesquisas com seus associados e fornece diversos dados estatísticos, informações técnicas gerais e funciona como um fórum de contato dos membros com agências governamentais. A PCA fornece relatórios anuais que contém dados econômicos que ilustram a participação de diversos países no mercado mundial de resina de *Pinus*.

A indústria de produtos químicos derivados de *Pinus* gera um rendimento global de mais de US\$10 bilhões anualmente e emprega cerca de 185.000 pessoas (SMITA BHATIA, 2016). A América do Sul representa uma fatia de 4% nos lucros mundiais, que equivale a US\$410 milhões. A participação emergente no mercado mundial dos países sul-americanos fica mais notável quando comparamos o número de estriadores, os profissionais envolvidos na estriagem: 6.500 (seis mil e quinhentos) trabalhadores, ficando atrás apenas da China com 200.000 (duzentos mil) (SMITA BHATIA, 2016). Nos últimos anos, o modelo de negócio baseado no estriamento das árvores (Figura 3) em países como Argentina e Brasil tem evoluído de um modelo de subsistência para um modelo de agronegócio mais desenvolvido (SMITA BHATIA, 2016). Atualmente, grandes proprietários de terras ou companhias que possuem uma ou mais áreas de plantio contendo árvores de *Pinus* contratam estriadores terceirizados para extração da oleoresina (SMITA BHATIA, 2016).



**Figura 3: Exemplo do processo de estriamento que ocorre em áreas comerciais de plantio de *Pinus elliottii* no Rio Grande do Sul (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2012)**

### 1.1.2 PARTICIPAÇÃO DO BRASIL NO MERCADO MUNDIAL E PRODUÇÃO NACIONAL

Em termos de produção e exportação o Brasil se destaca entre os maiores exportadores mundiais de resina, com representatividade de 16% do mercado mundial de exportação de breu em 2014, ficando atrás apenas de Indonésia e China (Statistics on Worldwide Imports & Exports of Pine Chemicals, 2014). Já no mercado mundial de exportação de terebintina o país teve 14% de participação (Statistics on Worldwide Imports & Exports of Pine Chemicals, 2014). O mercado de exportações também sofreu alterações ao longo dos anos com o aumento da demanda pelos derivados, terebintina e breu, ao invés da resina bruta (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013). França e Holanda são os principais importadores de terebintina e breu brasileiros, respectivamente (“ARESB ‘ASSOCIAÇÃO DOS RESINADORES DO BRASIL’”, 2017).

De importadores até a década de 80, passamos a grandes exportadores a partir de 1989 (MARCO A. DE O. GARRIDO, ROGÉRIO DAL POZ; FINÊ T. ROCHA, 1998). De fato a produção de resina no Brasil cresce a cada ano. Segundo dados da ARESB (Associação dos Resinadores do Brasil) a produção de resina na safra 2016/2017 no país foi de 167.946 toneladas, cerca de 75% maior do que a produção da safra passada que foi de 95.961 toneladas de resina (“ARES B ‘ASSOCIAÇÃO DOS RESINADORES DO BRASIL”, 2017). O Rio Grande do Sul figura entre os maiores produtores de resina nacional, com participação de aproximadamente 22% na safra de 2015/2016, e participação de 21,4% na safra 2016/2017, ficando atrás apenas de São Paulo que foi responsável por 62,2% da produção na safra mais recente. *Pinus elliottii* é a espécie mais resinada no Brasil, responsável por aproximadamente 79% da resina produzida, seguida de variedades tropicais do gênero *P. caribaea* var. *caribaea*, *P. caribaea* var. *hondurensis*, *P. caribaea* var. *bahamensis* (“ARES B ‘ASSOCIAÇÃO DOS RESINADORES DO BRASIL””, 2017).

## 1.2 ESTÍMULOS MECÂNICOS E QUÍMICOS NA PRODUÇÃO DE RESINA

Danos mecânicos já são conhecidos como estimuladores de mecanismos de defesa em plantas (especialmente em coníferas) (LEWINSOHN et al., 1993; STEELE et al., 1998; LOMBARDERO; AYRES; AYRES, 2006). Esta prática foi utilizada durante séculos para obtenção de oleoresina a partir de árvores de *Pinus*.

Um adjuvante ou estimulante químico de resinose é uma molécula presente em pastas estimuladoras que atua como principal responsável pela indução dos efeitos resiníferos observados nas plantas (RODRIGUES; FETT-NETO, 2009; FERREIRA; FIOR; GUALTIERI, 2011). Ao longo dos anos um grande número de tratamentos utilizando estímulos químicos foi testado a fim de obter maior rendimento de produção de oleoresina em áreas de plantio comercial de *Pinus* (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013) inclusive resultando em diversas patentes depositadas (SPLITTER; KUBLUN; HESSENLAND, 1936; E; S, 1948; B, 1952; CLEMENTS, 1967; ALFRED, 1975; WOLTER et al., 1980). Podemos citar como exemplo o método de Rill onde uma solução contendo uma mistura de mesma proporção de ácido clorídrico (HCl) e ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) é aplicada sob a forma de “spray”

na área exposta do ferimento a fim de estimular a exsudação de resina (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013). No método Americano, uma pasta contendo os estimulantes químicos ácido sulfúrico (20%) e CEPA (ácido 2-cloroetilfosfônico) (3 a 4,5%) é aplicada sobre as camadas de alburno ou câmbio expostas (RODRIGUES et al., 2008; RODRIGUES; FETT-NETO, 2009; DA SILVA RODRIGUES et al., 2011; DA SILVA RODRIGUES-CORREA; FETT-NETO, 2013).

A prática de aplicação de estimulantes na área da casca ferida das árvores permite a redução do tamanho do ferimento inicialmente confeccionado de forma destrutiva por métodos clássicos de injúria mecânica (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013). Além disso, a utilização de avanços científicos pela indústria de produtos químicos derivados de *Pinus*, como o uso de novos estimulantes químicos, aumentou o rendimento de produção de resina por árvore (SMITA BHATIA, 2016).

### 1.2.1 ESTIMULANTES QUÍMICOS UTILIZADOS NA RESINOSE DE *Pinus*

A tabela a seguir lista os mecanismos de ação dos estimulantes químicos mais relevantes para o entendimento deste trabalho (Tabela 1).

**Tabela 1. Diferentes compostos testados para estimulação de resinose em *Pinus elliottii* bem como os seus mecanismos de ação e espécies testadas já descritas na literatura.**

Componente da Pasta	Mecanismo de ação observado em coníferas (à parte do aumento de produção de resina)	Exemplos de espécies avaliadas	Referências
CEPA, Ethrel®, Etephon (ácido 2-cloroetilfosfônico)	Precursor do etileno, molécula sinalizadora envolvida em respostas induzidas por stress; causa aumento na biossíntese de mono e diterpenos. Induz crescimento radial, dutos de resina, formação do xilema e altera o padrão anatômico de traqueídeos.	<i>P. elliottii</i> Engelm. <i>P. palustres</i> Mill., <i>P. caribaea</i> var. <i>hondurensis</i> , <i>P. taeda</i> L., <i>P. resinosa</i>	(CAPITANI, 1982; TELEWSKI; WAKEFIELD; JAFFE, 1983; RODRIGUES et al., 2008)

Metil Jasmonato e Jasmonato (MeJa e Ja)	Indução de respostas de defesa, indução da transcrição de genes de ACC oxidase; aumenta a biossíntese de mono e diterpenos em acículas e no tronco, promove ativação celular e a formação de dutos de resina traumáticos no xilema, induz a produção de etileno, aumenta a transcrição de enzimas terpeno sintases.	<i>Picea abies</i> L. (Karst) <i>Metasequoia glyptostroboides</i> , <i>Sequoiadendron giganteum</i> , <i>Sequoia sempervirens</i> , <i>Cryptomeria japonica</i> , <i>A. grandis</i> , <i>Cedrus libani</i>	(MARTIN, 2002, 2003; HUDGINS; FRANCESCHI, 2004; MILLER et al., 2005; WASTERACK; HAUSE, 2013)
Isoleucina (Iso)	Aminoácido de ocorrência natural, cuja conjugação com Jasmonato representa a forma ativa endógena pela qual ocorre a transdução de sinal desencadeada por Jasmonato.	Nenhum até o presente trabalho.	(WASTERACK, 2007; WASTERACK; HAUSE, 2013)
Ácidos Orgânicos (AO)  (não especificados por questões de propriedade intelectual)	Contém compostos potencialmente precursores para síntese de proteínas envolvidas na resinose	Nenhuma até o presente trabalho	
Clomazone	Herbicida, inibidor de algumas enzimas presentes na via de síntese de alguns terpenos	Nenhuma até o presente trabalho	
Cloreto de Sódio (NaCl)	O estresse osmótico causado pelo excesso de sal no local do ferimento possivelmente acarretaria maior exsudação de resina no local afeado como mecanismo de defesa.	Nenhuma até o presente trabalho	
Ácido Acético (AA)	Estresse causado pelo dano ácido, estudos apontaram relação da aplicação externa de Ácido Acético e a produção de Jasmonato em planta-modelo.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(KIM et al., 2017)

A aplicabilidade industrial de uma pasta indutora de resinose depende do equilíbrio entre o rendimento de produção e o custo do adjuvante químico principal nela utilizado. Em termos comerciais, CEPA (ácido 2-cloroetilfosfônico) é o agente mais utilizado em pastas estimuladoras utilizadas nas áreas de plantio de *Pinus* para produção industrial de resina (RODRIGUES et al., 2008). Como reagente químico P.A., o custo de CEPA atualmente varia em torno de US\$ 1,154.00/kg. Seguindo a lógica industrial de produzir mais gastando menos, a busca por novos adjuvantes é constante e já permitiu a identificação de diferentes estimulantes químicos de menor custo com efeito relevante sobre a resinose de *Pinus* (RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013).

Metil Jasmonato (MeJa) e Jasmonato (Ja) são formas hormonais de ocorrência natural em plantas responsáveis por exercer diferentes efeitos já descritos sobre coníferas, como a promover a expressão de genes relacionados a enzimas envolvidas na rota de biossíntese dos principais componentes da resina (MARTIN, 2002, 2003; HUDGINS; FRANCESCHI, 2004; MILLER et al., 2005; WASTERNAK; HAUSE, 2013) (Tabela 1). Apesar de resultados promissores e da comprovação da relação de MeJa e Ja com a produção de resina em coníferas, seu alto custo como reagente P.A. de cerca de US\$ 4.584/kg (Sigma-Aldrich) faz com que essas moléculas não sejam economicamente atrativas, de maneira que há escassez de estudos relacionando seus efeitos com a produção de resina bruta em árvores de *Pinus*.

Estudos revelaram que MeJa e Ja são as formas preferenciais de sinalização de defesa em plantas, enquanto a principal forma ativa endógena nas mesmas consiste na conjugação de Jasmonato com o aminoácido Isoleucina (Iso), dando origem à molécula Jasmonoil-Isoleucina, “(+)-Ja-L-Ile” (FONSECA et al., 2009). Tais dados são indicativos de uma justificativa para testes com Isoleucina em uma pasta indutora de resinose, reforçado pelo fato de que seu custo como reagente P.A. é de aproximadamente US\$795/kg (Sigma-Aldrich), menor do que o principal componente indutor utilizado atualmente.

Por questões de possibilidade de aplicação para uma patente, as informações sobre a pasta contendo Ácidos Orgânicos (AO) serão limitadas. Inicialmente, imaginou-se que seria interessante o seu uso por seu componente principal ser de fácil acesso e mais barato que adjuvantes conhecidos; porém, resultados inesperados foram constatados, levantando questionamentos sobre seu uso comercial conforme os efeitos observados.

Clomazone é um inibidor de enzimas presentes na rota de síntese de carotenoides, o que acaba causando a degradação de clorofila e consequente clareamento das folhas, levando a planta à morte (DUKE; PAUL, 1986). Experimentos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Vegetal relacionando o potencial resinífero com a resistência ao clomazone mostraram que plântulas sobreviventes à exposição ao herbicida geralmente apresentavam maior resinose. Desta forma, foi investigada a hipótese de que a aplicação de clomazone possa ser um estimulante de resina através do bloqueio de algumas vias de produção de terpenos, criando um desvio de precursores adicionais para outras rotas metabólicas terpênicas envolvendo a biossíntese de resina.

Em um estudo a respeito do efeito da seca sobre plantas, KIM e colaboradores (2016) identificaram que a rota envolvida na sinalização interna frente a este estresse envolve acetato, posteriormente estimulando a síntese de ácido jasmônico. Além disso, a aplicação externa de ácido acético (AA) promoveu a biossíntese de ácido jasmônico na planta. Portanto, mesmo que indiretamente, a aplicação de AA poderia levar a uma sinalização interna resultando em maior exsudação de resina.

As pastas contendo Cloreto de Sódio (NaCl) visam o estímulo resinífero através do estresse osmótico causado. Por ser um insumo de baixo custo e muito disponível, sua avaliação experimental é atrativa.

### 1.2.2 UTILIZAÇÃO DE PLANTAS JOVENS PARA PARÂMETROS RESINÍFEROS

Em princípio, a resina produzida por plantas jovens (um ano de idade) de *Pinus elliottii* sob efeito de indução pode ser efetivamente mensurada e utilizada para comparar diferentes tratamentos (FERREIRA; FIOR; GUALTIERI, 2011). O uso de plantas jovens facilita o manejo experimental, possibilitando reduções nos custos de transporte, material e pessoal necessário para realização de experimentos bem como a diminuição do tempo dos ensaios da ordem de anos para poucos meses. Além disso, a utilização de plantas jovens em testes de resinagem permite que apenas adjuvantes promissores avancem para testes em árvores adultas, economizando material vegetal.

## 2 JUSTIFICATIVA

O estudo envolvendo a resinagem de *Pinus* e de adjuvantes relacionados ao aumento de produção é de grande importância para a indústria química de seus derivados, que movimenta bilhões de dólares por ano mundialmente. Economicamente, adjuvantes que sejam mais baratos, menos tóxicos ao operador e que tenham efeito resinífero comparável aos já utilizados atualmente são uma interessante alternativa. Aumentar a produção e/ou manter os mesmos números utilizando pastas mais baratas é a visão da indústria atualmente.

O estudo de parâmetros resiníferos em plantas jovens com diferentes adjuvantes auxiliará no desenvolvimento de novas pastas comerciais como alternativa, apresentando-se como um método rápido e de fácil manutenção para estudos iniciais de resinagem. Se descoberto um adjuvante que seja interessante comercialmente nesse sistema, este poderia avançar para testes em plantas adultas. Além disso, a descoberta de adjuvantes que tenham maiores efeitos sobre a resinose do que aqueles utilizados atualmente apresenta valor ecológico pois aumentaria a produção de resina/árvore, maximizando o uso de áreas de plantio já existentes, mitigando o impacto ambiental causado pelo aumento do número de árvores em áreas de plantio para ganhos de produção e conseqüentemente da dispersão indesejada de sementes de *Pinus* pelo vento em áreas próximas à unidades de preservação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de pastas indutoras quanto ao estímulo de produção de resina em plantas jovens de *Pinus elliottii*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a potencial utilização de plantas jovens para seleção de novos adjuvantes indutores de resina;
- Identificar potenciais adjuvantes candidatos a serem utilizados como alternativa em pastas indutoras;
- Avaliar diferenças quanto à produção de resina em plantas jovens de *Pinus elliottii* dentre as pastas indutoras testadas;
- Analisar a expressão gênica de uma alfa-terpeno sintase, enzima envolvida na biossíntese de um dos terpenos majoritários presentes na resina;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PREPARAÇÃO DAS PASTAS ESTIMULADORAS

As pastas estimuladoras de resinose foram preparadas na proporção de 1:1 (v/v) de água destilada e glicerol e armazenadas em tubos de 15mL. As moléculas indutoras foram primeiramente adicionadas à fração aquosa da mistura em quantidade correspondente conforme a concentração final desejada (Tabela 2). Posteriormente, foi adicionado glicerol e o tubo foi agitado em “vortex” para homogeneizar as pastas. A definição das concentrações foi baseada em testes piloto.

Tabela 2: Concentração dos compostos utilizados nas pastas indutoras de resinose

Componente	Concentração
CEPA	3%
Metil Jasmonato	100mM, 10mM
Isoleucina	100mM
Clomazone	0,45uM
Ácido Acético	10%, 50%
Ácidos Orgânicos	200mM
Cloreto de Sódio	1,5M

### 4.2 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Plantas de *Pinus elliottii* obtidas comercialmente foram utilizadas nos experimentos, sendo o início dos mesmos quando estas possuíam 2 anos de idade. As plantas cresceram em solo comercial humoso e vermiculita (1:1 v/v) em potes de PVC de 2L e mantidas em casa de vegetação à luz natural. A rega foi feita três vezes por semana.

### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Para avaliar a produção de resina um ferimento foi realizado na casca da árvore de *Pinus* com lâmina de bisturi, removendo-se primeiramente uma acícula presente no local e posteriormente as camadas da casca até o câmbio (Figura 4a) e aplicando a pasta estimuladora com o auxílio de uma micropipeta volumétrica (Figura 4b), em (volume adicionado foi de aproximadamente 50  $\mu$ L) em um ou mais pontos de altura do caule (basal, mediano e apical), dependendo do ensaio. O ponto basal foi definido como sendo a primeira porção a partir do coleto com a presença de ramificação com acículas, o ponto apical, como a região abaixo do meristema apical já apresentando tecido relativamente menos tenro e mais lignificado, e o ponto mediano, como a distância média entre os pontos basal e apical.



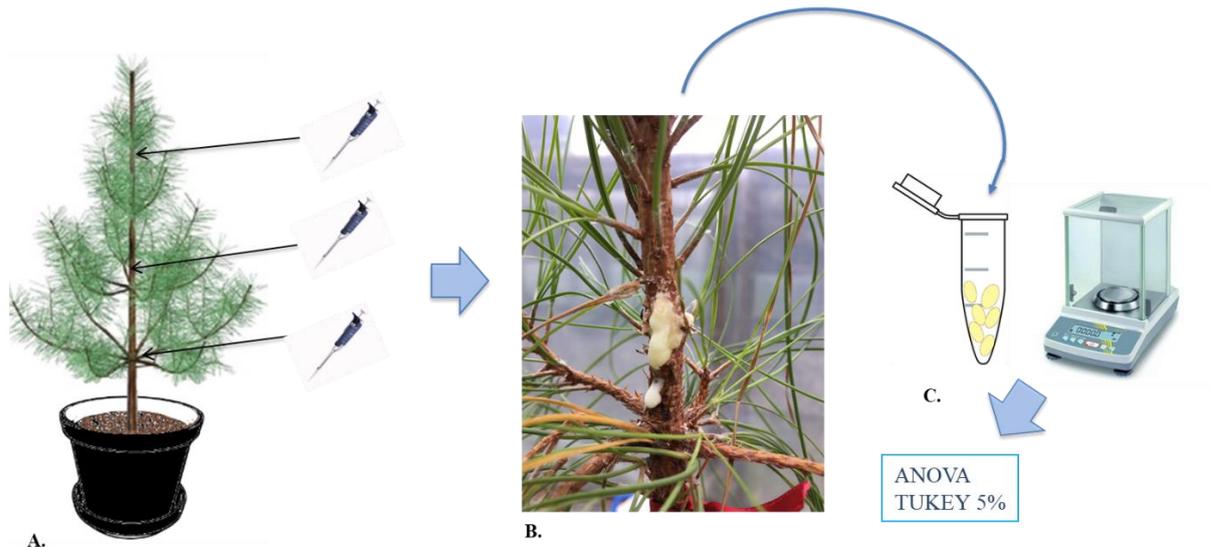
**Figura 4: Realização do ferimento e aplicação de pasta indutora.** (a). Ferimento realizado na porção basal de planta jovem de *Pinus elliotii*. (b). aplicação da pasta indutora

Após uma semana da realização do ferimento e aplicação da pasta (Figura 5 a.), a resina foi raspada com espátula de metal e coletada em microtubos pesados previamente (Figura 5 b.). Após a segunda coleta (14 dias passados do início do experimento) a pasta indutora foi reaplicada (DA SILVA RODRIGUES-CORREA; FETT-NETO, 2013) sob o mesmo ferimento.

A cada semana de coleta a resina produzida foi pesada em balança analítica. O peso da resina produzida foi aferido e a análise da variação de produção entre os tratamentos ao longo do experimento foi feita (Figura 5c.). No primeiro ensaio foram avaliadas as seguintes pastas: CEPA 3% (ET), Ácidos Orgânicos (AO), Isoleucina 100 mM (Iso) Metil Jasmonato 100 mM (MeJA), MeJA + Iso, ambos a 100 mM, ou pasta base sem adjuvante (Controle). As pastas foram aplicadas nas três porções do caule. O ensaio foi conduzido por quatro semanas, totalizando quatro coletas.

As mesmas plantas foram utilizadas para os outros experimentos de resinose; porém, medidas foram tomadas a fim de remover o possível ruído proveniente de um experimento para o outro como a possível diferença na incidência de luz em diferentes pontos casa de vegetação alterando a taxa fotossintética de uma planta para a outra. Após o término do primeiro experimento, as plantas foram aleatoriamente misturadas para limitar possíveis influências de tratamentos anteriores sobre os experimentos futuros. O intervalo entre os experimentos foi de dois meses e meio. O segundo experimento avaliou as seguintes pastas: Ácido Acético 10%, Clomazone 0,45  $\mu$ M, CEPA 3%, Metil Jasmonato 100 mM (MeJA), NaCl 1,5M ou pasta base sem adjuvante (Controle). Neste ensaio, também foram aplicadas pastas em ferimentos nas três porções de altura do caule. O ensaio foi conduzido por duas semanas, totalizando duas coletas. O terceiro ensaio avaliou as seguintes pastas: Ácido Acético 50% (AA), Clomazone 0,45  $\mu$ M, Metil Jasmonato 10 e 100 mM (MeJa) ou pasta base sem adjuvante (Controle). Neste ensaio, foram aplicadas pastas em ferimentos apenas na porção mediano-basal (ponto médio entre a região basal e mediana) do caule e as mesmas foram reaplicadas semanalmente. O ensaio foi conduzido por quatro semanas, totalizando quatro coletas.

Nos dois primeiros experimentos de resinose foram utilizadas doze plantas por tratamento e no último, oito plantas. O número de replicatas foi revisto com base na literatura (FRANCESCHI; KREKLING; CHRISTIANSEN, 2002), bem como em função de questões logísticas de espaço na casa de vegetação.



**Figura 5: Desenho experimental utilizado.** A. Pequenas porções da casca de plantas jovens (2 anos), cultivadas em casa de vegetação, foram removidas em três diferentes pontos (ou um no caso do terceiro experimento), seguido aplicação de pasta indutora conforme as composições indicadas. B. Durante quatro semanas após a aplicação da pasta coletou-se a resina acumulada no local, sendo efetuada a reaplicação da pasta após a segunda coleta, sem realização de nova incisão. C. A resina foi armazenada em microtubos e realizou-se a pesagem dos tubos a cada semana a fim de avaliar a produção de resina durante o tratamento.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

Plantas jovens de *Pinus elliottii* (2 anos) diferentes das usadas nos experimentos de resinose foram selecionadas para coleta de material genético e avaliação da expressão gênica de uma  $\alpha$ -pineno sintase da rota de biossíntese de terpenos. Cinco plantas foram selecionadas para aplicação das pastas Controle, CEPA e MeJa. Um ferimento foi feito na porção basal da planta e a pasta correspondente foi aplicada no local (Figura 6 a). Após cinco dias, a casca (composta majoritariamente de tecido lignificado) das árvores foi removida a fim de expor o tecido abaixo (principalmente câmbio e xilema jovem) para ser coletado (Figura 6 b). Uma porção de 5 cm acima/5 cm abaixo do local do ferimento foi raspada a uma profundidade leve (Figura 6 c) e o tecido coletado em microtubos de 1,5mL foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido.



**Figura 6: Extração de material vegetal utilizado para análise de expressão gênica.** Árvore jovem de *Pinus elliotti* 5 dias após aplicação da pasta (a), sendo posteriormente removida sua casca para coleta (b). O tecido exposto foi então raspado (c) e processado para análise.

O tecido coletado foi macerado manualmente em almofariz com auxílio de pistilo e foi mantido em nitrogênio líquido até a adição do tampão de lise PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen) para extração do RNA total das amostras de cada árvore. O RNA total foi extraído conforme o protocolo PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen). A concentração de RNA total foi determinada utilizando um espectrofotômetro UV (Nanodrop, Thermo Scientific). O RNA extraído foi posteriormente armazenado a -80 °C.

A concentração de RNA extraído foi padronizada (1µg) e o mesmo foi tratado com 1U de DNase e o tampão de reação para DNase I (Life Technologies) antes da síntese de cDNA. Todo o RNA foi transcrito reversamente utilizando iniciadores oligo-dT e a enzima M-MLV transcriptase reversa (Life Technologies) em um volume final de 20µL de reação. O cDNA sintetizado foi diluído para a concentração de 1:50 para reações de qPCR.

#### 4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE ALFA-PINENO SINTASE POR qPCR

As reações de qPCR foram conduzidas em quadruplicata técnica para cada amostra, em um volume de 20µL de reação e concentrações de reagentes conforme a literatura (DE LIMA et al., 2016). Todas as análises foram feitas utilizando três plantas (replicatas biológicas) por tratamento. As reações foram conduzidas utilizando placas ópticas com 48 poços (MicroAmp™ Applied Biosystems) em aparelho de PCR em Tempo Real StepOne™ (Applied Biosystems), de acordo com instruções do fabricante. A programação do PCR incluiu a desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 10 s a 60 °C e 15s a 72 °C, posteriormente as amostras foram mantidas por 2 min a 40 °C a aquecidas de 55 a 90 °C com um aumento de 0.1 °C/s para produzir a curva de desnaturação dos produtos amplificados. As curvas de desnaturação foram analisadas a fim de validar a especificidade do produto amplificado. Os dados foram analisados pelo método comparativo Cq (método de ciclo quantitativo) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A eficiência do PCR na fase exponencial foi calculada para cada amplificação individual utilizando o software LinReg (RAMAKERS et al., 2003). O gene *UBI* (Ubiquitina) foi utilizado como normalizador para a expressão de *PtTPS-(+)apin* com base em resultados publicados para árvores de *Pinus* adultas (DE LIMA et al., 2016) (Tabela 3). Em cada placa, a média da eficiência do PCR para cada amplicon foi determinada.

**Tabela 3: Descrição, função, sequência e número de acesso do gene utilizado como normalizadores e da enzima terpeno sintase analisada**

Gene	Abreviação utilizada	Função	Sequência do Primer (5'-3') (forward/reverse)	Número de Acesso GenBank
Ubiquitina	<i>UBI</i>	Complexo de sinalização para degradação proteica, controle da tradução, reparo de DNA, regulação da endocitose.	GATTTATTTTCATTGGCAGGC/ AGGATCATCAGGATTTGGGT	(DE VEGA-BARTOL et al., 2013)
<i>Pinus taeda</i> (+)- $\alpha$ pineno sintase	<i>PtTPS-(+)apin</i>	Síntese de (+) - $\alpha$ -pineno	CGACAACATCAACGAAATGG/ TCGAACGTGGGAAGATAACC	AAO61228

#### 4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

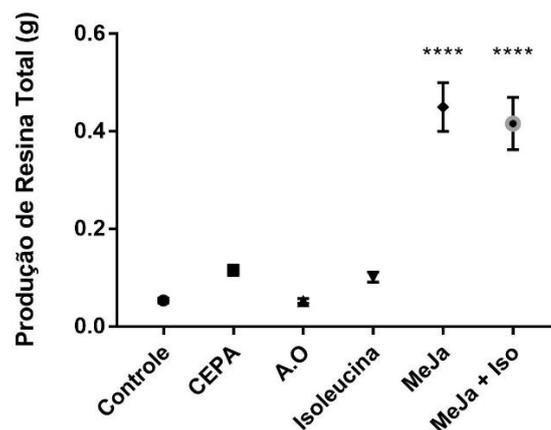
Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e analisados por ANOVA, seguida de teste Tukey ou teste t-Student, conforme apropriado. Para todos os casos, usou-se um  $P \leq 0.05$ ). As análises usaram o pacote estatístico GraphPad Prism 7. As análises aqui descritas foram realizadas seguindo um *layout* completamente aleatório e utilizando pelo menos triplicadas biológicas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

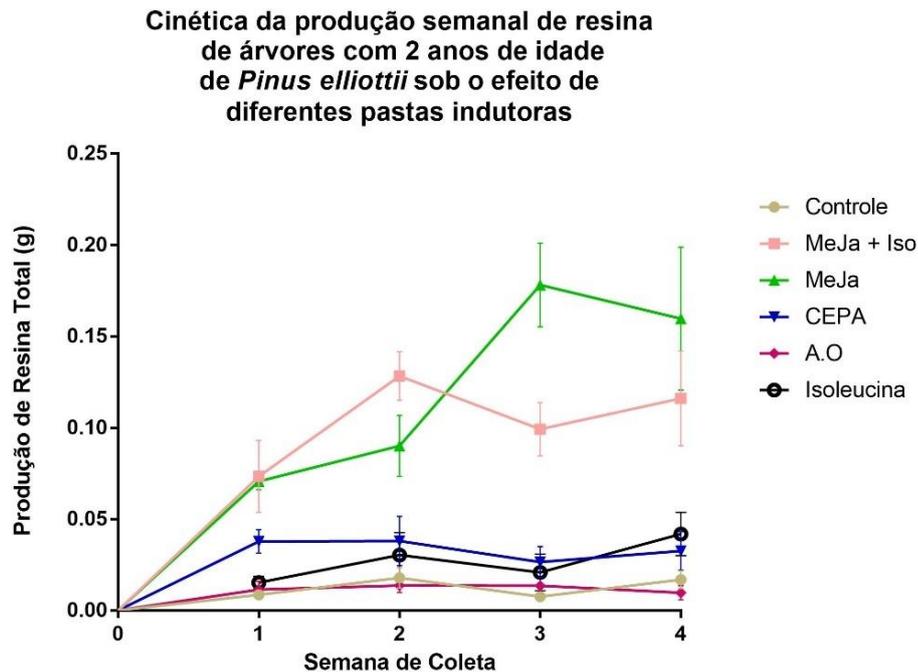
### 5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO TOTAL DE RESINA ENTRE OS TRATAMENTOS

A comparação da produção de resina total entre os tratamentos no primeiro experimento de resinagem ao longo do período testado (Figura 7) revelou que apenas plantas submetidas ao tratamento com Metil Jasmonato (MeJa), isolado ou em combinação com Isoleucina apresentaram produção de resina significativamente maior quando comparadas ao restante dos tratamentos. Plantas submetidas ao tratamento com CEPA e Isoleucina apresentaram aparentemente o segundo maior nível de produção, seguidos das plantas submetidas ao tratamento controle e com ácidos orgânicos, que apresentaram produção possivelmente menor. No entanto, nenhum dos demais tratamentos demonstrou diferença estatística significativa em relação ao controle. A análise cinética de produção ao longo das semanas também indicou maior produção de resina nos tratamentos contendo MeJa em relação aos demais tratamentos para estímulo à resinose (Figura 8).

**Produção de resina total de árvores com 2 anos de idade de *P. elliotii* após 4 semanas sob efeito de pastas indutoras com diferentes composições**



**Figura 7: Comparação da produção de resina após aplicação no ferimento de pastas com os adjuvantes CEPA (ET), Ácidos Orgânicos (AO), Isoleucina (Iso) Metil Jasmonato (MeJA), MeJA + Iso, ou pasta base sem adjuvante (controle).  $P < 0,05$ . Dados expressos em média + erro padrão da média.**



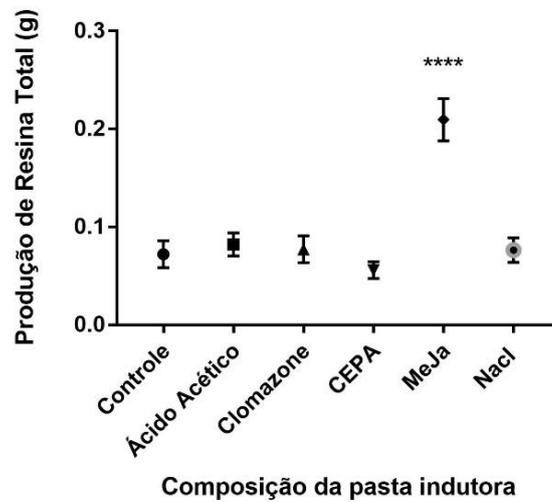
**Figura 8: Cinética de produção de resina** após aplicação no ferimento de pastas com os adjuvantes CEPA (ET), Ácidos Orgânicos (AO), Isoleucina (Iso) Metil Jasmonato (MeJA), MeJa + Iso, ou pasta base sem adjuvante (controle). Dados expressos em média + erro padrão da média.

Pastas contendo MeJa causaram aumento na produção de resina nas primeiras duas semanas, ocorrendo queda posterior para a pasta MeJa + Iso, mas não para a pasta apenas com MeJa. O tratamento com a pasta contendo CEPA causou pequena queda de produção da 2ª para a 3ª semana, ocorrendo pequeno aumento para a 4ª semana de tratamento, o mesmo ocorrendo para plantas tratadas com as pastas com Iso e Controle.

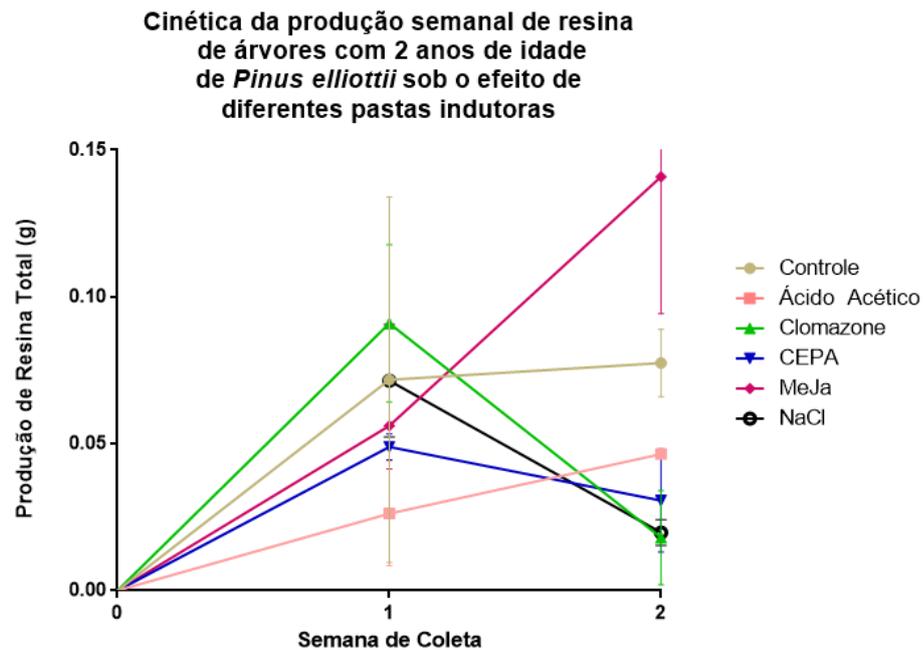
No segundo experimento, novas pastas foram analisadas, enquanto MeJa e CEPA foram mantidas para fins comparativos. Novamente, apenas as árvores tratadas com MeJa apresentaram produção de resina estatisticamente superior aos demais tratamentos (Figura 9). De fato, este estudo é o primeiro que avalia diretamente o efeito de MeJa na produção de resina em árvores jovens de *Pinus elliottii*. Plantas tratadas com Clomazone, porém, apresentaram um pico de produção na semana subsequente à aplicação da pasta (1ª Semana) (Figura 10),

decaindo posteriormente. Com base nesta observação, apesar das diferenças não serem significativas em relação ao controle, o experimento subsequente foi adaptado para reaplicação da pasta indutora após cada coleta a fim de avaliar a possibilidade de potencializar o efeito e verificar diferenças em possíveis padrões de produção.

**Produção de resina total de árvores com 2 anos de idade de *P. elliptii* após 2 semanas sob efeito de pastas indutoras com diferentes composições**



**Figura 9: Comparação da produção de resina total (segundo experimento) de duas semanas após aplicação no ferimento de pastas com os adjuvantes Ácido acético, Clomazone, CEPA, Metil Jasmonato (MeJA), Cloreto de Sódio (NaCl) ou pasta base sem adjuvante (Controle).  $P < 0,05$ . Dados expressos em média + erro padrão da média**



**Figura 10: Cinética da produção de resina (segundo experimento)** após aplicação no ferimento de pastas com os adjuvantes Ácido acético, Clomazone, CEPA, Metil Jasmonato (MeJa), Cloreto de Sódio (NaCl) ou pasta base sem adjuvante (Controle).  $P < 0,05$ . Dados expressos em média + erro padrão da média.

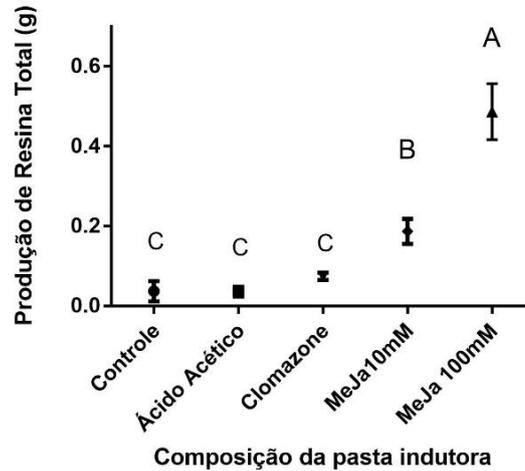
Apesar de estudos e experimentos sobre pastas indutoras buscarem adjuvantes que sejam mais baratos do que aqueles utilizados na indústria atualmente (DA SILVA RODRIGUES-CORREA; FETT-NETO, 2013; RODRIGUES-CORRÊA; DE LIMA; FETT-NETO, 2013), MeJa possui um excelente desempenho estimulando a resinose de árvores jovens de *Pinus*. Seu custo é aproximadamente 4 vezes maior do que CEPA, porém, mediante possíveis diminuições na concentração de MeJa na pasta, talvez o seu uso venha a ser vantajoso na relação “custo x benefício”.

Após experimentos anteriores realizados por nosso grupo, constatou-se que MeJa 100 mM induziu maior teor de resinose em plantas de 1 ano de idade (dados não mostrados). Porém a concentração de 10 mM de MeJa já pode induzir a síntese de terpeno sintases e inclusive aumentar a concentração de monoterpenos quando comparado com tratamentos de 100 mM (MARTIN, 2002). Então, no terceiro ensaio foi utilizada também a concentração de 10mM para

os experimentos de resinagem e avaliação dos efeitos sobre a produção de resina. Os tratamentos de MeJa 100 mM, Clomazone foram mantidos e Ácido Acético sofreu um aumento para 50% de concentração na pasta.

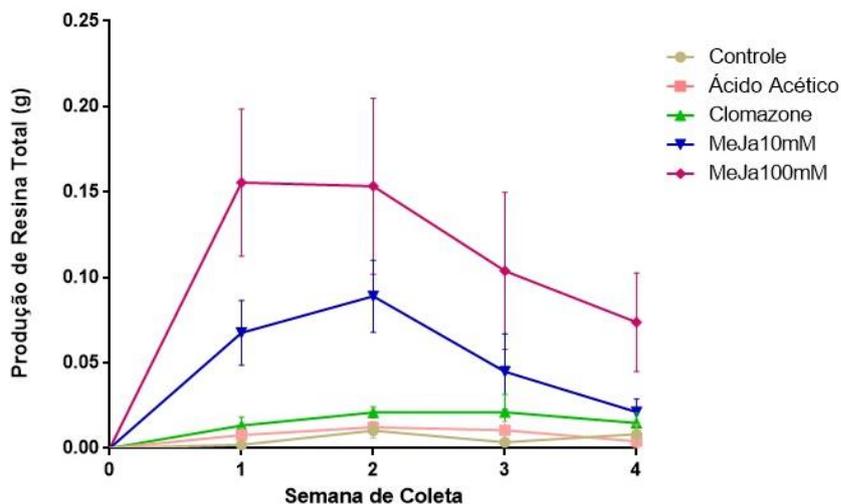
A pasta contendo MeJa 10 mM induziu resinagem maior do que todos os tratamentos, exceto MeJa 100 mM que novamente foi a concentração com maior teor de resina produzida (Figura 11). Os dados cinéticos (Figura 12) revelaram que a reaplicação da pasta, apesar de produzir mais resina bruta ao final do experimento comparado aos experimentos anteriores, pode não ser benéfica a longo prazo quanto à exsudação de resina, fazendo com que as árvores atinjam um pico de produção mais rapidamente e que decaia nas semanas seguintes devido a um efeito que aparenta ser oriundo de estresse. MeJa 100 mM manteve uma produção relativamente constante até a segunda semana, ocorrendo queda nas semanas seguintes. MeJa 10 mM aumentou a produção da primeira para a segunda semana, porém apresentou um efeito de decaimento análogo a MeJa 100 mM nas semanas seguintes. A reaplicação da pasta com Clomazone, no entanto, fez com que a produção de resina se manteve relativamente constante, eliminando o efeito efêmero observado no experimento anterior. Os demais tratamentos apresentaram pequeno aumento até a segunda semana e depois a produção decaiu.

**Produção de resina total de árvores com 2 anos de idade de *P. elliottii* após 4 semanas sob efeito de pastas indutoras com diferentes composições**



**Figura 11: Comparação da produção de resina (terceiro experimento)** de quatro semanas após aplicação no ferimento de pastas com os adjuvantes Ácido Acético 50%, Clomazone, Metil Jasmonato 10 mM (MeJA 10mM), Metil Jasmonato 100 mM (MeJA 100mM) ou pasta base sem adjuvante (Controle). Dados expressos em média + erro padrão da média. Tratamentos compartilhando uma ou mais letras apresentam equivalência estatística.

**Cinética da produção semanal de resina de árvores com 2 anos de idade de *Pinus elliottii* sob o efeito de diferentes pastas indutoras**



**Figura 12: Cinética da Comparação da produção de resina (terceiro experimento)** após aplicação no ferimento de pastas com os adjuvantes Ácido Acético 50%, Clomazone, Metil Jasmonato 10 mM (MeJa 10mM),

Metil Jasmonato 100 mM (MeJA 100mM) ou pasta base sem adjuvante (Controle). Dados expressos em média + erro padrão da média.

O efeito promotor de MeJA sobre a resinose de *Pinus* jovens foi evidente. Um cálculo relativamente simples pode ajudar na discussão sobre a viabilidade comercial e o custo de uma pasta contendo 100 mM de MeJA quando comparamos com CEPA 3%, utilizado atualmente. A cada aplicação em plantas adultas, aproximadamente 3 mL de pasta saem da bisnaga e são colocadas sobre o ferimento na árvore. O custo aproximado de cada aplicação comparando cada pasta pode ser estimado. Considerando a densidade da mistura base da pasta de água e glicerol (1:1) sendo de aproximadamente 1,10g/mL temos que:

$$\text{Massa de aplicação: } 3 \text{ mL} \times \frac{1,1 \text{ g}}{\text{mL}} \cong 3,3 \text{ g}$$

Para CEPA 3%, o custo/aplicação pode ser calculado com:

$$\text{Massa de CEPA/aplicação: } 0,1 \text{ g}$$

$$\text{Custo/aplicação: } 0,0001 \text{ kg} \times 1.154 \frac{\text{US\$}}{\text{kg}} \cong \mathbf{0,12 \text{ US\$}}$$

O custo estimado por aplicação para a pasta de MeJA 100 mM (utilizado em solução vendida separadamente) também pode ser obtido:

$$\text{Volume de aplicação: } 3 \text{ mL}$$

$$\text{Massa Molar: } 224,3 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa de MeJA/aplicação: } 0,67 \text{ g}$$

$$\text{Custo/aplicação: } 0,00067 \text{ kg} \times 4.584 \frac{\text{US\$}}{\text{kg}} \cong \mathbf{3,07 \text{ US\$}}$$

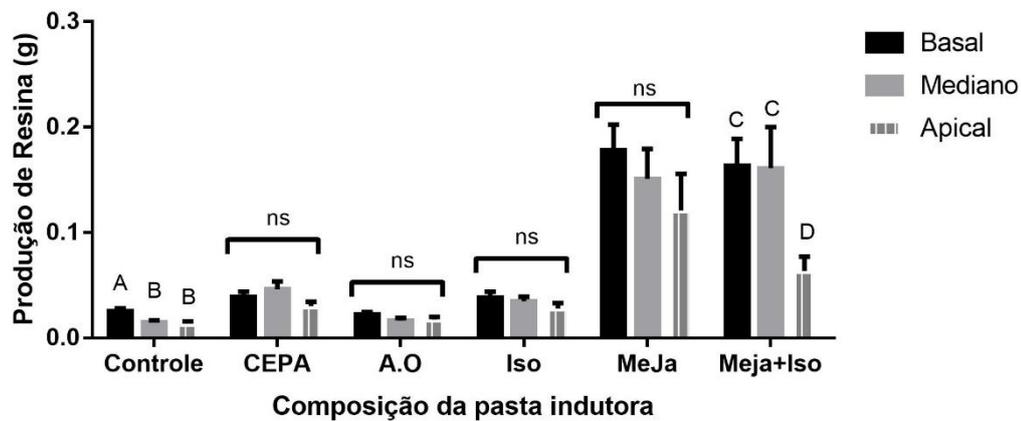
Portanto, a aplicação de MeJA custa cerca de 26 vezes mais do que a de CEPA 3%. O uso da concentração de 10mM pode reduzir este valor para 2,6 vezes. É verdade também que MeJA induziu em média mais do que o dobro de produção de resina estimulada por CEPA nos experimentos realizados neste trabalho (Figuras 7 e 9). A combinação de resultados experimentais com os custos calculados sugere que, apesar de mais caro inicialmente, MeJA em baixa concentração pode induzir aproximadamente o dobro de resina quando comparado com o principal indutor utilizado de pastas comerciais, pelo menos no sistema experimental testado.

Maiores concentrações de CEPA podem ser testadas nas plantas visto o seu custo ser inferior, porém a concentração utilizada nos experimentos já é a mesma empregada comercialmente em áreas de plantio com plantas adultas. A confirmação dos resultados obtidos em plantas adultas comparando CEPA 3% *versus* MeJa 100 mM complementar a constatação do potencial biotecnológico do último como indutor de resinose em áreas de plantio de *Pinus* para produção comercial. É importante ressaltar, no entanto, que os resultados no sistema de microresinagem precisam ser avaliados em campo com florestas comerciais. Levando-se em conta que CEPA é eficaz em sistema de produção com árvores adultas, mas pouco eficiente em sistema de microrresinagem, é possível que o potencial indutor de resinose de MeJa em plantas adultas seja expressivamente maior do que em plantas jovens.

## 5.2 DIFERENÇAS DE PRODUÇÃO NO PONTO DE APLICAÇÃO DA PASTA

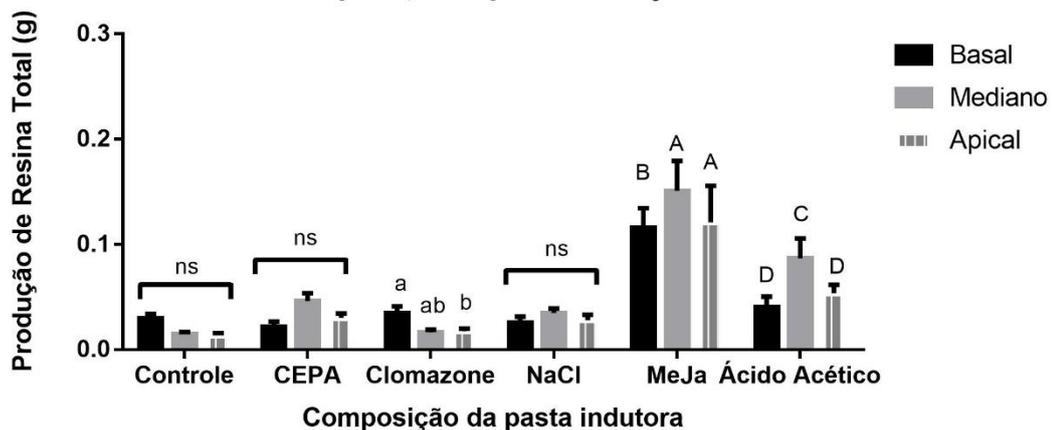
A produção de resina nos diferentes pontos de aplicação no primeiro experimento de resinagem foi maior que nos pontos mediano e basal comparados ao ponto apical (Figura 13). Esta tendência geral foi significativa no tratamento controle e na associação MeJa + Iso. As demais pastas não apresentaram diferença estatística entre os pontos. As composições contendo Jasmonato (MeJa e MeJa + Iso) mostraram maior produção de resina em todos os pontos quando comparadas às demais. A análise de resinose por ponto do segundo ensaio revelou que a produção de resina foi maior nos pontos mediano e basal (Figura 14).

**Efeito sobre a resinose:  
Composição x ponto de injúria**



**Figura 13: Produção de resina (experimento 1) em ferimentos feitos em diferentes alturas do caule** (basal, mediano, apical) tratados com pastas com os adjuvantes CEPA, Ácidos Orgânicos (AO), Isoleucina (Iso) Metil Jasmonato (MeJA), MeJA + Iso, ou pasta base sem adjuvante (controle). Dados expressos em média + erro padrão da média. Barras compartilhando uma ou mais letras apresentam equivalência estatística. “ns” – não significativo.

**Efeito sobre a resinose:  
Composição x ponto de injúria**

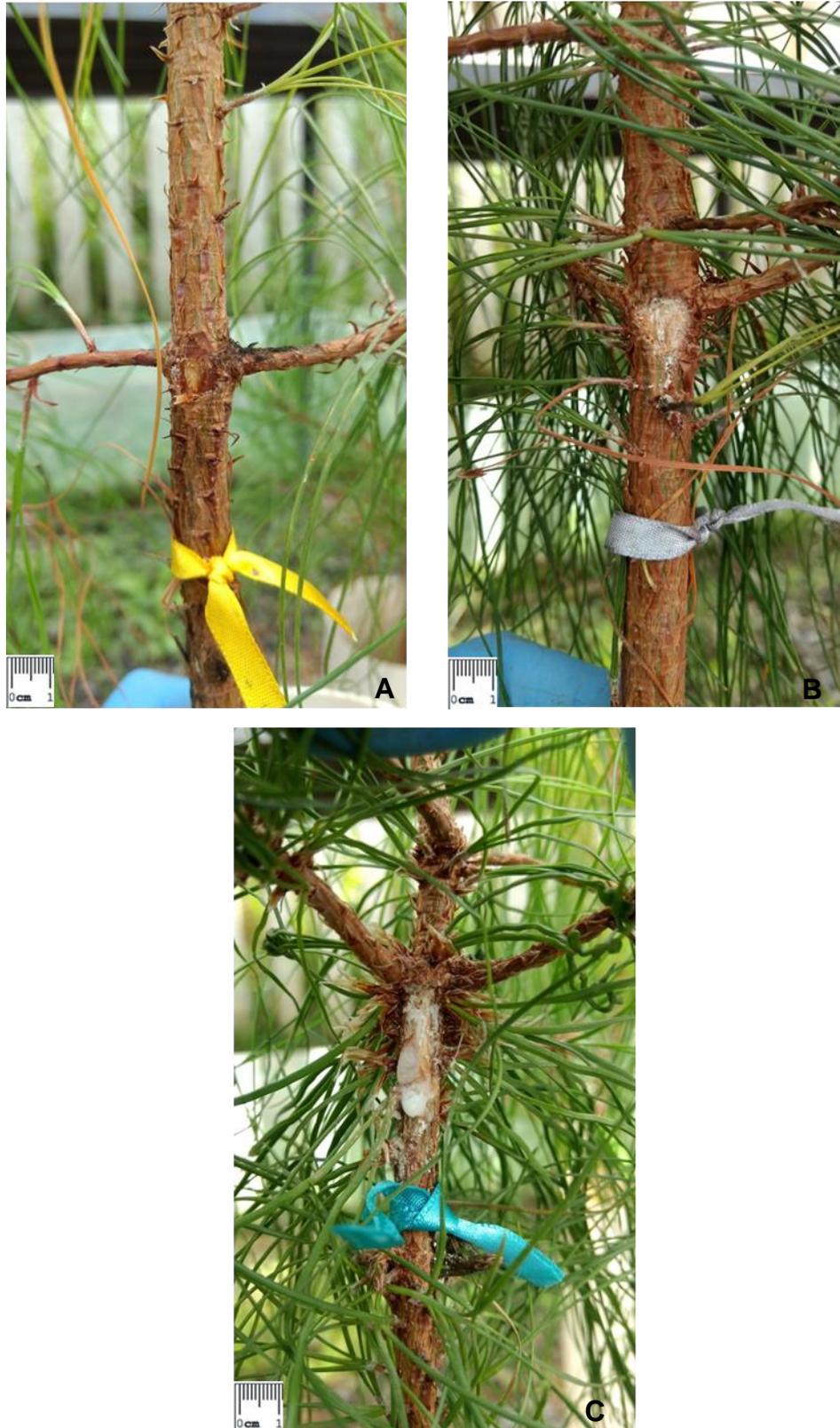


**Figura 14: Produção de resina (experimento 2) em ferimentos feitos em diferentes pontos do caule** (basal, mediano, apical) tratados com pastas com os adjuvantes CEPA, Clomazone, NaCl, Metil Jasmonato (MeJa), Ácido Acético, ou pasta base sem adjuvante (controle). Dados expressos em média + erro padrão da média. Barras compartilhando uma ou mais letras apresentam equivalência estatística. “ns” – não significativo.

Experimentos futuros de resinose, assim como realizado no terceiro ensaio desta série, poderão utilizar apenas a região mediano-basal do caule para a realização do ferimento e aplicação da pasta indutora.

### 5.3 EFEITO OBSERVADO NA REGENERAÇÃO DE TECIDOS DO CAULE

Ao longo do primeiro experimento de resinose, a pasta contendo AO causou um efeito distinto no caule das árvores onde a pasta foi aplicada. O tecido apresentou aparente regeneração acelerada quando comparado com outros tratamentos (Figura 15 e Figura S1).



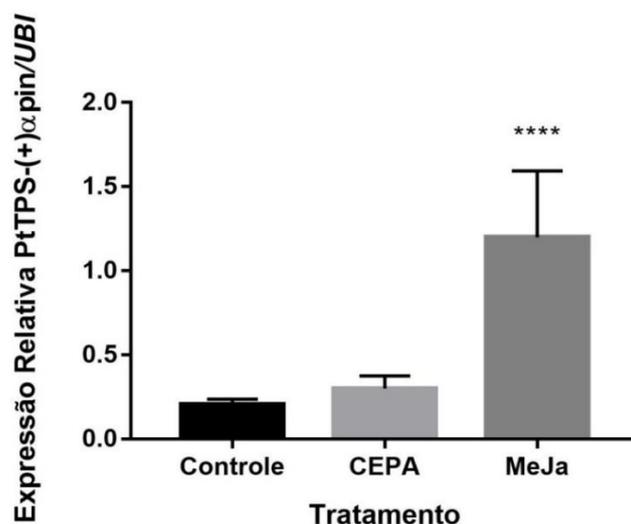
**Figura 15: Efeito de regeneração observado** A. As árvores tratadas com a pasta contendo AO apresentaram possivelmente um efeito de regeneração ao final do experimento, exsudando pouca ou nenhuma resina no local

afetado, além da formação aparente de tecido jovem na 4ª semana de coleta diferente de outros tratamentos como B. Controle e C. MeJa + Iso.

O local afetado com a pasta contendo AO apresentou pouca ou nenhuma resinose ao final do experimento. O desenvolvimento de uma pasta que estimule a regeneração mais acelerada de tecido no local afetado em plantas também pode ser interessante para outras aplicações. Hirano e colaboradores (1996) descrevem a regeneração de tecido em camélias através da aplicação de quitina no local do dano. A regeneração de tecido mais eficiente protege a planta do ataque de fungos patogênicos, estimula a cicatrização em enxertias e outros tipos de ferimentos (NEELY, 1988; HIRANO et al., 1996; MELNYK, 2017).

#### 5.4 EXPRESSÃO GÊNICA DE $\alpha$ -pineno SINTASE

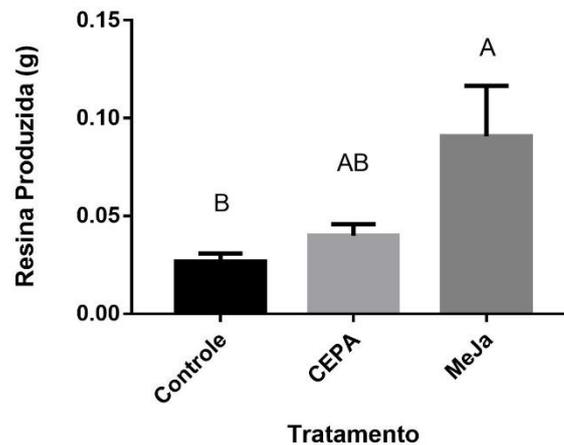
A comparação da expressão gênica entre os tratamentos apresentou diferença na expressão de gene codificador de uma  $\alpha$ -pineno sintase (Primer “*PtTPS-(+) $\alpha$ pin*”). As plantas tratadas com MeJa apresentaram maior expressão quando comparadas com Controle e CEPA (Figura 16).



**Figura 16:** Expressão de relativa de  $\alpha$ -pineno sintase entre diferentes tratamentos de pasta indutora com os adjuvantes CEPA, Metil Jasmonato (MeJA) ou controle sem adjuvante.  $P < 0,05$ .

O resultado de expressão relativa indica que MeJa pode induzir um aumento mais acentuado da expressão de genes cujas enzimas estão envolvidas na rota de biossíntese de terpenos. A enzima  $\alpha$ -pineno sintase está envolvida na produção de compostos majoritários presentes na resina de *Pinus*, e a maior expressão de seu respectivo RNA mensageiro estaria relacionada com maior teor resinífero nas árvores. O resultado é confirmado quando analisamos o teor de produção de resina pelas mesmas árvores (Figura 17).

**Produção de resina total de árvores com 2 anos de idade de *P. elliotii* após 5 dias sob efeito de pastas indutoras com diferentes composições**



**Figura 17: Produção de resina após 5 dias** da incisão do ferimento entre diferentes tratamentos de pasta indutora com os adjuvantes CEPA, Metil Jasmonato (MeJa) ou controle sem adjuvante.  $P < 0,05$ . Tratamentos compartilhando uma ou mais letras apresentam equivalência estatística. Dados expressos em média + erro padrão.

Apesar da coleta ter sido feita sete dias após a aplicação das pastas para os experimentos de resinagem, cinco dias foram suficientes para observar diferenças estatísticas neste parâmetro para plantas tratadas com MeJa em comparação aos outros tratamentos. É importante também considerar que ocorrem outros níveis de regulação não transcricionais na biossíntese de resina, bem como há provável envolvimento de outras isoformas de alfa-pineno sintase na produção do monoterpene  $\alpha$ -pineno (DE LIMA et al., 2016).

## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

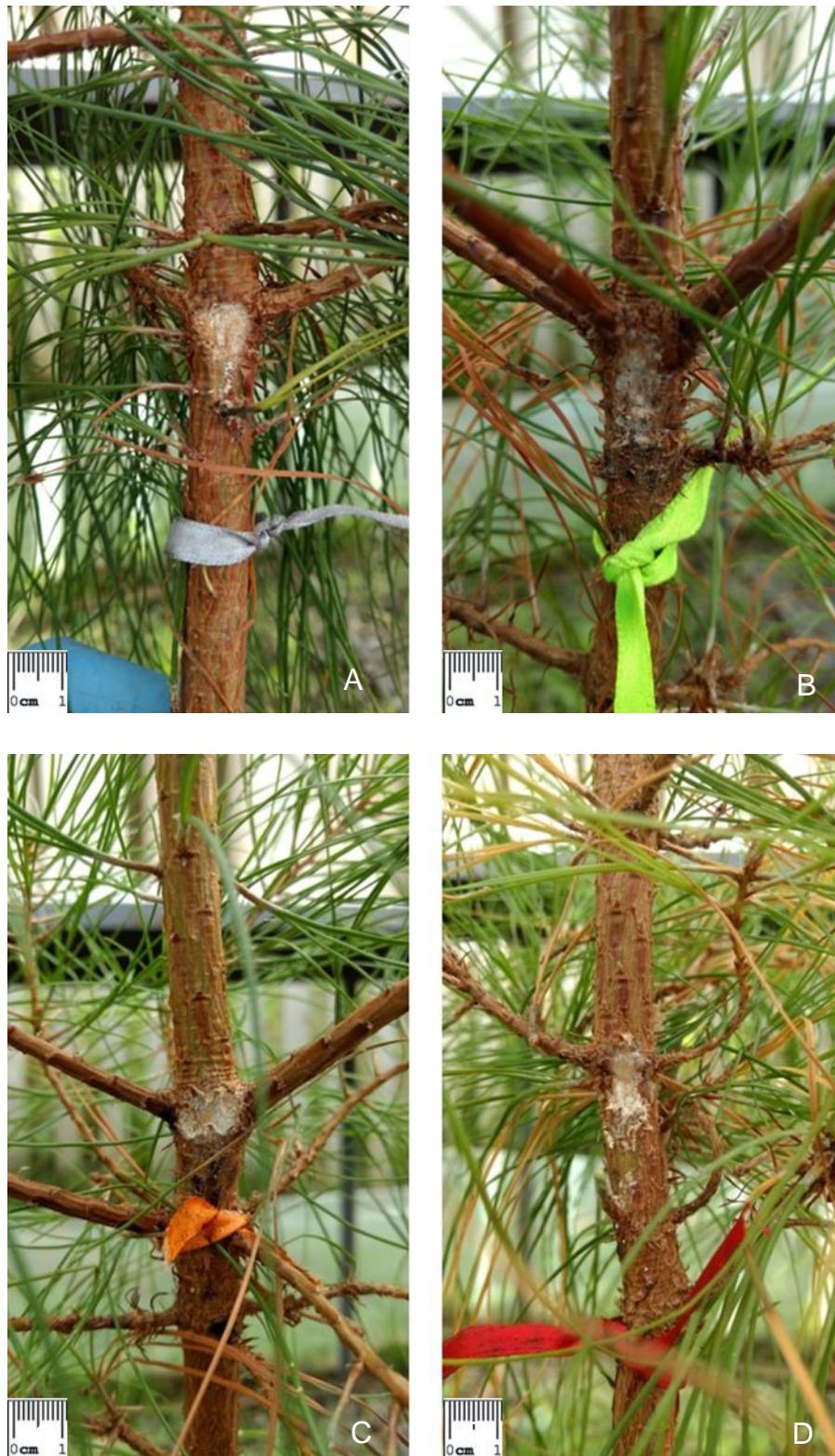
MeJa é um potente indutor de defesa em plantas, estimulando a geração de novos dutos de resina em coníferas, induzindo aumento na expressão de terpeno sintases (MARTIN, 2002, 2003; HUDGINS; FRANCESCHI, 2004; MILLER et al., 2005; WASTERACK; HAUSE, 2013) e conseqüentemente maior acúmulo de resina, conforme constatado neste trabalho. Ambas as pastas contendo MeJa causaram aumentos na produção de resina significativamente superiores às demais e sua reaplicação semanal também favoreceu maior produção de resina bruta, porém com aparente efeito de estresse nas plantas com o passar do tempo, resultando em queda de produção. Este trabalho mostrou correlação da aplicação de MeJa em fermento e produção de resina. A utilização de MeJa em pastas comerciais dependerá de testes em plantas adultas em idade comercial para aferir a produção de resina e compará-la com valores comerciais.

Apesar de consolidado como adjuvante na indústria, CEPA pode ter um desempenho inferior a MeJa em plantas adultas visto que a diferença de produção entre os indutores foi de aproximadamente duas vezes no sistema de microrresinagem, porém esses resultados apenas podem ser confirmados mediante experimentos em campo. Foi verificado também que é possível observar diferença estatística de produção de resina e comparar o efeito resinífero em plantas jovens, sendo possível reduzir custos com testes envolvendo muitos adjuvantes relativamente ao trabalho com florestas de *Pinus* adultas. O sistema de microrresinagem parece ser menos sensível à estimulação, possivelmente por plantas jovens possuírem perfis de produção distintos daqueles de plantas adultas, de modo que somente adjuvantes mais potentes são distinguidos. De qualquer forma, este maior limiar de detecção da atividade promotora de resinose não deixa de ser válido em termos de maiores chances de sucesso de utilização em sistema comercial.

Também foi possível analisar a efetividade de diferentes pastas indutoras em um curto período, permitindo que apenas os adjuvantes com efeito promissor futuramente avancem a testes em plantas adultas para extração comercial de resina. A análise da expressão gênica do gene

codificador de uma enzima terpeno-sintase envolvida na biossíntese de um monoterpeno majoritário apontou correlação molecular com os dados de produção de resina. Ensaios futuros poderão envolver a análise de diferentes concentrações de compostos como MeJa e CEPA, bem como diferentes combinações de adjuvantes. Testes de expressão gênica para diferentes enzimas envolvidas na rota de biossíntese de terpenos ajudarão a elucidar mais detalhadamente diferenças pontuais de expressão entre os tratamentos. Por fim, a comparação do perfil de resinose basal entre indivíduos avaliados no sistema de microrresinose pode fornecer uma maneira mais rápida e relativamente precoce de identificar indivíduos superresinosos.

## 7 FIGURAS SUPLEMENTARES





**Figura S1. Fotografias comparativas entre os tratamentos do primeiro experimento. A: Controle; B: CEPA; C: Isoleucina; D: Metil Jasmonato; E: Metil Jasmonato + Isoleucina; F: Ácidos Orgânicos.**

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFRED, S. P. M. **Activating composition for the tapping of trees** Google Patents, , 1975. . Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US3858354>>.

**ARESB “ASSOCIAÇÃO DOS RESINADORES DO BRASIL”.**

B, A. A. **Producing extractive materials from living trees** Google Patents, , 1952. . Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US2612000>>.

CAPITANI, L. R. PRIMEIROS RESULTADOS DO USO DE ETHREL NA RESINAGEM DE *Pinus caribaea* var. *hondurensis* NA REFLORESTADORA SACRAMENTO “RESA” LTDA. **Circular Técnica Ipef**, n. 147, p. 1–5, 1982.

CLEMENTS, R. W. **Composition and method for stimulating flow of pine gum** Google Patents, , 1967. . Disponível em: <<https://encrypted.google.com/patents/US3359681>>.

COPPEN, J.; HONE, G. **Non-wood forest products, vol 2**. [s.l.] Natural Resources Institute, FAO, Rome, 1995.

CUNNINGHAM, A. Pine resin tapping techniques. In: **Pine Resin: Biology, Chemistry and Applications**. [s.l.: s.n.]

DA SILVA RODRIGUES-CORREA, K. C.; FETT-NETO, A. G. Seasonality and chemical elicitation of defense oleoresin production in field-grown slash pine under subtropical climate. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 1, p. 56–61, 2013.

DA SILVA RODRIGUES, K. C.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; FETT-NETO, A. G. Efficient oleoresin biomass production in pines using low cost metal containing stimulant paste. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 10, p. 4442–4448, 2011.

DE LIMA, J. C.; DE COSTA, F.; FÜLLER, T. N.; RODRIGUES-CORRÊA, K. C. da S.; KERBER, M. R.; LIMA, M. S.; FETT, J. P.; FETT-NETO, A. G. Reference Genes for qPCR Analysis in Resin-Tapped Adult Slash Pine As a Tool to Address the Molecular Basis of Commercial Resinosis. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. June, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00849/abstract>>.

DE VEGA-BARTOL, J. J.; SANTOS, R. R.; SIMÕES, M.; MIGUEL, C. M. Normalizing gene expression by quantitative PCR during somatic embryogenesis in two representative conifer species: *Pinus pinaster* and *Picea abies*. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 5, p. 715–729, 2013.

DUKE, S. O.; PAUL, R. N. Effects of Dimethazone (FMC 57020) on chloroplast development. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 25, p. 1–10, 1986.

E, O. C.; S, S. C. **Method of increasing and prolonging the flow of oleoresin from trees** Google Patents, , 1948. Disponível em: <<https://encrypted.google.com/patents/US2435724>>.

FÄLDT, J.; MARTIN, D.; MILLER, B.; RAWAT, S.; BOHLMANN, J. . Traumatic resin defense in Norway spruce (*Picea abies*): Methyljasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and functional characterization of (+)-3-carene synthase. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 119–133, 2003.

FERREIRA, A. G.; FIOR, C. S.; GUALTIERI, S. C. J. Oleoresin yield of *pinus elliottii* engelm seedlings. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 4, p. 313–316, 2011.

FETT-NETO, A.; RODRIGUES-CORRÊA, K. Physiological control of pine resin production - In: Pine Resin: Biology, Chemistry and Applications. In: FETT-NETO, A. ; RODRIGUES-CORREA, K. (Ed.). **Pine Resin: Biology, Chemistry and Applications**. [s.l: s.n.]p. 25–48.

FONSECA, S.; CHINI, A.; HAMBERG, M.; ADIE, B.; PORZEL, A.; KRAMELL, R.; MIERSCH, O.; WASTERNAK, C.; SOLANO, R. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 344–350, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nchembio.161>>.

FRANCESCHI, V. R.; KREKLING, T.; CHRISTIANSEN, E. Application of methyl jasmonate on *Picea abies* (Pinaceae) stems induces defense-related responses in phloem and xylem. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 4, p. 578–586, 2002.

GRISSINO-MEYER, H. D.; BLOUNT, H. C.; MILLER, A. C. Tree-ring dating and the ethnohistory of the naval stores industry in southern Georgia. **Tree-Ring Research**, v. 57, n. 1, p. 3–13, 2001.

HIRANO, S.; KITAURA, S.; SASAKI, N.; SAKAGUCHI, H.; SUGIYAMA, M.; HASHIMOTO, K.; TANATANI, A. Chitin Biodegradation and Wound Healing in Tree Bark Tissues. v. 4, n. 4, p. 261–265, 1996.

HUDGINS, J. W.; FRANCESCHI, V. R. 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**, v. 135, n. 4, p. 2134–2149, 2004.

KELKAR, V. M.; GEILS, B. W.; BECKER, D. R.; OVERBY, S. T.; NEARY, D. G. How to recover more value from small pine trees: Essential oils and resins. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 4, p. 316–320, 2006.

KIM, J. M.; TO, T. K.; MATSUI, A.; TANOI, K.; KOBAYASHI, N. I.; MATSUDA, F.; HABU, Y.; OGAWA, D.; SAKAMOTO, T.; MATSUNAGA, S.; BASHIR, K.; RASHEED, S.; ANDO, M.; TAKEDA, H.; KAWAURA, K.; KUSANO, M.; FUKUSHIMA, A.; ENDO, T. A.; KUROMORI, T.; ISHIDA, J.; MOROSAWA, T.; TANAKA, M.; TORII, C.; TAKEBAYASHI, Y.; SAKAKIBARA, H.; OGIHARA, Y.; SAITO, K.; SHINOZAKI, K.; DEVOTO, A.; SEKI, M. Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. **Nature Plants**, v. 3, n. June, p. 4–10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nplants.2017.97>>.

LANGENHEIM, J. Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany. **Timber Press, Portland/Cambridge**, 2003.

LEWINSOHN, E.; GIJZEN, M.; MUZIKA, R. M.; BARTON, K.; CROTEAU, R. Oleoresinosis in grand fir (*Abies grandis*) saplings and mature trees. **Plant physiology**, v. 101, n. 3, p. 1021–1028, 1993. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=158721&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOMBARDERO, M. J.; AYRES, M. P.; AYRES, B. D. Effects of fire and mechanical wounding on *Pinus resinosa* resin defenses, beetle attacks, and pathogens. **Forest Ecology and**

**Management**, v. 225, n. 1–3, p. 349–358, 2006.

MARCO A. DE O. GARRIDO, ROGÉRIO DAL POZ, J. A. de F.; FINÊ T. ROCHA, L. M. do A. G. G. **RESINAGEM: Manual Técnico**. [s.l: s.n.]

MARTIN, D. Methyl Jasmonate Induces Traumatic Resin Ducts, Terpenoid Resin Biosynthesis, and Terpenoid Accumulation in Developing Xylem of Norway Spruce Stems. **Plant Physiology**, v. 129, n. 3, p. 1003–1018, 2002. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.011001>>.

MARTIN, D. M. Induction of Volatile Terpene Biosynthesis and Diurnal Emission by Methyl Jasmonate in Foliage of Norway Spruce. **Plant Physiology**, v. 132, n. 3, p. 1586–1599, 2003. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.103.021196>>.

MELNYK, C. W. Plant grafting: insights into tissue regeneration. **Regeneration**, v. 4, n. 1, p. 3–14, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/reg2.71>>.

MIGLIORINI, A. .; BRITO, J. .; BARRICHELO, L. E. . Qualidade da resina de espécies de Pinus implantadas no Estado de Minas Gerais: análise do breu e terebintina. **IPEF. Circular Tecnica, Piracicaba**, v. 105, p. 1–4, 1980.

MILLER, B.; MADILAO, L. L.; RALPH, S.; M, M. S. L. B.; B, F. S. J. Insect-Induced Conifer Defense . White Pine Weevil and Methyl Jasmonate Induce Traumatic Resinosis , de Novo Formed Volatile Emissions , and Accumulation of Terpenoid Synthase and Putative Octadecanoid Pathway Transcripts in Sitka Spruce 1 [ w ]. v. 137, n. January, p. 369–382, 2005.

NEELY, D. Tree wound closure. **Journal of arboriculture (USA)**, n. October, p. 148–152, 1988. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1989/US/US89520.xml;US8849885>>.

LOUDON, A. Études sur le gemmage des pins en France. Annales de l'école nationale des eaux et forêts et de la station de recherches et expériences. 1938.

PAUL, T. K. Research on the Improvement of Efficiency of Turpentine Practices. 2004.

**Pine Chemicals Association**. Disponível em: <<http://www.pinechemicals.org/?page=historypca>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; LEKANNE DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

RODRIGUES-CORRÊA, K. C. da S. Resina de Pinus no Sul do Brasil: Caracterização e Perspectivas. **Revista da Madeira**, v. 116, 2008.

RODRIGUES-CORRÊA, K. C. da S.; DE LIMA, J. C.; FETT-NETO, A. G. Pine oleoresin: tapping green chemicals, biofuels, food protection, and carbon sequestration from multipurpose trees. **Food and Energy Security**, v. 1, n. 2, p. 81–93, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/fes3.13>>.

RODRIGUES-CORRÊA, K. C. da S.; DE LIMA, J. C.; FETT-NETO, A. G. Natural Products. p. 4037–4060, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-22144-6>>.

RODRIGUES, K. C. S.; AZEVEDO, P. C. N.; SOBREIRO, L. E.; PELISSARI, P.; FETT-NETO, A. G. Oleoresin yield of *Pinus elliottii* plantations in a subtropical climate: Effect of tree diameter, wound shape and concentration of active adjuvants in resin stimulating paste. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 3, p. 322–327, maio 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669007001677>>.

RODRIGUES, K. C. S.; FETT-NETO, A. G. Oleoresin yield of *Pinus elliottii* in a subtropical climate: Seasonal variation and effect of auxin and salicylic acid-based stimulant paste. **Industrial Crops and Products**, v. 30, n. 2, p. 316–320, 2009.

ROME: NATURAL RESOURCES INSTITUTE. **FAO. Flavor and fragrances of plant origin (Non-Wood Forest Products 1)**. [s.l: s.n.]

SMITA BHATIA. Global Impact of the Modern Pine Chemical Industry. 2016 ([http://c.ymcdn.com/sites/www.pinechemicals.org/resource/resmgr/studies/pca-\\_global\\_impact\\_of\\_the\\_mo.pdf](http://c.ymcdn.com/sites/www.pinechemicals.org/resource/resmgr/studies/pca-_global_impact_of_the_mo.pdf)) access January 23, 2018.

SPLITTER, H.; KUBLUN, H.; HESSENLAND, M. **Method of producing resin from trees** Google Patents, , 1936. Disponível em: <<https://encrypted.google.com/patents/US2053031>>.

**Statistics on Worldwide Imports & Exports of Pine Chemicals.** [s.l: s.n.]

STEELE, C. L.; KATOH, S.; BOHLMANN, J.; CROTEAU, R. Regulation of Oleoresinosis in Grand Fir (*Abies grandis*): Differential Transcriptional Control of Monoterpene, Sesquiterpene, and Diterpene Synthase Genes in Response to Wounding. **Plant Physiology**, v. 116, n. 4, p. 1497–1504, 1998. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/116/4/1497.abstract>>.

STUBBS, J.; ROBERTS, D.; OUTCALT, K. **Chemical Stimulation of Lightwood in Southern Pines.** [s.l: s.n.].

TELEWSKI, F. W.; WAKEFIELD, A. H.; JAFFE, M. J. Computer-assisted image analysis of tissue of ethrel-treated *Pinus taeda* seedlings. **Plant Physiology**, v. 72, p. 177–181, 1983.

WASTERNAK, C. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of Botany**, v. 100, n. 4, p. 681–697, 2007.

WASTERNAK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1021–1058, 2013.

WOLTER, K. E.; PETERS, W. J.; ROBERTS, D. R.; MCREYNOLDS, R. D.; BROOMFIELD, J.; CREWS, E. R. **Process for increasing oleoresin synthesis in pinus species** Google Patents, , 1980. . Disponível em: <<https://www.google.com/patents/US4203253>>.