

LAYS ARAÚJO NERY

**ANATOMIA E ULTRAESTRUTURA DE SÍTIOS DE SÍNTESE DE ÓLEO
ESSENCIAL E CULTIVO DE VITROPLANTAS DE *Polygala paniculata* L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

N455a
2017 Nery, Lays Araújo, 1988-
Anatomia e ultraestrutura de sítios de síntese de óleo
essencial e cultivo de vitroplantas de *Polygala paniculata* L. /
Lays Araújo Nery. – Viçosa, MG, 2017.
ix, 69f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marília Contin Ventrella.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Plantas medicinais. 3.
Polygala paniculata. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação
em Botânica. II. Título.

CDD 22 ed. 661.806

LAYS ARAÚJO NERY

ANATOMIA E ULTRAESTRUTURA DE SÍTIOS DE SÍNTESE DE ÓLEO
ESSENCIAL E CULTIVO DE VITROPLANTAS DE *Polygala paniculata* L.

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Botânica, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 31 de março de 2017.



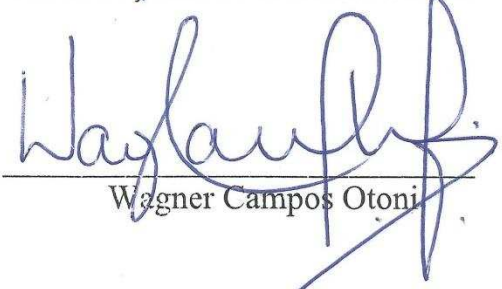
Diego Silva Batista



Victor Peçanha de Miranda Coelho



Edgard Augusto de Toledo Picoli



Wagner Campos Otoni



Marília Contin Ventrella
(Orientadora)

Aos meus pais Geraldo e Rita e às minhas irmãs, Nayara e Mariana.
Pelo amor com que sempre esperaram meu retorno,
ofereço.

Ao meu amor e amigo Humberto.
Pelo incentivo à construção e conclusão dessa etapa,
Por esperar com tamanha paciência e generosidade.
Por seu amor,
dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal, ao Programa de Pós-Graduação em Botânica e ao Laboratório de Anatomia Vegetal pela infraestrutura disponível e oportunidades de crescimento profissional.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro concedido durante o desenvolvimento do projeto.

Ao Instituto Federal do Norte de Minas Gerais (IFNMG) e ao Programa de Bolsas para Qualificação de Servidores (PBQS) pelo auxílio financeiro e incentivo à qualificação.

À professora Marília pela confiança depositada, pela disponibilidade e generosidade ao ensinar, por contribuir para meu crescimento ao longo desses seis anos. Obrigada pelo apoio em muitas decisões. Foram muitas as conversas em pude aprender muito. Há ensinamentos que vão além da vida profissional.

Ao professor Wagner Otoni. Obrigada por abrir um mundo novo para mim. Mundo *in vitro* enorme em suas possibilidades, desafiante e engrandecedor. Obrigada pelo ensinamento científico com humildade, por nos tratar com tamanha humanidade nesse período de aprendizado e nos conduzir a reflexões que nos tornem mais humanos. Paz!

Ao Victor Coelho, por quem tenho grande admiração. Agradeço pela amizade estabelecida, pela disponibilidade para ensinar e generosidade imensa dedicada a mim na construção desse trabalho.

A todos que em algum momento disponibilizaram um pouco do seu tempo e conhecimento para ajudar-me na realização dos trabalhos. Não poderia deixar de citar, de modo especial e cheio de gratidão, Anyela Ríos, Diego Batista, Matheus Costa, Priscila Oliveira Ruth Marques e Sérgio Souza.

Aos professores do Departamento de Biologia Vegetal (UFV) pelos valiosos ensinamentos.

Aos membros da banca pelas contribuições para a melhoria do trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV pela convivência e disponibilidade em ajudar. Em especial, às técnicas e amigas, Aurora Sato e Patrícia Fonseca, pelo profissionalismo constante e pelo carinho e amizade estabelecida.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT II), não somente pela infraestrutura, mas principalmente pela disponibilidade que tiveram ao ensinar, pela acolhida e agradável convívio.

Aos colegas, amigos e alunos do IFNMG, *campus* Araçuaí, pelo acolhimento, incentivo e colaboração para a conclusão dessa etapa.

Às amigas construídas em Viçosa: Andréa, Caroline, Cathie Delaveau, Deborah, Eliza, Isabel, Ivan, Katiúscia, Laísa, Ludmila, Marinalva, Martielly, Narah, Samara, Sara, Thaline, Tiago Augusto e Valéria. Os momentos de convivência extrapolaram o conhecimento científico e certamente me fizeram crescer. Levarei vocês para sempre comigo.

À Andréa Lanna, Caroline Jezler, Eliza Louback, Luana de Jesus, Samara Arcanjo e Valéria Fernandes por se fazerem presentes mesmo tão distantes, principalmente na fase final do trabalho.

À Itaina, João, Ludmila, Patrícia, Priscila e Rafael. Obrigada pelo caminho compartilhado.

Aos amigos de Montes Claros pelo apoio e por compreenderem minhas ausências. De modo especial, a Caroline e Claudiane, que sempre me surpreendiam com ligações e mensagens carregadas de carinho e apoio.

Aos meus familiares, aqui representados por minhas avós Cida e Mariana, pelo apoio incondicional.

Às minhas irmãs, Nayara e Mariana, pelo amor e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus pais, Rita e Geraldo, meu eterno amor e agradecimento simplesmente por serem o melhor que podiam como pais e pelos esforços para que eu tivesse o essencial ao meu crescimento como pessoa e profissional, mesmo em meio às dificuldades cotidianas. Amo vocês.

Ao meu marido, Humberto, por todo amor e carinho que, dedicou a mim, mesmo tão distantes fisicamente. Obrigada pelo silêncio necessário e pelas palavras adequadas em cada momento. Pelas esperas e confiança em mim e no meu trabalho. Te amo.

A Deus e Maria pelo amor, cuidado, coragem, provisão e sustento em cada momento da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO I: DUCK HEAD-LIKE TRICHOME AND OTHER SECRETORY SITES OF ESSENTIAL OILS IN <i>Polygala paniculata</i> L	7
ABSTRACT	7
INTRODUCTION	8
MATERIAL AND METHODS	9
RESULTS	11
DISCUSSION	25
CONCLUSIONS	31
REFERENCES	32
CAPÍTULO II: EFEITO DA QUALIDADE DA LUZ, AGENTES GELEIFICANTES E SACAROSE NO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> E MORFOANATOMIA FOLIAR DE <i>Polygala paniculata</i> L	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42
INTRODUÇÃO	43
MATERIAIS E MÉTODOS	46
RESULTADOS	48
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

RESUMO

NERY, Lays Araújo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Anatomia e ultraestrutura de sítios de síntese de óleo essencial e cultivo de vitroplantas de *Polygala paniculata* L.** Orientadora: Marília Contin Ventrella.

Polygala paniculata é uma espécie medicinal, cujo extrato das raízes é utilizado no tratamento de luxações, traumas e acidentes ofídicos, propriedades terapêuticas corroboradas pela ciência. A característica medicinal das plantas geralmente está relacionada à presença de estruturas secretoras especializadas na síntese, acúmulo e secreção de compostos com atividade terapêutica. Há relatos de tricomas, cavidades e células secretoras de óleos essenciais em *P. paniculata*. No entanto, pouco se sabe sobre o desenvolvimento, composição química e processo secretor dessas estruturas. Espécies com valor medicinal tem sido alvo de diferentes técnicas biotecnológicas como o cultivo *in vitro*, com vistas à maximização da produção de compostos bioativos. As espécies respondem de formas distintas à manipulação das condições *in vitro*, tais como qualidade de luz, agentes geleificantes e concentração de sacarose, o que pode resultar em alterações na qualidade das plantas e, conseqüentemente, da secreção produzida. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo (1) identificar e analisar o desenvolvimento e sítios secretoras de óleos essenciais; (2) investigar os aspectos subcelulares e mecanismos de síntese, acúmulo e liberação da secreção; (3) Comparar os aspectos ultraestruturais entre os sítios secretoras identificados; (4) avaliar os efeitos da manipulação de condições *in vitro* (qualidade da luz, agentes geleificantes e concentração de sacarose) sobre a anatomia foliar de *P. paniculata*. *Polygala paniculata* apresenta três sítios secretoras de óleos essenciais: tricomas nas folhas e caules, cavidades nas folhas e células corticais nas raízes. O desenvolvimento de tricomas e cavidades envolve o processo de morte celular programada. Tricomas, cavidades e células corticais de raiz têm a secreção composta por óleos essenciais. As características subcelulares das estruturas secretoras estudadas são semelhantes e estão relacionadas com a natureza química da secreção. No cultivo *in vitro*, os fatores avaliados alteraram a morfoanatomia foliar de *P. paniculata*. Os tratamentos com lâmpadas fluorescentes induziram o desenvolvimento de plântulas e a diferenciação anatômica semelhante àquela observada em plantas *ex situ*. Tratamentos com concentração de sacarose de 30 g L⁻¹ em ágar em 15 g L⁻¹ em Phytigel induziram o aumento da espessura foliar através da aumento do volume celular das células epidérmicas, do parênquima lacunoso e da

redução dos espaços intercelulares. O presente estudo elucidou o mecanismo estrutural e a secreção de óleos essenciais em *P. paniculata*. O efeito das condições *in vitro* no crescimento e anatomia foliar das espécies pode apreciar e subsistir para melhorar os protocolos de cultivo *in vitro* das espécies.

ABSTRACT

NERY, Lays Araújo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Anatomy and ultrastructure of essential oil synthesis sites and cultivation of vitroplants of *Polygala paniculata* L.** Advisor: Marília Contin Ventrella.

Polygala paniculata is a medicinal species, whose root extract is used in the treatment of dislocations, trauma and ophidian accidents, therapeutic properties corroborated by science. The medicinal characteristic of plants is usually related to the presence of secretory structures specialized in the synthesis, accumulation and secretion of compounds with therapeutic activity. There are reports of trichomes, cavities and secretory cells of essential oils in *P. paniculata*. However, little is known about the development, chemical composition and secretory process of these structures. Species with medicinal value have been the target of different biotechnological techniques such as *in vitro* cultivation, with a view to maximizing the production of bioactive compounds. Species respond in different ways to the manipulation of *in vitro* conditions, such as light quality, gelling agents and sucrose concentration, which can result in changes in the quality of the plants and, consequently, the secretion produced. Thus, the present study aimed to (1) identify and analyze the development and secretory sites of essential oils; (2) to investigate the subcellular aspects and mechanisms of synthesis, accumulation and release of secretion; (3) Compare the ultrastructural aspects between the identified secretory sites and (4) to evaluate the effects of manipulation of *in vitro* conditions (light quality, gelling agents and sucrose concentration) on the leaf anatomy of *P. paniculata*. *Polygala paniculata* presents three secretory sites of essential oils: trichomes in leaves and stems, cavities in leaves and cortical cells in roots. The development of trichomes and cavities involves the process of programmed cell death. Trichomes, cavities and cortical root cells have the secretion composed of essential oils. The subcellular characteristics of the secretory structures studied are similar and are related to the chemical nature of the secretion. In the *in vitro* culture, the factors evaluated altered the leaf morphoanatomy of *P. paniculata*. Fluorescent lamp treatments induced the development of seedlings and the anatomical differentiation similar to that observed in *ex situ* plants. Treatments with sucrose concentration of 30 g L⁻¹ in agar in 15 gL⁻¹ in Phytigel induced increase in leaf thickness by increasing the cell volume of epidermal cells, lacunar parenchyma and reduction of intercellular spaces. The present study elucidated the structural and

mechanism of the secretion of essential oils in *P. paniculata*. The effect of the *in vitro* conditions on the growth and foliar anatomy of the species can appreciate and subsist to improve in protocols of *in vitro* cultivation of the species.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Polygalaceae é popularmente reconhecida por apresentar espécies relacionadas a diferentes funções medicinais, tais como expectorante, sedativa e analgésica (Lorenzi & Mattos, 2002; Lapa *et al.* 2009). Dentro deste contexto, destaca-se *Polygala paniculata*, espécie nativa, herbácea, conhecida popularmente como “vicky”, “vassourinha branca”, “barba-de-São-Pedro”, “erva-iodex” e “gelolzinho” em função do aroma canforado facilmente percebido em suas raízes (Marques, 1988; Lorenzi & Mattos, 2002).

Relatos populares indicam que o uso tópico de extratos alcoólicos das raízes de *P. paniculata* é eficaz no tratamento de luxações, traumas e acidentes ofídicos (Lorenzi & Mattos, 2002). Estudos científicos com extratos da planta têm atestado atividades terapêuticas de *P. paniculata* citadas na medicina popular e indicado outras, tais como propriedades tripanocidas (Pizzolatti *et al.* 2002), antiinflamatórias e antiedematogênicas (Nogueira *et al.* 2005), analgésicas e antinociceptivas (Lapa *et al.* 2009). As funções medicinais atribuídas ao uso das raízes dessa espécie são associadas ao metil salicilato (MeSa), componente majoritário (89%) do óleo essencial, e que é reconhecido por apresentar propriedades antiinflamatórias, analgésicas, expectorantes e antirreumáticas (Effmert *et al.* 2005). Embora, análises químicas indiquem a presença de óleos essenciais em folhas de *P. paniculata*, as proporções de MeSa são significativamente menores (50%) e o aroma canforado destes órgãos é pouco acentuado (Pizzolatti *et al.* 2011; Victório *et al.* 2011, Rocha *et al.* 2012).

Estudos pioneiros com Polygalaceae consideravam estruturas secretoras pouco comuns na família (Solereeder, 1908). Entretanto, estudos posteriores relataram a ocorrência de ductos de óleo (Holm, 1929), cavidades secretoras (Sabnis, 1977; Metcalfe & Chalk, 1989), ductos de mucilagem (Aguiar-Dias & Cardoso-Gustavson, 2011) e nectários (Aguiar-Dias *et al.* 2011) em folhas e caules de espécies do gênero *Polygala*. Para *Polygala paniculata* a presença de lipídeos foi descrita em células corticais das raízes e tricomas e cavidades nas folhas (Falcão *et al.* 1973). No entanto, o desenvolvimento dessas estruturas secretoras, a composição química e a dinâmica da secreção nos diferentes órgãos são incompletos, fragmentados e pouco compreendidos.

A exploração de *P. paniculata*, assim como de outras espécies medicinais, é feita a partir do extrativismo em populações naturais, cuja propagação ocorre pela dispersão e germinação de sementes (Lorenzi & Mattos, 2002). A variabilidade genética obtida a partir da reprodução sexuada resulta em indivíduos com diferentes características de crescimento, rendimento e composição dos óleos essenciais (Zuzarte *et al.* 2010). Com o intento de padronizar e aumentar a produtividade de compostos bioativos, protocolos efetivos para propagação sexuada e assexuada de plantas, sob condições ambientais controladas, devem ser desenvolvidos, principalmente por vias biotecnológicas como a cultura de tecidos ou propagação *in vitro* (Panizza & Tognoni, 1988; Zuzarte *et al.* 2010).

A propagação *in vitro*, método de propagação clonal, é uma técnica alternativa à produção de plantas economicamente importantes, com vistas à obtenção de material vegetal de qualidade e à conservação genética das populações naturais (Rao & Ravishankar, 2002). O cultivo *in vitro* baseia-se no controle de diferentes fatores ambientais como a determinação do meio de cultura (Saldanha *et al.* 2014) e a qualidade da luz (Batista *et al.* 2016). A determinação das condições ambientais pode ocasionar diferentes condições de estresse e interferir no desenvolvimento morfoanatômico das plantas (Schuerger *et al.* 1997), assim como nos aspectos fisiológicos das plantas, como as taxas de fotossíntese e crescimento das plantas (Saldanha *et al.* 2014; Batista *et al.* 2016), o que pode interferir na síntese de compostos do metabolismo secundário (Ahmad *et al.* 2015).

Em sistemas de cultivo fotomixotróficos, tradicionalmente utilizados no cultivo *in vitro*, o sistema de lâmpadas fluorescentes é comumente utilizado, no entanto, o espectro de luz dessas lâmpadas pode ser insuficiente para o desenvolvimento das plantas (Gupta e Jatohu, 2003). A sacarose é fornecida como fonte de carboidrato para sustentar o crescimento e desenvolvimento das plantas, uma vez que a concentração de CO₂ dentro dos frascos de cultura é reduzida, limitando a capacidade fotossintética das plantas (Kozai, 2010; Xiao *et al.* 2011). O fornecimento de açúcar em sistemas fotomixotróficos é fundamental para a morfogênese das plantas, sendo que quantidade requerida durante o desenvolvimento *in vitro* pode variar entre as espécies. A disponibilidade dos açúcares apresentar forte correlação com o meio de cultura utilizado, uma vez que a translocação dos nutrientes pode ser alterada de acordo com o meio de cultura utilizado afetando, assim, o desenvolvimento das plantas.

Estudos voltados à compreensão do efeitos da condições *in vitro* sobre as características morfoanatômicas e ultraestruturais em espécies medicinais ou de valor comercial ainda são incipientes, mas de modo geral, indicam alterações significativas na área foliar (Cha-Um *et al.* 2011); na espessura do mesofilo e na área dos espaços intercelulares (Ferris *et al.* 1996); alteração no volume e formato das células do mesofilo (Iarema *et al.* 2012); modificação no arranjo dos tilacoides e grana dos cloroplastos (Saldanha *et al.* 2014).

Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo (1) identificar e analisar o desenvolvimento de sítios secretores de óleos essenciais (2) investigar os aspectos subcelulares e mecanismos de síntese, acúmulo e liberação da secreção; (3) Comparar os aspectos ultraestruturais entre os sítios secretores identificados (4) avaliar os efeitos da manipulação de condições *in vitro* (qualidade da luz, agentes geleificantes e concentração de sacarose) sobre a anatomia foliar de *P. paniculata*.

O presente trabalho foi constituído por dois capítulos. O primeiro capítulo, intitulado como “Duck head-like trichome and other essential oil synthesis sites”, foi redigido de acordo com as normas da revista *Plant Biology*. O segundo capítulo, por sua vez, intitulado “Efeito da qualidade da luz, agentes geleificantes e sacarose no crescimento *in vitro* e morfoanatomia foliar de *Polygala paniculata*”, foi redigido de acordo com as normas da revista *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar-Dias ACA, Cardoso-Gustavson P. 2011. Ontogeny of the mucilage ducts of *Polygala angulata* DC. (Polygalaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 138: 255-261.
- Aguiar-Dias ACA, Yamamoto K, Castro MM. 2011. Stipular extranuptial nectaries new to *Polygala* L.: morphology and ontogeny. Botanical Journal of the Linnean Society 166: 40-50.
- Ahmad N, Rab A, Ahmad N. 2015. Light-induced biochemical variations in secondary metabolites production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Journal of Photochemistry and Photobiology 1:23.
- Cha-Um S, Chanseetis C, Chintakovid W, Pichakum A, Supaibulwatana K. 2011. Promoting root induction and growth of *in vitro* macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keaau') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 106, 435-444.
- Effmert U, Saschenbrecker S, Ross J, Negre FCM, Fraser JP, Dudareva N, Piechulla B. 2005. Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: from *in vitro* to in plant function. Phytochemistry 66: 1211-1230.
- Falcão WFA, Alencastro FMMR, Correia IL. 1973. Notas sobre a anatomia e morfologia da espécie *Polygala paniculata* L. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 19: 281-294.
- Ferris R, Nijs I, Behaeghe T, Impens I. 1996. Elevated CO₂ and temperature have different effects on leaf anatomy of perennial ryegrass in spring and summer. Annals of Botany 78: 489-497.
- Gupta SD, Jatothu B (2013) Fundamentals and applications of light emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. Plant Biotechnology Reports 7:211-220.
- Holm T. 1929. Morphology of north american species of *Polygala*. Botanical Gazette 88: 167-185.

- Lapa FR, Gadoti VM, Missau FC, Pizzolatti MG, Marques MC, Dafré AL, Farina M, Rodrigues ALS, Santos ARS. 2009. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 104: 306-315.
- Lorenzi H, Matos FJA. 2002. *Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto *Plantarum*. 386p.
- Marques, MCM. 1988. Polígulas do Brasil V. Seção *Polygala* (Polygalaceae) *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 29: 1-114.
- Metcalf CR, Chalk L. 1989. *Anatomy of the dicotyledons*. 2. ed., vol. II. Oxford: Clarendon Press. 279p.
- Nogueira FLP, Fernandes SOB, Reis GM, Matheus ME, Fernandes PD, Lage CLS, Menezes FS. 2005. Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 154: 310-315.
- Panizza M, Tognoni F. 1988. Clonal propagation, callus formation and plant regeneration of lavandin. *Scientia Horticulture* 37: 157-163.
- Pizzolatti MG, Koga AH, Grisar EC, Steindel M. 2002. Trypanocidal activity of extracts from brazilian atlantic rain forest plant species. *Phytomedicine* 9: 422-426.
- Pizzolatti MG, Mendes BG, Soldi C, Missau FC, Bortoluzzi JH, Carasek E. 2011. Analysis of volatile compounds released from flowers and roots of *Polygala cyparissias* and *Polygala paniculata* by Headspace/SPME. *Journal Essential Oil Research* 21: 255-258.
- Rao SR, Ravishankar GA. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
- Rocha JLC, Pastore JFB, Brandão HN, Azeredo A, David JP, Santos EO, David JM. 2012. Quantificação de salicilato de metila em quatro gêneros de Polygalaceae, por CLAE-DAD. *Química Nova* 35: 2263-2266.

- Sabnis, TS. 1977. The physiological anatomy of the plants of the indian desert. *Journal of the Indian Botanical Society* 1: 65-83.
- Saldanha CW, Otoni CG, Rocha DI, Cavatte PC, Detmann KSC, Tanaka FAO, Dias LL, DaMatta FM, Otoni WC. 2014. CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 118: 87-99.
- Solereeder H. 1908. Systematic anatomy of dicotyledons. Clarendon Presse, Oxford, UK.
- Victório CP, Carriço JB, Lage CLS. 2011. *Polygala paniculata*: a source of methyl salicylate produced through plant tissue culture. *Revista Ceres* 58: 269-272.
- Zuzarte MR, Dinis AM, Cavaleiro C, Salgueiro LR, Canhoto JM. 2010. Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products* 32: 580-587.

CAPÍTULO I

DUCK HEAD-LIKE TRICHOME AND OTHER SECRETORY SITES OF ESSENTIAL OILS IN *Polygala paniculata* L.

ABSTRACT: *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) has minty smell roots used in folk medicine. Although the presence of essential oils has been reported for this species, the sites of synthesis these compounds are poorly understood, as well as the synthesis mechanism and releasing of the secretion produced. This study aimed (1) to identify secretory sites of essential oils in vegetative organs (2) to analyze the development and ultrastructural aspects of secretory sites during the process of synthesis, accumulation and release of secretion; and (3) to compare the subcellular structure of the sites that accumulate essential oil to determine the dynamics of synthesis and the accumulation in the vegetative organs of the plant. Samples of the shoot apical meristem, leaves at different developmental stages and primary and secondary roots were processed using standard techniques for light and electron microscopy. *Polygala paniculata* presents three secretory sites of essential oils: trichomes in leaves and stems, cavities in leaves and cortical cells in roots. The trichomes are unicellular and have a lateral projection whereby the secretion is released. The development of the cavities is lysigenous. The roots present parenchyma cells in the cortex, originating from the activity of the pericycle, and parenchyma cells of the secondary phloem as sites of synthesis of essential oils. The development of trichomes, cavities and roots secretory cells included programmed cell death. Trichomes, cavities and roots present the mixed lipidic secretion, characterized as essential oils. Typical subcellular features of the secretory structures were detected in *P. paniculata* and all organelles are correlated with a chemical nature of secretion. Mitochondria, rough endoplasmic reticulum, ribosomes, dictyosomes, plastids with oil droplets, vesicles and oil droplets in the cytoplasm are present in trichomes and cavities. Root cortical cells present the same organelles with the exception of plastids. Although these secretory structures have chemical composition and similar ultrastructural aspects, the analyzed structures show particularities regarding the mechanisms of synthesis and release of secretion.

Keywords: ontogeny, terpenoids, secretory trichomes, secretory cavities, resin, methyl salicylate

INTRODUCTION

Medicinal plants are source of important natural chemicals usually found in specialized secretory structures such as idioblasts, laticifers, ducts, cavities and trichomes, (Fahn 1979, Evert 2006), but may occur in cells common in different tissues. *Polygala* L. (Polygalaceae), a genus with wide distribution especially in Neotropical regions, is composed of ~350 species of herbs and shrubs (Persson 2001; Marques 1988). Many of these species are used in traditional medicine because of the biological activities such as expectorant, analgesic and sedative (Lorenzi & Mattos 2002). Despite the medicinal properties related to *Polygala*, secretory structures were considered unusual in this genus (Solereeder 1908). However, subsequent studies indicate the occurrence of secretory cavities (Falcão *et al.* 1973; Metcalfe & Chalk 1957), ducts (Aguiar-Dias & Cardoso-Gustavson 2011) and secretory trichomes (Falcão *et al.* 1973) in different species of this genus.

Polygala paniculata is a medicinal herb widely distributed in all the regions of Brazil (Marques 1988; Coelho *et al.* 2008). Its alcoholic root extracts roots are used topically for traditional populations in the treatment of dislocations, muscle injuries and snake accidents (Lorenzi & Mattos 2002). The medicinal properties of the roots are related to its essential oils (Matos 2000; Rocha *et al.* 2012), being the methyl salicylate (MeSa) the major component of the roots secretion (Rocha *et al.* 2012). The MeSa is known to have anti-inflammatory, analgesic, anti-rheumatic and expectorants (Effmert *et al.* 2005; Nogueira *et al.* 2005), medicinal properties observed in *P. paniculata* (Pizzolatti *et al.* 2002; Nogueira *et al.* 2005; Lapa *et al.* 2011). Although only the roots are used in popular medicine, structure and histochemical aspects of the roots are restricted who reported the presence of lipid droplets in parenchyma cells (Falcão *et al.* 1973). However, information about the presence of specialized secretory cells or structures, accumulation and release of secretion in the roots are still missing.

Trichomes, in the leaves and shoots, and cavities, restricted to the leaves, were reported in *P. paniculata* Falcão *et al.* (1973). However, the information on these structures is controversial in the literature. The trichomes are classified as non-secreting trichomes (Metcalfe and Chalk 1989; Aguiar-Dias *et al.* 2012), or secreting trichomes (Falcão *et al.* 1973). In addition, the occurrence of cavity of lysogenic origin in leaves were reported (Aguiar-Dias *et al.* 2012). The confirmation of this

type of trichome (Souza *et al.* 2013) and the origin and of secretory cavities (Paiva e Machado, 2007) and the pattern of secretion (Fernandes *et al.* 2016) depends on developmental and ultrastructural study of these structures, and histochemical analysis of secretion.

Due to the incomplete and fragmented information about the chemical nature and formation of the secretory structures in *P. paniculata*, the aim of this study was: (1) to identify secretory sites of essential oils in vegetative organs (2) to analyze the development and ultrastructural aspects of the secretory sites during the process of synthesis, accumulation and release of secretion and (3) to compare the subcellular structure of the sites that accumulate essential oil to determine the dynamics of the synthesis and the accumulation and, or release in the vegetative organs of the plant.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Plants 20-40 cm tall were collected at the Reserva Florestal Mata do Paraíso (RFMP), Viçosa Municipality (20°48'01''S e 42°51'51''W), state of Minas Gerais, Brazil. They were transplanted to plastic pots containing soil from the collection area, kept at the greenhouse of the Botanical Garden of the Department of Plant Biology of Universidade Federal de Viçosa (UFV), and used in anatomical and ultrastructural characterization, and histochemical tests. Voucher material was deposited at the herbarium of the UFV (VIC-21.445). The material used was identified by José Floriano Pastore from the Universidade Federal de Feira de Santana, Bahia, Brazil.

Light microscopy

Anatomical analysis

Samples of shoot apical meristem, leaves and roots, collected at different developmental stages, were fixed in FAA₅₀ (formaldehyde, glacial acetic, ethanol 50%, 1:1:18) kept vacuum for 24 h and stored in ethanol 70% (Johansen 1940), posteriorly, dehydrated through ethanolic series and embedded in

methacrylate resin (Historesin, Leica). Cross and longitudinal sections (5 µm thick) were made using a rotary microtome (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA), stained with toluidine blue 0,05% (pH 4.4) (O'Brien and McCully 1964) and mounted in synthetic mounting resin (Permount, Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA). The observation of cavities distribution in the leaf blade was performed by diaphanisations (Johansen 1940).

Histochemical analysis

The main classes of compounds in the secreted material were investigated in fresh or fixed samples. Samples of fresh material were sectioned using a table microtome (LPC model; Rolemberg and Bhering Trade and Import LTDA, Belo Horizonte, Brazil) and submitted to the following tests: Sudan IV (Brundrett *et al.* 1991) for detection of lipids; NADI reagent (David & Carde 1964) for essential oils and resins; ferric trichloride (Johansen 1940) for phenolic compounds; vanillin-hydrochloric acid (Mace & Howell 1974) for tannins; Dittmar reagent (Furr & Mahlberg, 1981) for alkaloids and red Ruthenium (Johansen, 1940) for pectins. Fixed samples were included in methacrylate resin, sectioned in rotary microtome and submitted the following histochemical tests: PAS reagent (McManus 1948) for total polysaccharides and xylydine Ponceau (Vidal 1970) for proteins. Control samples were simultaneously carried out according to the specifications for each test. For each procedure slides without any treatment (blanks) were also mounted. Observations and image documentation were performed with a light microscope (Model AX70TRF, Olympus Optical) equipped with a digital camera (U-photo system).

Electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM)

For micromorphological analysis, samples of stem apical meristem, leaves and roots were fixed in FAA₅₀ for 48 h, dehydrated in ethanolic series, and subjected to critical point dried using CO₂ (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). The samples were fixed on aluminum stubs and coated with gold (FDU 010, Bal-Tec, Balzers). The analysis and image captures were performed with a scanning electron

microscope LEO 1430 VP (Zeiss, Cambridge, UK) at the Center for Microscopy and Microanalysis (NMM) at (UFV), Minas Gerais, Brazil.

Transmission electron microscopy (TEM)

For transmission electron microscopy, samples of shoot apical meristem, leaves different developmental stages and primary and secondary roots (1 mm²) were fixed in Karnovsky (Karnovsky 1965) for 24 h and post-fixed with 1% osmium tetroxide in 1M cacodylate buffer for 2 hours at room temperature and rinsed in the same buffer for three times (10 min each). The contracting block was performed with 0.5% uranyl acetate for 12 h. The samples were dehydrated through an acetone series, and embedded in Spurr epoxy resin (Spurr, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) (Roland 1978). Ultrathin sections (60-70-nm thick) were cut using glass knives and an ultramicrotome (UC6, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA). The samples were stained with uranyl acetate (Watson 1958) and lead citrate (Reynolds 1963). Analyses and photography were performed using a Tecnai G2 - Spirit (Philips/FEI Company, Eindhoven, Holanda) at NMM (UFV) and a Tecnai - G2-20-FEI 2006 at Center for Microscopy of the Universidade Federal Minas Gerais (CM-UFGM), Minas Gerais, Brazil.

RESULTS

There are secretory sites were found in *P. paniculata* trichomes the leaf blade and stem surface (Figs. 1, 2 and 7), cavities in the leaves (Figs. 3, 4 and 7) and secretory cells in the roots (Figs. 5, 6 and 7).

Ontogeny and ultrastructure of the secretory trichomes of essential oils

The trichomes present in leaves and stems present the same ontogenetic, anatomical, ultrastructural and histochemical aspects, as described below. The differentiation of trichomes is precocious and occurs in the leaf primordia, on both adaxial and abaxial surfaces, and stem portions near from the shoot meristem (Fig. 1A). Some protodermal cells undergo an anticlinal division and one of the daughter cells will result in the trichome initial (Fig. 1B). This initial cell keeps conspicuous

nucleus and nucleoli, with the presence of small vacuole in the cell apex (Figs. 1B, 1C). The vacuole swells slightly during the radial expansion in the trichome development (Fig. 1C). In the next phase it is possible to observe the beginning of a lateral curvature in the middle portion, differentiated thickening of the wall in the most distal portion of this cell and numerous vacuoles (Fig. 1D). This cell increases its volume, lengthens and the apical portion becomes globoid and bulkier (Fig. 1E). A portion of the trichome region protrudes laterally forming a narrow 90 degree angle beak from the trichome basal region (Fig. 1E). The expansion of the middle region of the trichome is complete only with the coalescence of small vacuoles that turn into a large central vacuole, which sticks to a narrowed and lateralized apex. The fully differentiated trichome acquires "duck head" shape, comprising a single cell with distinct regions: a foot region, inserted among the other protodermal cells, a stalk (elongated) region that resembles a neck, a head region similar to the globular head and a lateral projection of the globular head resembling a duck's beak (Figs. 1E, 1G). The wall of the lateral projection most distal portion of the presents greater pecto-cellulosic thickening (Fig 1E). The secretion is released from the trichomes apex lateral projection (Figs. 1H, 1I), as evidenced by the presence of secretion (Fig. 1H) and cell wall and cuticle rupture in this region (Fig. 1I). With the release of the secretion the trichomes gradually lose their content (Fig. 1J) as a wilting process, and are curved on the leaf surface. (Figs. 1F, 1I, 1J). The trichome cell wall remains intact, with the exception of the cell wall in the lateral projection region (Figs. 1I, J).

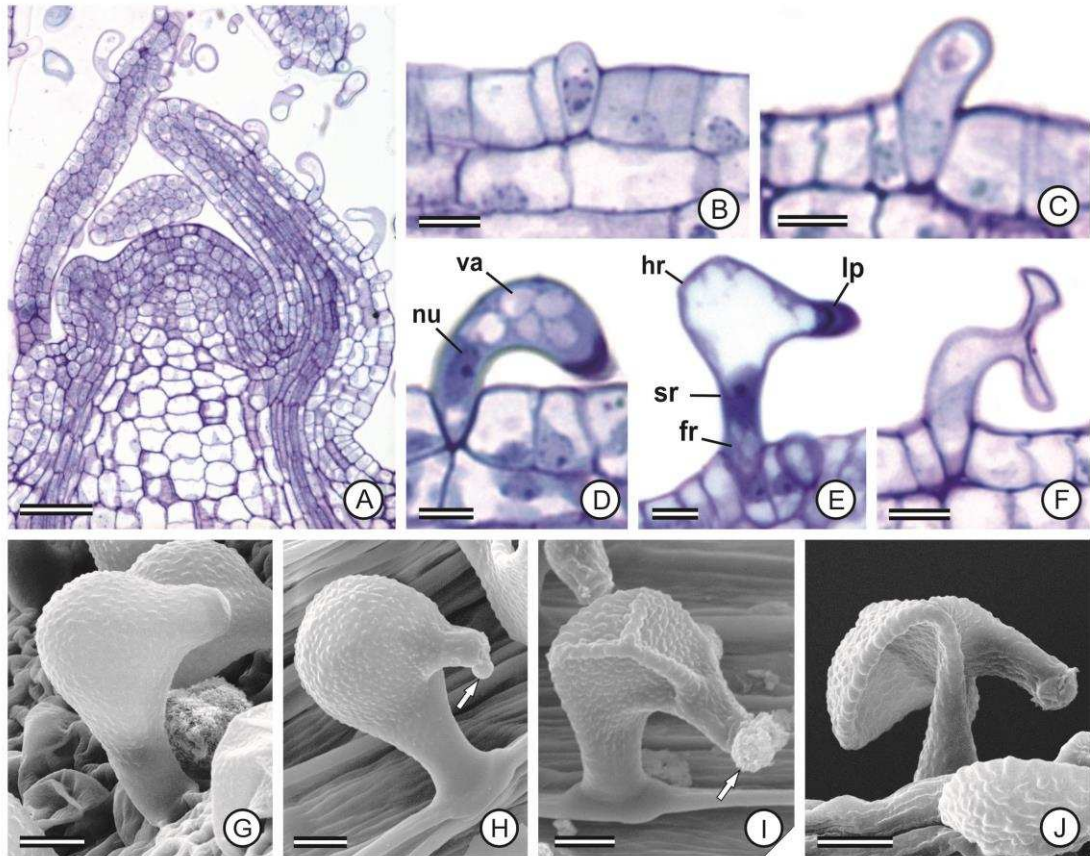


Figure 1. Secretory trichomes development of *Polygala paniculata* shoots under light microscopy (A-F) and scanning electron microscopy (G-J). **A.** Shoot apical meristem with secretory trichomes at different developmental stages. **B.** Initial cell of secretory trichome with dense cytoplasm. **C.** Initial cell of secretory trichome with a distal small vacuole. **D.** Expansion and initiation of the trichome lateral curvature. Note the thickening of the wall in the most distal portion of the lateral projection and the numerous vacuoles. **E.** Mature trichome with a a single large vacuole. **F.** Senescent trichome. **G.** Mature trichome. **H.** Release of secretion through the trichome head lateral projection. Note the rupture of the cell wall and cuticle. **I.** Decreased trichome during the process of secretion release. **J.** Senescent and withered trichome in final stage of the secretion release. Arrows indicate secretion. fr, foot region; hr, head region; lp: lateral projection of the head; nu, nucleus; sr, stalk region; va, vacuole. Bars: 10 μm (B-H, J-P), 50 μm (A), 200 μm (I).

The trichome initial cell presents secretory characteristic evidences of these glands such as a dense cytoplasm with free ribosomes, plastids and small vacuoles. (Fig. 2A). Oil droplets are observed in the cytoplasm (Fig. 2A), in small vacuoles (Figs. 2A, 2B) and in periplasmic spaces (Fig. 2C). The small vacuoles with oil droplets begin to coalesce (Fig. 2B). The plastids present granular content, are polymorphic with a granular substance and ribosomes, but without thylakoids and internal membrane system (Fig. 2C). Neighboring epidermal cells also have oil

droplets in vesicles, but plasmodesmata were not observed (Fig. 2D). In the next phase, the fusion of small vacuoles gives rise to a large vacuole where secretion is accumulated (Fig. 2E, 2F). The secretion is heterogeneous, composed of granular substance and oil droplets (Fig. 2F).

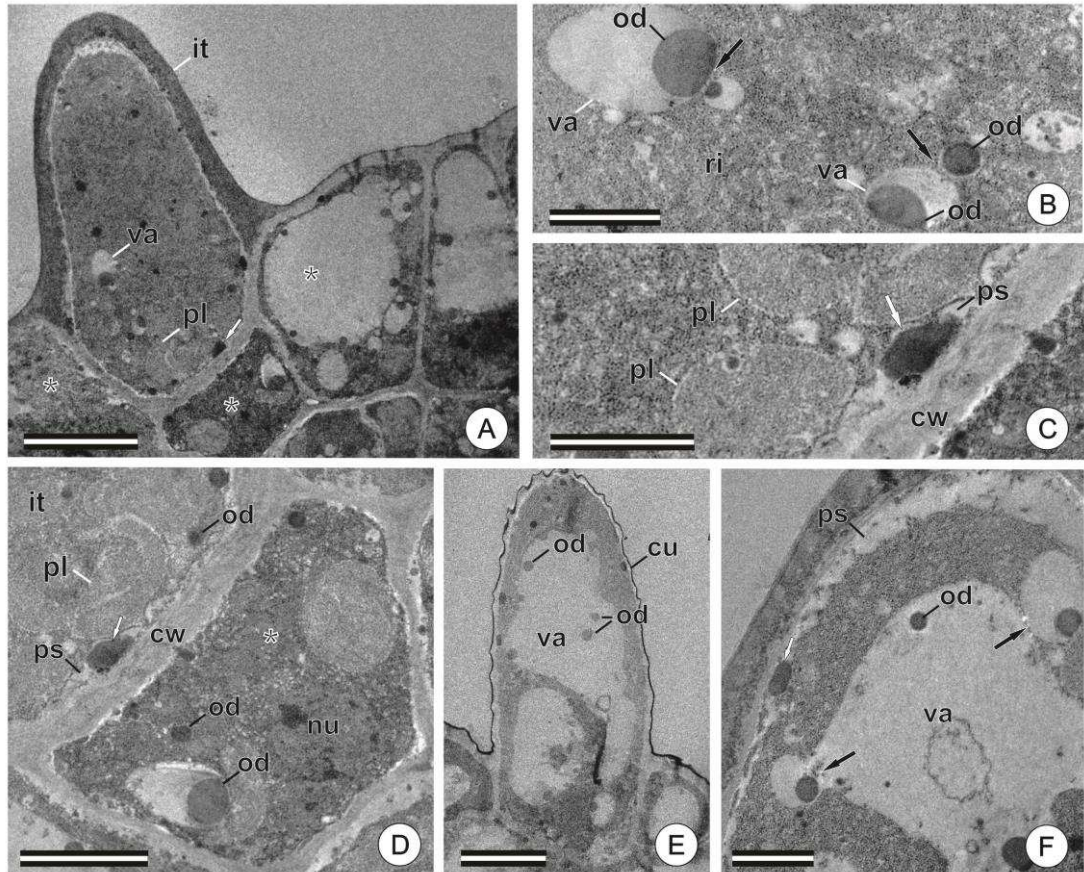


Figure 2. Development and secretory activity of *Polygala paniculata* trichomes. **A.** Initial phase of the development and secretory activity of the trichome. Oil droplets (white arrows) in the periplasmic space. **B.** Fusion of the small vacuoles with oil droplets (black arrows). Dense cytoplasm with ribosomal granules. **C.** Secretion Accumulation in periplasmic space. **D.** Neighboring cells (*) have vacuoles with oil. **E.** Peripheral cytoplasm and expansion of vacuole. **F.** Detail of vacuoles fusion and discharge of the secretion into the expanding vacuole. cu: cuticle, cw: cell wall, it: trichome initial cell; od: oil droplet; ps: periplasmic space; nu: nucleous; pl: plastids; ri: ribosomes; va: vacuole. Bars: A: 5 μm ; B: 0.5 μm ; C,F: 1 μm ; D: 2 μm ; E: 3 μm .

In mature trichomes, the secretory process is finalized, the secretion is accumulated in the vacuole and begins to be released out of the cell (Fig. 3A). The cuticle extends uniformly throughout the trichome walls in all phases, without the formation of subcuticular spaces; the trichomes exhibit a peripheral dense cytoplasm

and a central vacuole with homogeneous secretion (Fig. 3A), which indicates that the oil droplets coalesce with a secretion present within the vacuole constituting a homogeneous secretion. The peripheral cytoplasm is dense and present mitochondria, free ribosomes, dictyosomes and endoplasmic reticulum (Figs. 3B, 3C). In the final phase of secretion release, the trichome is senescent and withered; with cellular machinery highly altered (Fig. 3D). At this stage its observed the loss of cytoplasm integrity, characterized by the degradation and vesiculation of cytoplasm and vacuole (Figs. 3D, 3E). Changes were not observed in the trichomes (Figs. 3A, 3E), but ultrastructural aspects of the cell wall of the apex lateral projection and the release of secretion out of the cell were not observed.

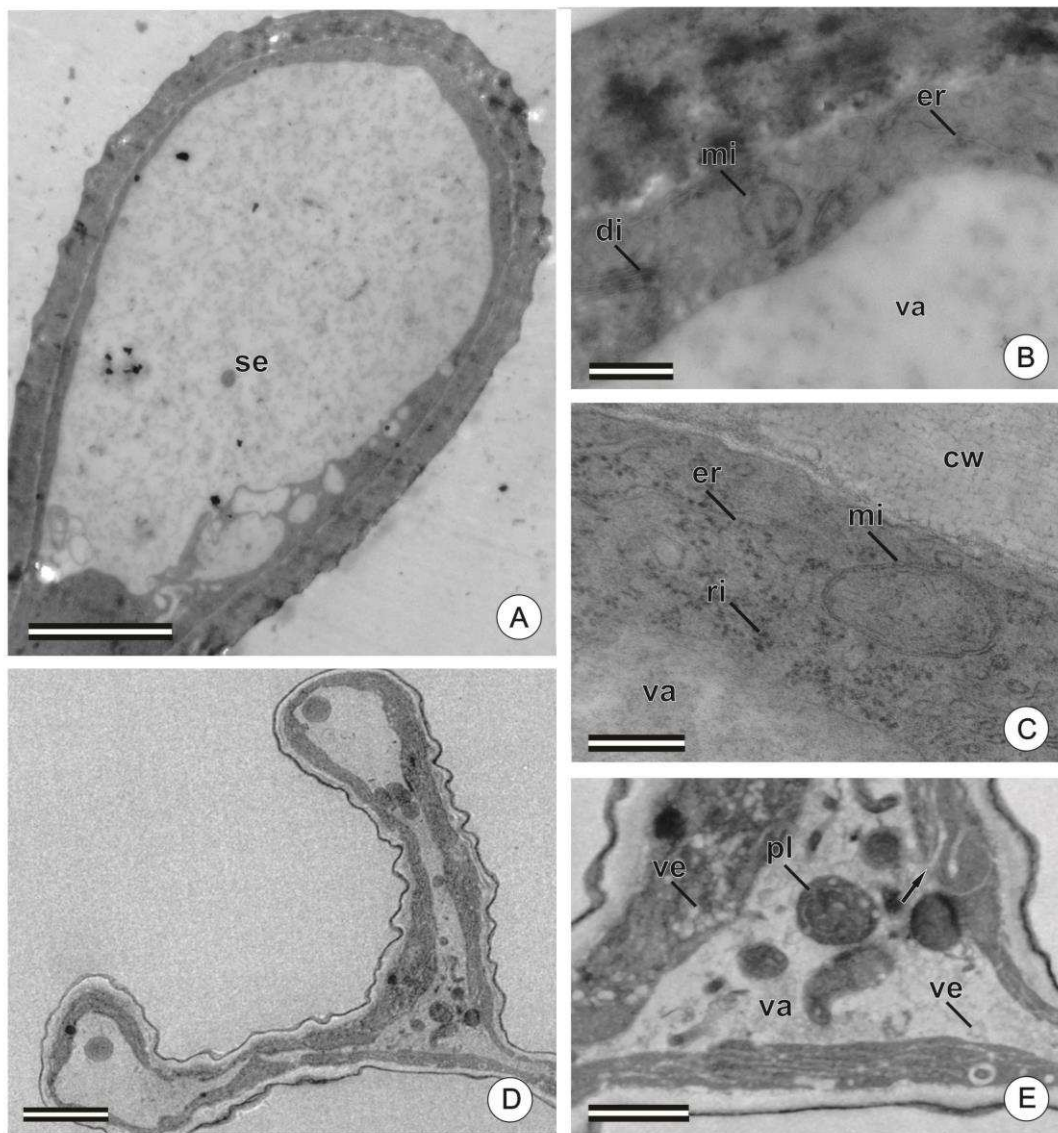


Figure 3. Mature and withered trichomes of *Polygala paniculata* trichomes. A-C: Mature trichomes. D-H: Withered trichomes. **A.** Mature trichomes with peripheral

cytoplasm and a central vacuole with homogenous secretion. **B.C.** Beginning of deterioration of organells. **D.** Senescent trichome. cw: cell wall, di: dictyosomes; er: endoplasmic reticulum; od: oil droplet, mi: mitochondria; ri: ribosomes; se: secretion; va: vacuole; ve: vesicles. Bars: A: 5 μm ; B: 0.5 μm ; C: 0.25 μm ; E: 1 μm .

Structure and ultrastruture of essential oil secreting cavities

Secretory cavities occur just in leaves of *P. paniculata*, its differentiation was delayed compared to differentiation trichomes and occurs from ground meristem cells (Fig. 4A). Two-to-three cells of the ground meristem exhibited a compact arrangement, very thin walls, dense cytoplasm, voluminous nucleus with conspicuous nucleolus and located between the procambial strands (Fig. 4A, 4B, 4C). One by one, these initial cells degrade and form a small central space or lumen surrounded by a secretory epithelium with undefined cell layers (Fig. 4B, 4C). Thus, the lumen increases with the gradual incorporation and degradation of epithelial secretory cells, until complete expansion and differentiation of leaves (Fig. 4D, 4E, 4F). Epithelial cells became vacuolated, more bulky and present the pheripheral cytoplasm with numorous plastids (Fig. 4E). In leaf view, the cavities distribution within the areolas can be observed, maintaining connection with the terminal vascular bundles (Fig. 4G, 4H).

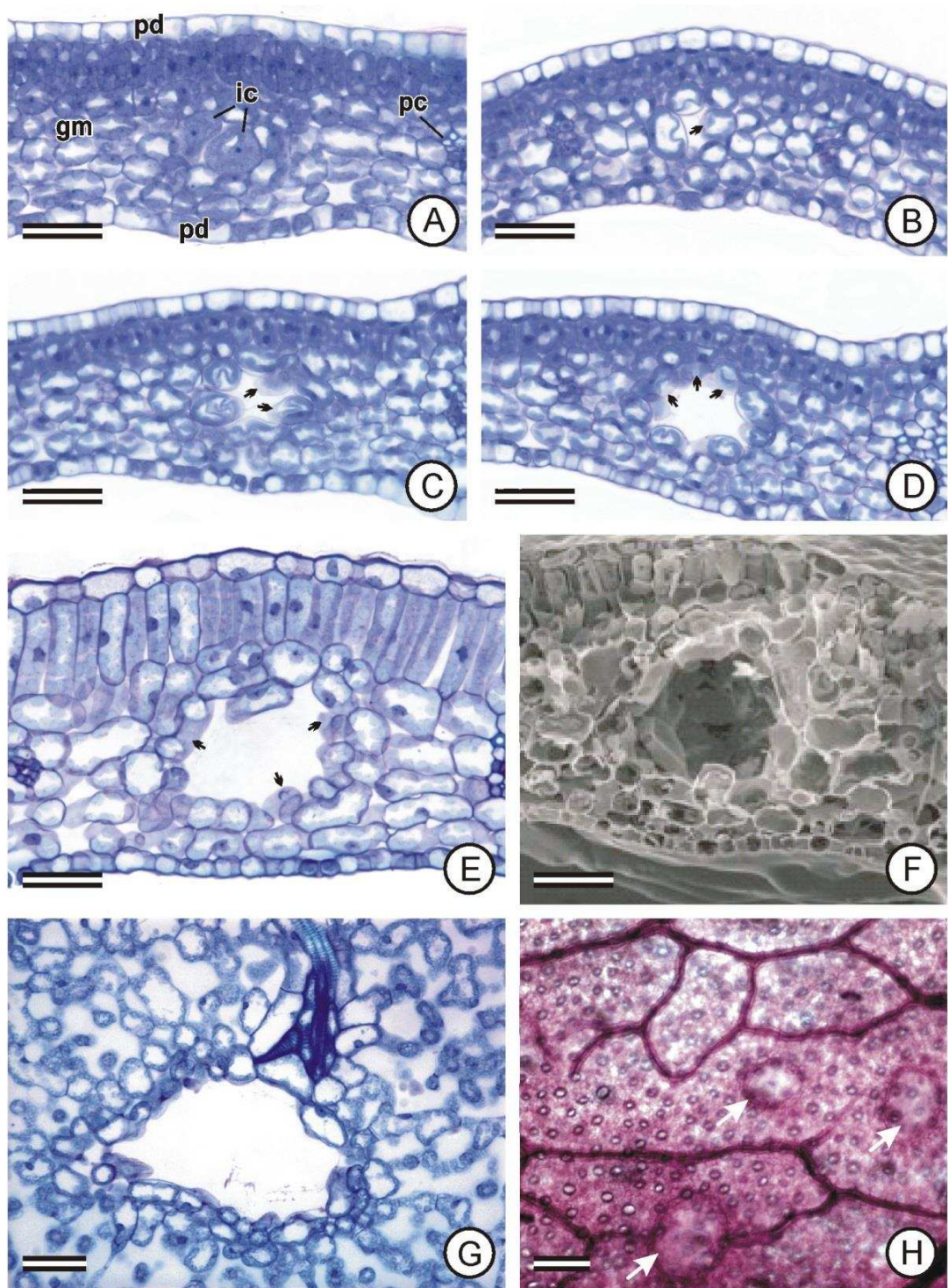


Figure 4. Secretory cavities development of the *Polygala paniculata* leaves under light microscopy (A-E, G-H) and scanning electron microscopy (F). A-F, transversal sections. G-H, paradermal sections. A. Initial cells identified by voluminous nucleus, dense cytoplasm. B.C. Cell degradation and beginning of cavity lumen formation. D. Gradual and continuous degradation and incorporation of the epithelial cells of the cavity and enlargement of the lumen of the cavity. E-F. Mature secretory cavity. Note that the cavity does not have a well-defined epithelial layer. G. Association of cavities with the vascular system. Black arrows: partially disintegrated walls; white

arrows: protoplast retraction; gm: ground meristem; ic: initial cells; lu: lumen; pd, protoderm; pc, procambium. Bars: A-G: 50 μm ; H: 100 μm .

The secretory process and the cavity lumen formation occurs through a mechanism that involves the secretion synthesis and intracellular accumulation, cell death and secretion release (Fig. 5). This process is continuous, one by one, these initial cells, at different developmental stages, initiate the secretion process, degrade and are incorporated into the secretion accumulated into the lumen in formation. The ultrastructural aspects of the cavities show that the initial cells are juxtaposed, have dense cytoplasm and plastids with starch grains (Fig. 5A). The lumen formation begins with the degradation of cavity initial cell of the (Fig. 5B). Droplets of oil and granular substance are observed into vacuole (Fig. 5C). Cells in the process of initial secretion are bulky and have a thin cell wall; dense cytoplasm; polymorphic plastids with dense stroma and accumulated starch grains; large vacuole with oil accumulation and granular and fibrillar secretion (Fig. 5D). As development proceeds, these cells have thin walls, dense peripheral cytoplasm, plastids and increased vacuoma (Fig. 5E). The central vacuole compresses the dense cytoplasm to the periphery and accumulates heterogeneous secretion composed by granular substance and oil droplets of different sizes (Fig. 5E). Plastids are numerous, large and polymorphic, exhibit developed inner membrane system, ribosomal granules, and accumulate starch grains and lipid material (Fig. 5F). These cells are connected by plasmodesmata (Fig. 5F). In the final stage of the secretion process, there is a marked presence of plastids with numerous oil droplets, protoplast retraction and formation of periplasmic spaces as a result of the accumulation of granular appearance secretions and oil droplets (Fig. 5H, 5G). Drops of oil from the secretory process of other cells are observed in the lumen in formation. The peripheral cytoplasm presents mitochondria, rough endoplasmic reticulum, vacuoles, plastids and oil droplets (Fig. 5H). Mitochondria with conspicuous cristae and rough endoplasmic reticulum are scattered throughout the cytoplasm (Fig. 5H). After secretion synthesis, secretory cells show signs of cell death (Fig. 5I), evidenced by cytosol disintegration, plastid degradation, accumulation of cellular debris and electron-opaque substances dispersed by the cell (Fig. 5J). The mitochondria of these cells and neighboring cells are intact (Fig. 5K). At the end of the process of secretion

synthesis, the release of secretion occurs from the rupture of the cell wall and the membranes of each cell, such that its contents are discharged into the lumen, incorporated into the secretion, contributing to the increase of cavity lumen (Fig. 5I). The mature cavities present undefined epithelium with highly vacuolated cells, with parietal cytoplasm and oil-containing plastids, surrounding the lumen where the secretion is accumulated (Fig. 5L).

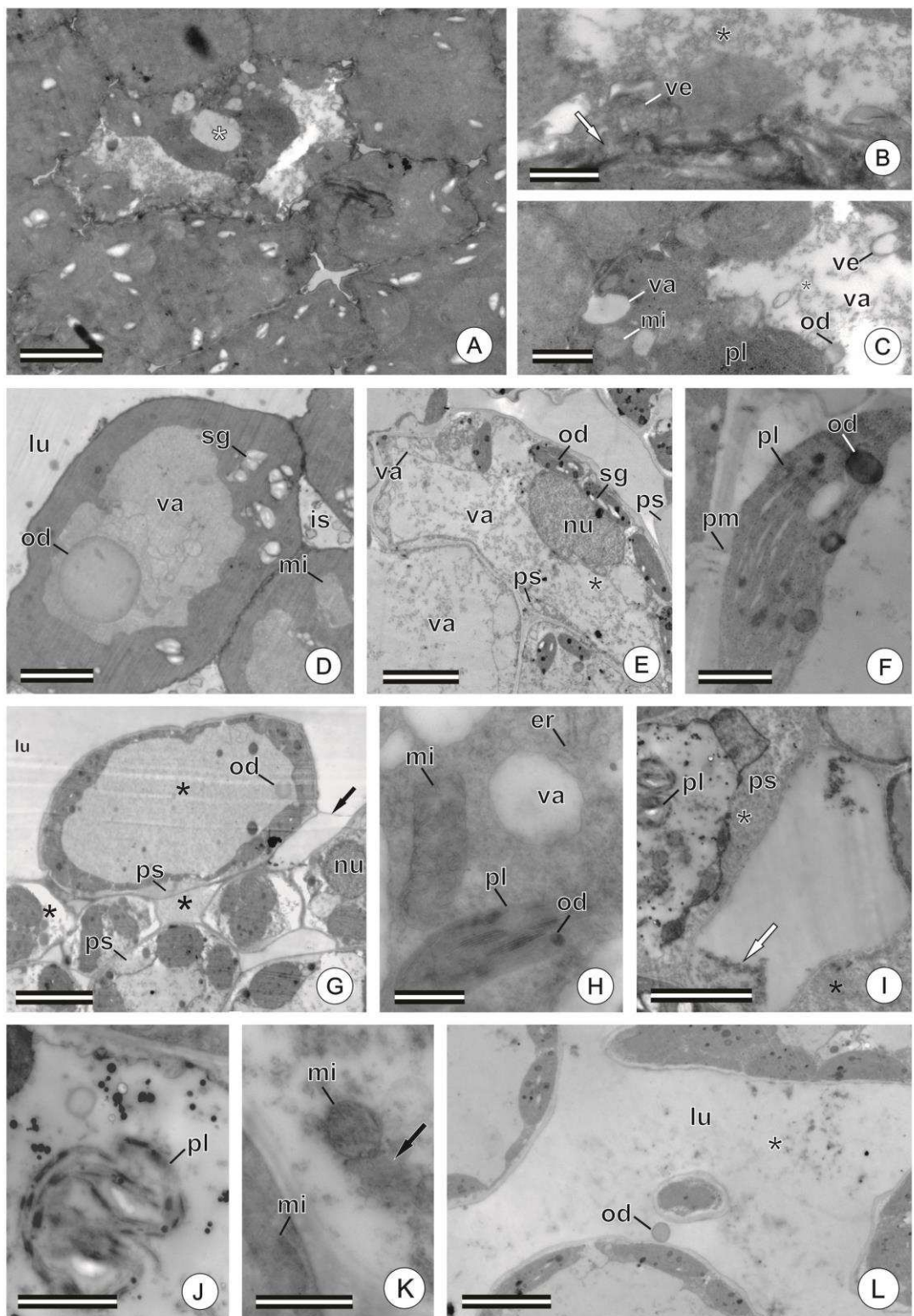


Figure 5. Ultrastructure of the essential oil-secreting cavity in *Polygala paniculata*. **A.** Central cavity cell initial in cell death process (with asterisk); Note that the neighboring cells have integrity of the cellular content. **B.C.** Detail of the cavity initial cell. **B.** Cell wall degradation of the (white arrow). **C.** Cytoplasm, plasmalemm and tonoplast degradation. **D.** Initial cell in secretory stage. Note the accumulation of starch grains into plastids. **E.** Secretory cell in advanced stage of secretory process. Note the consumption of starch grains and concomitant accumulation of oil droplets

in the plastids. **F.** Detail of the plastids showing the oil droplets and plasmodesmata connecting secretory cells. **G.** Cavity secretory cell in the final stage of secretory process. Note the secretion accumulated into the vacuole, periplasmic and intercellular spaces (black asterisk); Cell spacing (black arrow). **H.** Cytoplasmic organelles starting to show signs of degradation. Note the loss of integrity of the endoplasmic reticulum. **I.** Secretory cells degradation. Note the degradation of the cytoplasm and cell remnants (arrows) and the secretion (black asterisk) accumulated into the vacuole and at the periplasmic space, which is formed due to the accumulation of secretion. **J.** Plastids degradation and presence of the electron-opaque globules. **K.** Mitochondria remains intact. **L.** Lumen of mature cavity with granular secretion (black asterisk) and essential droplets. od: essential oil droplets; is: intercellular space; lu: lumen; mi: mitochondria; pm: plasmodesmata. pl: plastids; ps: periplasmic space; sg: starch grain; va: vacuole. Bars: A, D-E, H-I, L: 5 μm ; B-C, G, J: 1 μm ; K: 0.5 μm .

Structure and ultrastructure of essential oil-secreting roots

The *P. paniculata* root in primary structure show uniseriate epidermis, cortex with one to two layers of bulky parenchyma cells with thin walls and vascular cylinder diarch. Caspary's striae of the endoderm are evident. The roots have ephemeral primary growth, therefore, there is very early loss of the epidermis and cortical region and not secretory cells at this stage of development. The roots present ephemeral primary growth, therefore, there is very early loss of the epidermis and cortical region and not secretory cells at this developmental stage. The secondary growth begins with the vascular cambium activity, which form xylem and phloem. Concomitantly, the pericycle proliferates and forms several layers of cells externally to the secondary phloem. The outermost layer formed by the pericycle begins to act as a phellogen, and the inner layers differentiate into parenchyma cells. The periderm is composed of the phellogen and two to three outer layers of phellem.

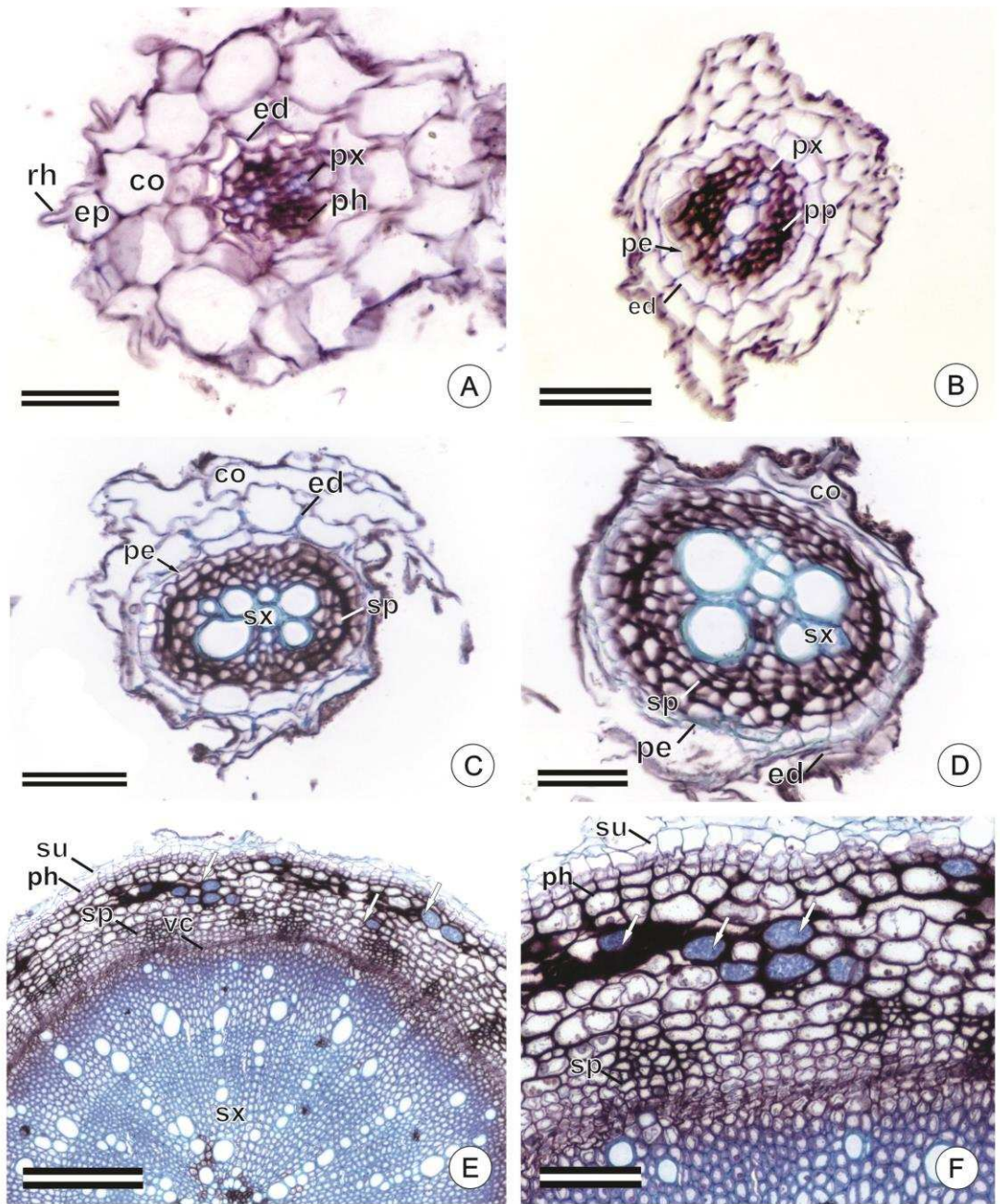


Figure 6. Anatomy of the root of *Polygala paniculata*. A-B. Root in primary growth. C-F. Root in secondary growth. **A-B.** Diarch root. Note in A, only the presence of protoxylem and in B, the presence of proto and metaxylem. **C-D.** Beginning of secondary growth and discard of the cortical region. **E-F.** Root in secondary growth with periderm. Note bluish cells (secretory cells) in the region between the periderm and secondary phloem. co: cortex; ed: endodermis; ep: epidermis; ps: secondary phloem; px: protoxylem; pe: pericycle; ph: felogênio; pp: protoploem; sx: secondary xylem. Bars: A-D: 30 μ m; E-F: 50 μ m.

The secretory cells present a dense cytoplasm and small vacuoles (Fig. 6A). The cytoplasm of these cells is rich in ribosomes, presents mitochondria, rough

endoplasmic reticulum and vacuoles of varying sizes dispersed by the cytoplasm (Fig. 6B). Vesicles with lipid content are observed in the cytoplasm and its membrane fuses to the tonoplast membrane discharging its secretion inside the vacuole (Fig. 6C), forming a large vacuole with accumulation of lipid droplets. In the secretion process final stage begins degradation of membrane (Fig. 6D).

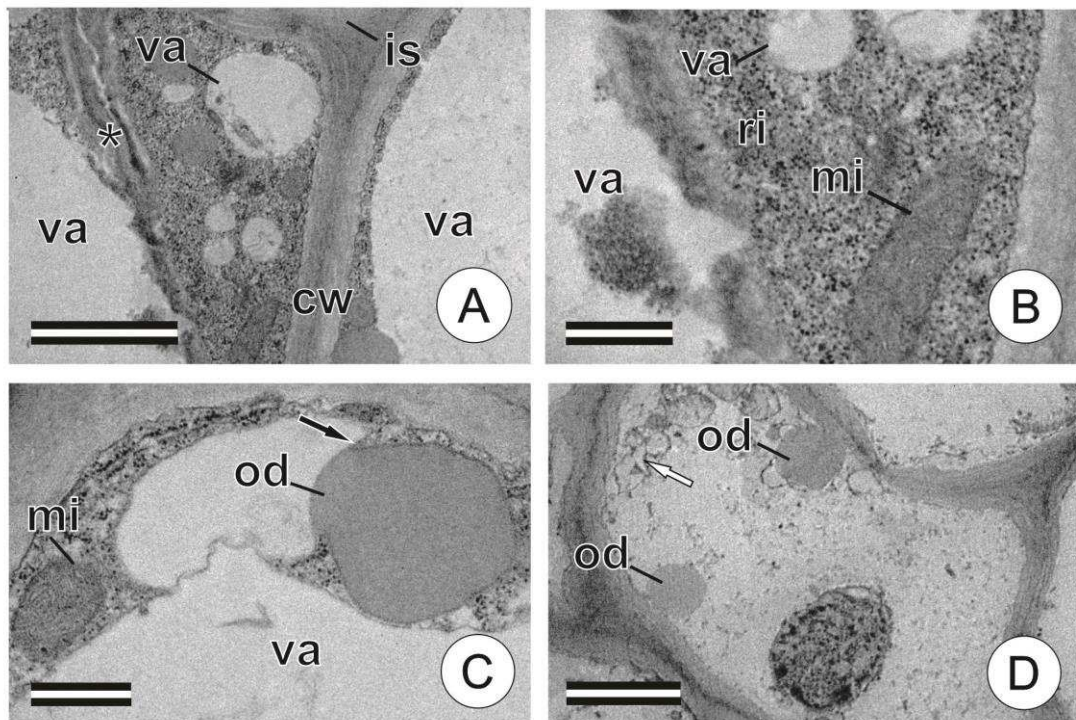


Figure 7. Ultrastructure of essential oil secretory roots of *Polygala paniculata*. A. General appearance of the secretory cells in the cortex (asterisk). B. Detail of the secretor endoplasmic reticulum. C. Vacuole with accumulation of secretion. The fusion between the membranes are indicated by black arrow. D. Secretory cell with a large vacuole with accumulation of secretion. Signs of cellular degradation evidenced by the rupture of the membrane are indicated by white arrow. co: cortex; er: endoplasmic reticulum; ep: epidermis; is: intercellular space; mi: mitochondria; od: essential oil droplets; ph: phloem; ri: ribosomes; va: vacuole; xy: xylem. Bars: A: 2 μ m; B,C: 0.5 μ m; D: 2 μ m.

Essential oil in trichomes, cavities and root cells

The histochemical tests revealed that the trichomes, cavities and root cells present lipidic secretion, composed by essential oils and resins (Fig. 8). Trichomes are translucent on fresh leaves and stems (Fig. 8A). The Ruthenium red reagent revealed Pectic thickening of the most distal cell wall of duck's beak (Fig. 8B). When treated with sudan IV, a lipid secretion is evidenced in trichome as red drops (Fig. 8C). The NADI reagent reveals oleoresin the trichome, indicated by the blue-

purple color (Fig. 8D). Cavities of fresh leaves, not treated with any reagent or dye, present translucent oily secretion (Fig. 8E). In cavities the secretion to the cavities have lipid nature, as indicated by the red color with sudan IV (Fig. 8F), and oleoresin predominate, as indicated by the blue-purple color with the NADI reagent (Fig. 8G). In sections of fresh roots, not treated with any reagent or dye, was not observed drops oil as in trichomes and cavities (Fig. 8H), but when treated with sudan IV, a lipid secretion is evidenced the red color with sudan IV as red drops in cortex cells (Fig. 8I), and essential oils predominate, as indicated by NADI reagent, reveals in the some root cortical cells, indicated by the blue color (Fig. 8J). Alkaloids, phenolics, tannins, polysaccharides and proteins were not detected in trichomes and cavities, neither in cortical cells of the root.

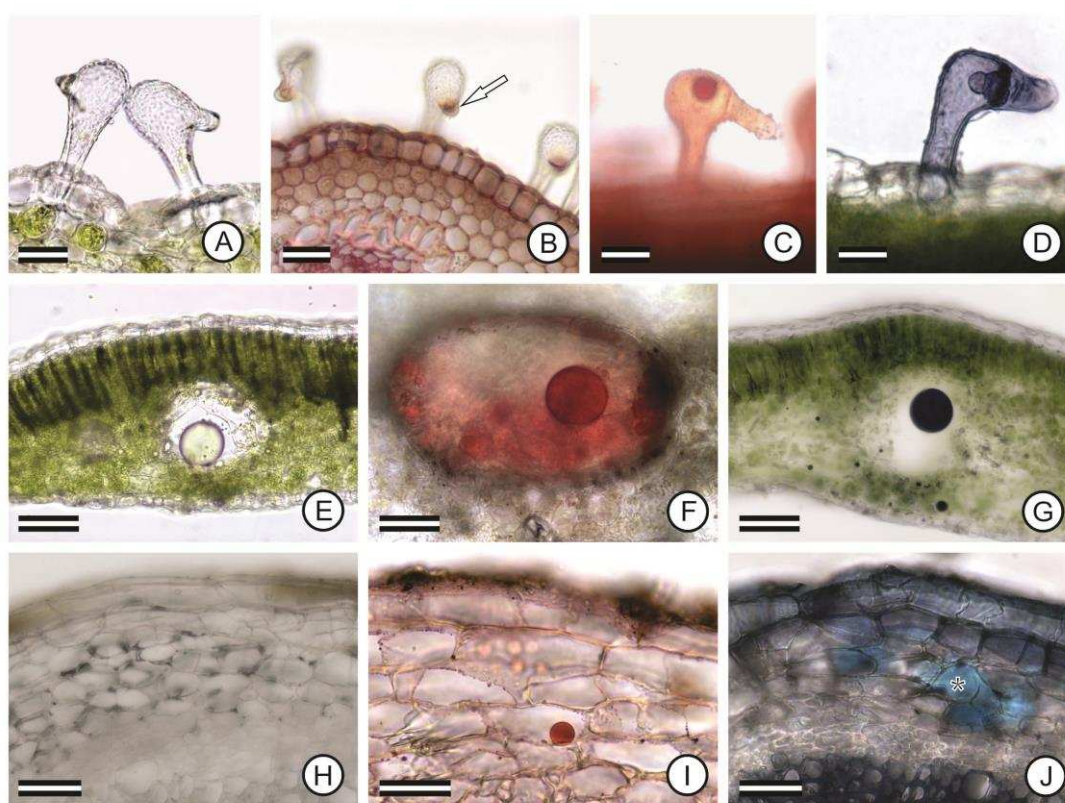


Figure 8. Trichomes (A-D), cavities (E-G) and roots cells (H-J) of *Polygala paniculata* submitted to histochemical tests. A, E, H. Untreated sections. B. Ruthenium red; rose color indicates pectins (arrows). C, F, I. Sudan IV; red color indicates lipids. D, G, J. NADI reagent; blue color indicate predominance of the essential oil (*) and blue-purple indicates the presence of resins. Bars: A-D: 20 μ m; E, G: 100 μ m; F: 50 μ m; H, I: 70 μ m; J: 40 μ m.

DISCUSSION

Essential oils sites in *Polygala paniculata*

Polygala paniculata presents trichomes on leaves and stems, cavities in the leaves and root cortex cells as sites of synthesis and accumulation of essential oils. Studies on the development, ultrastructure and histochemistry of cells and the specialized secretory structures of *P. paniculata* provide information about the mechanisms of hydrophobic substances secretion.

Unicellular secretory trichomes

The trichomes of *P. paniculata* were reported as glandular (Falcão *et al.* 1973) and non-secretory unicellular trichomes related to strategies of defense in arid conditions (Aguiar-Dias *et al.* 2012). The correct definition of secretory trichomes is based on its meristematic origin, location, type of secretion and ecological function of the secretory structure (Fahn 1979; Evert 2006). In *P. paniculata*, early differentiation of protodermal cells, differentiation in the shoot apical meristem, anatomical characteristics and presence of secretion confirm the secretory nature of unicellular trichomes in leaves and stem. It is important to note that early differentiation, accumulation of chemical compounds, high density of secreting trichomes in leaf and shoot primordia and low density in expanded leaves and stems suggest that these glands work in chemical protection during early development of these organs (Wagner *et al.* 2004; Maffei 2010; Lange & Turner 2013).

Secretory trichomes are considered as recently evolved structures, with phylogenetic origin from non-secreting trichomes (Fahn 1988; Lange & Turner 2013). Although they may be multicellular or unicellular (Werker 2000; Evert 2006), the unicellular secretory trichomes are uncommon, having been reported in Nissaceae (Asteridae) (Liu 2004), family phylogenetically distant from Polygalaceae (Magnoliidae) (APG III 2009). Multicellular secretory trichomes are widely present in different species, usually composed of regions: foot, peduncle and head (Bosabalidis 1990; Werker 2000), and each region can be constituted by a single cell or by a group of specialized cells involved in the process of synthesis and release of secretion (Werker *et al.* 1993; Machado *et al.* 2006; Ventrella & Marinho 2008). The

P. paniculata trichomes are unicellular, but have three distinct regions identified in this study as foot, peduncle and head, which present ultrastructural differences.

In differentiated trichomes, the foot and neck regions present dense cytoplasm and nucleus and nucleolus are visualized in the basal portion of the cell, while the head region, at the cell apex presents plastids and accumulate secretion in a large central vacuole, which indicates compartmentalization of the secretory process along the trichome and the high metabolism, typical of the secretory structures (Paiva & Martins 2011; Marinho *et al.* 2016) and suggest that unicellular trichomes are functionally equivalent to multicellular trichomes.

The duck head like appearance of *P. paniculata* trichomes, reported for the first time in this study, is a marked morphological characteristic for the species, but was also reported in other species of *Polygala* (Aguiar-Dias *et al.* 2012) and *Salomonina* (Piwpuan & Thammathaworn 2007), phylogenetically related genus, which may represent a taxonomic marker for the family Polygalaceae. The lateral projection of the trichome apical region was interpreted as apical-lateral extension of the cuticle (Falcão *et al.* 1973) or lateral extension of the apex (Aguiar-Dias *et al.* 2012). However, the ontogenetic analysis of the trichomes, carried out in the present study, shows that during its development occurs the lateral curvature of the cell, culminating in a projection of vacuoles, cytoplasm, cell wall and cuticle, resembling a duck's beak.

The formation of lateral projection is concomitant to secretion synthesis and accumulation. The trichome development images, analyzed by LM and SEM, show that the secretion is released through rupture of the cell wall and the cuticle of the lateral cell projection. Cell wall ultrastructural in this region were not observed, but the histochemical analysis with the red Ruthenium reveals the pectic nature of the cell wall thickening at that point. The increase of the pectic matrix in this region makes arrangement of the cellulose microfibrils looser and increases its porosity (Willats *et al.* 2001), which suggests that the cell wall is more fragile and can easier could break with the secretion passage. The presence of rough endoplasmic reticulum, vesicles and vacuoles in the cytoplasm suggests that pectinases and other enzymes may be involved in the degradation or disorganization of cell wall cellulose microfibrils in this region (Machado *et al.* 2006; Rodrigues *et al.* 2011; Possobom *et al.* 2015) and contributes to the increase the cell wall permeability.

Polygala paniculata trichomes are sites of synthesis and accumulation of essential oils in leaves and stems, as detected by specific histochemical tests. The amount of mitochondria with visible ridges, smooth and rough endoplasmic reticulum, polyribosomes, dichthosomes and vesicles with secretion confirm the high activity during the secretory phase (Lüttge 1971; Ascensão & Pais 1988; 1997). In addition, the presence of these organelles suggests their involvement in terpenes synthesis and transport (Ascensão *et al.* 1997; Ascensão & Pais 1988), as reported for various secretory structures with similar secretion (Possobom *et al.* 2015; Sá-Haiad *et al.* 2015; Marinho *et al.* 2016; Fernandes *et al.* 2017).

However, it is worth mentioning that in *P. paniculata* the plastids seem to play an important role in secretion synthesis and chemical composition. Structural aspects of plastids may indicate important aspects of the chemical composition of terpene secretions (Fahn 1998). The plastids of *P. paniculata* trichomes are typical leucoplasts, devoid of thylakoids and ribosomes, and an internal systems of poorly developed membranes, (Lacchia & Carmello-Guerreiro 2009; Lange & Turner 2013). Plastids with these characteristics are related to the synthesis of secretions rich in low molecular weight terpenes, such as monoterpenes (Cheniclet & Carde 1985; Fahn 1988; Lange & Turner 2013). Similar observations were made by Lacchia & Carmello-Guerreiro (2009) in secretory channels of Anacardiaceae species.

The release of *P. paniculata* secretion results in the trichome degradation, with typical programmed cell death characteristics. The cytoplasm collapse is evidenced by plastidial degradation and dark staining and evident abundance of vesicles in the cytoplasm and vacuole, which may contain hydrolytic enzymes responsible for the organelles degradation and rupture of the tonoplast (Paiva & Machado 2007; Chen & Wu 2010) .

Lysigenous secretory cavities

The secretory cavities of *P. paniculata* occur throughout the leaf blade and their differentiation is posterior to secretory trichomes differentiation. These aspects suggest that the cavities act in the chemical defense of mature leaves, while the

trichomes probably act in defense of young aerial organs against the action of herbivorous insects.

Internal secretory structures were considered uncommon in Polygalaceae (Solereeder 1908; Holm 1929). However, mucilage ducts, oil cells (Solereeder 1908; Holm 1929; Metcalfe & Chalk 1989; Aguiar-Dias *et al.* 2012) and cavities (Falcão *et al.* 1973; Piwpuan & Thammathaworn 2007; Aguiar-Dias *et al.* 2012) have been reported to the family, but these studies do not provide information on the ontogeny of these secretory structures. The secretory cavities can be originated from the fundamental meristem cells (Lersten 1986; Ciccarelli *et al.* 2001) as in *P. paniculata*, from protoderm (Curtis & Lersten 1994) or both (Bosabalidis & Tsekos 1982; Liang *et al.* 2006; Paiva & Machado 2007). The process of formation of cavity lumen is controversial and discussed in different species (Monteiro *et al.* 1995; Turner *et al.* 1998; Turner 1999; Paiva & Machado 2007; Fernandes *et al.* 2017). In *P. paniculata* we found that the cavities have a lysogenic origin, as reported by Aguiar-Dias *et al.* 2012. Lumen formation is initiated with central cell degradation and death and there is no evidence of cell separation at this stage, which characterizes that development as lysogen (Fahn 1979; Paiva & Machado 2007). The observation of middle lamella degradation and spacing between cells at the lumen development may be associated with tissue differentiation and leaf blade expansion, but they do not characterize the schizogenous development of the cavity at any stage.

The observations by LM and TEM in the early stages of development may lead to correct identification of the cavities origin (Bosabalidis & Tsekos 1982; Chen & Hu 2010), since they provide information about different aspects and give consistency to the obtained results (Machado *et al.* 2016). The disintegration of the initial cell of the cavity initiates the lumen formation of the cavity and characterizes the lysis process, as also observed in *Hymenaea stigonocarpa* (Paiva & Machado 2007). In *P. paniculata*, on the other hand, the formation of the lumen of the *P. paniculata* cavity is the result of the process of differentiation, secretory activity and cell death of each cell that is incorporated into the cavity, in such a way that the content of these cells is incorporated in the accumulated secretion in the lumen, favoring the increase of lumen space.

In general, the determination of lysogenic cavities origin may be the result of a misinterpretation of artifacts during tissue fixation process (Turner *et al.* 1998).

However, observations of cavity cells at different stages of development and the integrity of the mitochondria during cytoplasm disintegration indicate that the cell degradation is a result of programmed cell death process and not caused by tissue necrosis (Paiva & Machado 2007). In addition, the cell death process in *P. paniculata* is not synchronized among cells, but continuous, as also observed in colleters of *Tocoyena bullata* (Miguel *et al.* 2016), in such way that the cells are recruited in different moments of cavity formation. This characteristic shows that there are cells in the process of cell death and intact during the process, which confirms the evidence of cell death and refutes the possibility of artifacts during tissue fixation.

The ultrastructural aspects of the cells that constitute the secretory cavities are similar to those observed in trichomes: dense cytoplasm, rough and smooth endoplasmic reticulum, mitochondria, plastids and vesicles; and the population of organelles is compatible with those observed in cavities and secretory ducts of essential oils of other species (Rodrigues *et al.* 2011; Machado *et al.* 2016; Fernandes *et al.* 2017). However, unlike the secretory trichomes, the abundance of plastids with ribosomal granules and membrane system developed indicates that these organelles are related to the synthesis of secretions with predominance of high molecular weight terpenes, as the resins (Cheniclet & Carde 1985; Fahn 1988; Lacchia & Carmello-Guerreiro 2009).

The secretion of the cavities is predominantly composed of resins, non-volatile terpenes, although fractions of monoterpenes may be also constituents. The characteristics observed in *P. paniculata* plastids are similar to those observed in *Anacardium humille* (Lacchia & Carmello-Guerreiro 2009), *Clusia* sp. (Sá-Haiad *et al.* 2015), *Metrodorea nigra* (Machado *et al.* 2016) and *Casearia sylvestris* (Fernandes *et al.*, 2017), whose secretion is rich in resin. Changes in the plastids of cells entering the cavity include the concomitance between the degradation of the starch grains and the accumulation of oil droplets in the stroma. This feature indicates that the consumption of this reserve is a source of energy and carbon for the synthesis of secretion (Melo *et al.* 2010; Silva *et al.* 2016, Machado *et al.* 2016) and compartmentalization during the synthesis of essential oils (Cheniclet & Carde, 1985)

Root secreting cells

The absence of specialized secretory structures in the roots of *P. paniculata* corroborates the data found in the literature to date for the species (Falcão *et al.* 1973). Idioblasts or specialized secretory cells represent the most primitive secretory structures in plants, but differ from adjacent cells by size, content, and function (Fahn 1988). In the roots of *P. paniculata* any root cortical cell is suitable for the secretion of terpenoids, not characterizing idioblasts, but only a secretory tissue. In the *P. paniculata* shoot, terpenoids are secreted by specialized secretory structures, such as cavities and trichomes. It should be considered, therefore, that the roots have diversified less than shoot throughout the plant evolutionary process (Gifford & Foster 1996; Evert & Eichhorn 2013) and, consequently, they have more abundant and diversified secretory structures (Fahn 1979). However, secretory structures also occur in the roots of different taxonomic groups, including in the genus *Salomonina* (Polygalaceae) (Piwpuan & Thammathaworn 2007).

Histochemical aspects of trichomes, cavities and roots

Histochemical tests showed that trichomes, cavities and roots present lipid secretion, as evidenced by the Sudan reagent, specific for general lipids. This hydrophobic secretion is mixed and terpenic in nature, composed of essential oils, low molecular weight terpenes, and resins, high molecular weight (Lange 2015), as evidenced by the Nadi test, specific for this chemical group. Although histochemical analyzes have identified only essential oils and resins in *P. paniculata* secretions, these compounds may occur associated with other chemical classes (Ventrella & Marinho 2008; Mota *et al.* 2013; Lange 2015), not detected on these tests.

Analysis by gas chromatography identified different non-terpene substances in the secretion of flowers and roots of *P. paniculata* (Pizzolati *et al.* 2009), such as Methyl Salicylate (MeSa), phenylpropanoide in the analyzed secretion. The miscellany of chemical substances such as terpenoids and phenylpropanoids, such as MeSa, in *P. paniculata* may be related to the known secretion functions of trichomes and cavities: protection against insect predation (Dudareva *et al.* 2006), attraction of pollinators (Glas *et al.* 2012) and communication between species (plant-plant, plant-insect or plant-microorganisms) (Lange 2015).

The role of volatile compounds in aerial organs has been investigated for a long time under different aspects (Lanoue *et al.* 2010), and are commonly reported in trichomes (Lange & Turner 2013; Lange 2015) and cavities (Machado *et al.* 2016). But what would be the role of these chemicals in subterranean organs, such as roots? The function of the secretions found in the roots is far from being understood (Van Tol *et al.* 2001; Baetz & Martinoia 2014), since they are subterranean organs, which makes it difficult to carry out studies on their chemical composition (Lanoue *et al.* 2010). However, the different chemical properties related to compounds in the roots have aroused the interest of different study areas (Lanoue *et al.* 2010, Pizzolati *et al.* 2009; Baetz & Martinoia 2014). Plant roots are also subject to attacks by different soil organisms (van Tol *et al.* 2001). The release of volatile substances by subterranean organs may detain some microorganisms as an antimicrobial or anti-herbivorous mechanism of action (Ali *et al.* 2010), elicit in other organisms in tritrophic defense strategies attracting natural enemies of their herbivores (Vet & Dicke 1992) and to induce the synthesis and release of volatiles in neighboring plants, which may attract predatory organisms from their herbivores (Chamberlain *et al.* 2001). Thus, radicular secretions mediate numerous multitrophic defense strategies associated with rhizosphere (Ali *et al.* 2010; Rasman & Turlings, 2016).

CONCLUSIONS

Polygala paniculata presents three synthesis sites of essential oils: trichomes in leaves and stem, leaf cavities and parenchyma root cells. The unusual morphology of secretory trichomes is related to particular aspects of their secretory mechanism. The ultrastructural aspects of the trichomes, cavities and parenchyma roots cells are similar, except for the plastids that are absent in the roots, and correspond to the synthesis of essential oils. The development of trichomes, cavities and root-secreting cells involves programmed cell death mechanism. Particularities of the secretory mechanisms of each *Polygala paniculata* secretory site were firstly described in this work. These informations presents contributions to the understanding of secretion mechanism of hydrophobic substances in plant-secretory structures.

REFERENCES

- Aguiar-Dias A.C.A., Yamamoto K., Castro M.M. (2012) Anatomia foliar de cinco espécies de *Polygala* de restinga e cerrado1 leaf anatomy of five *Polygala* species (Polygalaceae) from restinga and cerrado. *Rodriguesia*, **63**: 395-404.
- Aguiar-Dias ACA., Cardoso-Gustavson P. (2011) Ontogeny of the mucilage ducts of *Polygala angulata* DC. (Polygalaceae). *Journal Torrey Botanical Society*. **138**: 255-261.
- Aguiar-Dias ACA., Cardoso-Gustavson P. (2011) Ontogeny of the mucilage ducts of *Polygala angulata* DC. (Polygalaceae). *Journal Torrey Botanical Society*. **138**: 255-261.
- Ali J.G., Alborn H.T., Stelinski L.L. (2010) Subterranean herbivore-induced volatiles released by citrus roots upon feeding by *Diaprepes abbreviatus* recruit entomopathogenic nematodes. *Journal of chemical ecology*, **36**: 361-368.
- APG II. (2003) An update of the Angiosperme Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **141**: 399-436.
- Ascensão L., Marques N., Pais M.S.S. (1997) Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonurus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. *International Journal of Plant Sciences*, **158**: 249-258.
- Ascensão L., Pais M.S. (1987) Glandular trichomes of *Artemisia campestris* (ssp. *maritima*): ontogeny and histochemistry of the secretory product. *Botanical Gazette*, **148**: 221-227.
- Ascensão L., Pais M.S. (1988) Ultrastructure and histochemistry of the secretory ducts in *Artemisia campestris* ssp. *maritima* (Compositae). *Nordic Journal of Botany*, **8**: 283-292.
- Baetz U., Martinoia E. (2014) Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, **19**: 90-98.

- Bosabalidis A., Tsekos I. (1982) Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* Ten. II. Development of the essential oil-accumulating central space of the gland and process of active secretion. *Protoplasma*, **112**:63-70.
- Bosabalidis A.M. (1990) Glandular trichomes in *Satureja thymbra* leaves. *Annals of Botany*, **65**: 71-78.
- Brundrett M.C., Kendrick B., Peterson C.A. (1991) Efficient lipid staining in plant material with Sudan Red 7B or fluoral yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotechnic & Histochemistry*, **66**: 111-116.
- Chamberlain, K., Guerrieri, E., Pennacchio, F., Pettersson, J., Pickett, J. A., Poppy, G. M., Woodcock, C. M. (2001) Can aphid-induced plant signals be transmitted aerially and through the rhizosphere?. *Biochemical Systematics and Ecology*, **29**: 1063-1074.
- Chen Y, Wu H. (2010) Programmed cell death involved in the schizolysigenous formation of the secretory cavity in *Citrus sinensis* L. (Osbeck). *Chinese Science Bulletin*, **55**: 2160-2168.
- Cheniclet C., Carde J.P. (1985) Presence of leucoplasts in secretory cells and of monoterpenes in the essential oil: a correlative study. *Israel Journal of Botany*, **34**: 219-238.
- Ciccarelli, D., Andreucci A.C., Pagni A.M. (2001) Translucent gland and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Annals of Botany*, **88**: 637-644.
- Coelho V.P.C, Agra M.F, Baracho G.S. (2008) Flora da Paraíba, Brasil: *Polygala* L. (Polygalaceae). *Acta Botanica Brasilica*, **22**: 225-239.
- Curtis J.D., Lersten N.R. (1994) Developmental anatomy of internal cavities of epidermal origin in leaves of *Polygonum* (Polygonaceae). *New Phytologist*, **127**:761-770.
- David R., Carde J.P. (1964) Coloration différentielle dès inclusions lipidique et terpeniques dès pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. Série

- D258. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris*, Paris, FRA.
- Dudareva N., Klempien A., Muhlemann J.K., Kaplan I. (2013) Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, **198**:16-32.
- Dudareva N., Negre F., Nagegowda D.A., Orlova I. (2006) Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical reviews in plant sciences*, **25**: 417-440.
- Effmert U., Saschenbrecker S., Ross J., Negre F., Fraser C.M., Dudareva J.P., Piechulla B. (2005) Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: from *in vitro* to in plant function. *Phytochemistry*, **66**: 1211-1230.
- Evert R.F. (2006) *Esaú's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development*. Jonh Wiley and Sons, New Jersey, CAN. 624 p.
- Evert R.F., Eichhorn S.E. (2013) *Raven Biology of Plants*. 8.ed. New York:Freeman and Company Publishers
- Fahn A. (1979) *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London, UK. 302 p.
- Fahn A. (1988) Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, **108**: 229-257.
- Falcão W.F.A., Alencastro F.M.M.R., Correia I.L. (1973) Notas sobre a anatomia e morfologia da espécie *Polygala paniculata* L. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, **19**: 281-294.
- Fernandes V.F., Thadeo M., Dalvi V.G., Meira, R.M.S.A. (2017) Secretory structures in *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae): diversity, mechanisms of secretion, and exudate complexity. *International Journal of Plant Sciences*, v. online, 000-000.
- Furr M., Mahlberg P.G. (1981) Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal Natural Products*, **44**: 153-159.
- Gifford E.M., Foster A.S. (1996) Morphology and evolution of vascular plants. 3.ed. New York: Freeman and Company Epling grown in Italy. *Annals of Botany*, **83**: 441-452.

- Glas J.J., Bernardus C., Schimmel J., Alba J.M., Escobar-Bravo R., Schuurink R.C., Merijn R.K. (2012) Plant glandular trichomes as targets for breeding or engineering of resistance to herbivores. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**:17077-17103.
- Holm T. (1929) Morphology of North American species *Polygala*. *Botanical Gazette*, **88**: 167-185.
- Johansen D.A. (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York, NY, USA. 523 p.
- Karnovsky M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use electron microscopy. *Cell Biology*, **27**,137.
- Lacchia A.P.S., Carmello-Guerreiro S.M. (2009) Aspectos ultra-estruturais dos canais secretores em órgãos vegetativos e reprodutivos de Anacardiaceae. *Acta Botânica Brasilica*, **23**: 376-388.
- Lange B., Turner M., Glenn W. (2013) Terpenoid biosynthesis in trichomes—current status and future opportunities. *Plant Biotechnology Journal*, **0**:1–21
- Lanoue A., Burlat V., Henkes G. J., Koch Imke., Schurr U., Röse U.S.R. (2010) *De novo* biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley. *New Phytologist* **185**: 577–588.
- Lapa F.R., Gadoti V.M., Missau F.C., Pizzolatti M.G., Marques M.C., Dafré A.L., Farina M., Rodrigues A.L.S, Santos A.R.S. (2009) Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **104**: 306:315.
- Lapa F.R., Soares K.C., Rattmanna Y.D., Crestiana S., Missaub F.C., Pizzolatti M.G., Marques M.C.A., Rieck L., Santos A.R.S. (2011) Vasorelaxant and hypotensive effects of the extract and the isolated flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **63**: 875-881.
- Lersten N.R. (1986) Re-investigation of secretory cavity development in *Lysimachia* (Primulaceae). *New Phytologist*, **102**:193-197.

- Liang S.J., Wu H., Lun D.W. (2006) Secretory cavity development and its relationship with the accumulation of essential oil in fruits of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle. *Journal Integrative Plant Biology*, **48**: 573-583.
- Liu Z. (2004) Secretory structures and their relationship to accumulation of camptothecin in *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). *Acta Botanica Sinica*, **46**: 1242-1248.
- Lorenzi H., Matos F.J.A. (2002) Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, São Paulo: Instituto *Plantarum*, p 386.
- Lüttge U. (1971) Structure and function of plant glands. *Annual Review Plant Physiology*, **22**: 23-44.
- Mace M.E., Howell C.R. (1974) Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany*, **52**: 2423-2426.
- Machado S.R., Gregório E.A., Guimarães E. (2006) Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany*, **97**: 357-369.
- Maffei M.E. (2010) Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, **76**: 612-631.
- Marinho C.R., Oliveira, R.B., Teixeira, S.P. (2016) The uncommon cavitated secretory trichomes in *Bauhinia s.s.* (Fabaceae): the same roles in different organs. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **180**:104-122.
- Matos F.J.A. (2000) *Plantas Medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil*. 2 ed. Fortaleza, Imprensa Universitária - UFC.
- McClatchey W. (1996) The ethnopharmacopoeia of *Rotuma*. *Journal of Ethnopharmacology*, **50**: 147-156.
- McManus J.F.A. (1948) Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*, **23**: 99-108.

- Melo M.C., Borba E.L., Paiva E.A.S. (2010) Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: *Pleurothallidinae*). *Plant Systematic Evolution*, **286**:141-151.
- Metcalf C.R., Chalk L. (1957) *Anatomy of the Dicotyledons - leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Clarendon Press, Oxford. p 1500.
- Metcalf C.R., Chalk L. 1989. *Anatomy of the Dicotyledons*. Clarendon Press. Oxford, UK. 330 p.
- Miguel M.C., Miguel T.B.A.R., Barros C.F. (2016) Ontogenesis secretion and senescence of *Tocoyena bullata* (Vell.) Mart. (Rubiaceae) colleters. *Plant Biology*, **18**:851-858.
- Monteiro W.R., Castro M.M., Fahn A., Caldeira W. (1995) Observations on the development of the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* (Asteraceae). *Nordic Journal of Botany*, **15**: 69-76.
- Mota L., Figueiredo A.C., Luis G.P., Barroso J.G., Ascensão L. (2013) Glandular trichomes, histochemical localization of secretion, and essential oil composition in *Plectranthus grandidentatus* growing in Portugal. *Flavour Fragrance Journal*, **28**: 393-401.
- Nogueira F.L.P., Fernandes S.O.B., Reis G.M., Matheus M.E., Fernandes P.D., Lage C.L.S., Menezes F.S. (2005) Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **154**: 310-315.
- O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, **59**: 368-373.
- Paiva E.A.S., Machado S.R. (2007) Structural and ultrastructural aspects of ontogenesis and differentiation of resin secretory cavities in *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae-Caesalpinioideae) leaves. *Nordic Journal of Botany*, **24**: 423-432.

- Paiva E.A.S., Martins, L.C. (2011) Calycinal trichomes in *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae): ontogenesis, structure and functional aspects. *Australian Journal of Botany* **59**:91-98.
- Persson C. (2001) Phylogenetic relationships in Polygalaceae based on plastid DNA sequences from the trnL-F region. *Taxon*, **50**: 763-779.
- Piwpuan N., Thammathaworn A. (2007) A comparative anatomy of *Salomonina* Lour. (Polygalaceae) in Thailand. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University*, **7**: 121-129.
- Pizzolatti M.G., Koga A.H., Grisar E.C., Steindel M. (2002) Trypanocidal activity of extracts from brazilian atlantic rain forest plant species. *Phytomedicine*, **9**: 422-426.
- Pizzolatti M.G., Mendes B.G., Soldi C., Missau F.C., Bortoluzzi H.J., Carasek E. (2011) Analysis of volatile compounds released from flowers and roots of *Polygala cyparissias* and *Polygala paniculata* by Headspace/SPME. *Journal Essential Oil Research*, **21**: 255-258.
- Possobom C.C.F., Guimarães E., Machado S.R. (2015) Structure and secretion mechanisms of floral glands in *Diplopterys pubipetala* (Malpighiaceae), a neotropical species. *Flora*, **211**: 26-39
- Rasman S., Turlings T.C.J. (2008) First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. *Oikos*, **117**: 362-369
- Reynolds E.S. (1963) The use of the lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **17**: 208-212.
- Rodrigues T.M., Teixeira S.P., Machado, S.R. (2011) The oleoresin secretory system in seedlings and adult plants of copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf., Leguminosae-Caesalpinioideae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, **206**: 585-594.
- Roland J.C. (1978) General preparations and staining of thin sections. In: Hall J.L. ed. *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. New York: Elsevier, 1-62.

- Sá-Haiad B., Silva C.P., Paula R.C., Rocha J.F., Machado S.R. (2015) Androecia in two *Clusia* species: development, structure and resin secretion. *Plant Biology*, **17**: 816-824.
- Souza C.D., Marinho C.R., Teixeira S.P. (2013). Ontogeny resolves gland classification in two caesalpinoid legumes. *Trees*, **27**: 801-813.
- Solereeder H. 1908. *Systematic anatomy of dicotyledons*. Clarendon Presse, Oxford, UK. 564p.
- Tuner G.W., Berry A.M., Gifford E.M. (1998) Schizogenous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Bum. F. and a re-evaluation of the lysigenous gland concept. *International Journal of Plant Science*, **159**: 75-88.
- Turner G.W. 1999. A brief history of the lysigenous gland hypothesis. *Botanical Review*, **65**:76-88.
- van Tol W.H.M., Boff M.I.C., Bezooijen J., Sabelis, M.W., Smits P.H. (2001) Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs Rob. *Ecology Letters*, **4**: 292-294.
- Ventrella M.C., Marinho C.R. (2008) Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. *Revista Brasileira de Botânica*, **31**: 457-467.
- Vet L.E.M., Dicke M. (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annuals Reviews Entomology*, **37**: 141-172.
- Victório C.P., Carriço, J.B., Lage C.L.S. (2011) *Polygala paniculata*: a source of methyl salicylate produced through plant tissue culture. *Revista Ceres*, **58**: 269-272.
- Vidal B.C. (1970). Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. *Annales d'Histochemie*, **15**: 289-296.
- Wagner G.J., Wang E., Shepherd R.W. (2004) New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany*, **93**: 3–11.

- Watson M.L. (1958) Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemistry Cytology*, **4**: 475–478.
- Werker E. (1993) Function of essential oil-secreting glandular hairs in aromatic plants of the Lamiaceae - a review. *Flavour Fragrance Journal*, **8**: 249-255.
- Werker E. (2000) Trichome diversity and development . *Advances in Botanical Research*, **31**: 1-35.
- Willats W.G.T., McCartney L., Mackie W., Knox J.P. (2001) Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, **47**: 9-27.

CAPÍTULO II:

EFEITO DA QUALIDADE DA LUZ, AGENTES GELEIFICANTES E SACAROSE NO CRESCIMENTO *IN VITRO* E MORFOANATOMIA FOLIAR DE *Polygala paniculata* L.

RESUMO

Efeitos de diferentes espectros de luz, agentes geleificantes e concentração de sacarose foram testados no desenvolvimento *in vitro* de *Polygala paniculata*. Os tratamentos foram: uso de lâmpadas fluorescentes (LF), lâmpadas LED com luz branca (LB), lâmpadas LED com luz azul:vermelho (LAV) com irradiâncias de $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Segmentos nodais foram inoculados em ágar com 15 gL^{-1} (A15) ou 30 gL^{-1} (A30) e em Phytigel com 15 gL^{-1} (P15) ou 30 gL^{-1} (P30). Desse modo, totalizou-se 12 tratamentos: A15LF; A15LB; A15LAV; A30LF; A30LB; A30LAV; P15LF; P15LB; P15LAV; P30LF; P30LB; P30LAV. Após 45 dias de cultivo os aspectos morfológicos e anatômicos foram avaliados. Os fatores avaliados influenciaram significativamente a morfologia e anatomia de *P. paniculata*. Os tratamentos com LF, em ágar ou Phytigel, induziram o desenvolvimento e a anatomia similares aos observados em plantas *ex situ*. Todavia, os tratamentos com 30 gL^{-1} de sacarose induziram um aumento na espessura da lâmina foliar com o aumento do volume celular dos parênquimas paliçádico e lacunoso e redução dos espaços intercelulares. Plantas cultivadas em LB e LAV em concentrações maiores de sacarose em ambos agentes geleificantes apresentaram mesofilo menos espesso. A luz fluorescente favorece o desenvolvimento *in vitro* de *P. paniculata*. Todavia, aspectos fotossintéticos e ultraestruturais devem ser analisados para avaliar o efeito da qualidade de luz sobre as organelas e fisiologia da espécie. Dada a importância dos comprimentos de onda AV na diferenciação dos tecidos e desenvolvimento das plantas, sugere-se diferentes proporções dos mesmos sejam testados em *P. paniculata*.

Palavras chave: ágar, anatomia, qualidade da luz, Phytigel

ABSTRACT

Effects of different light spectra, gelling agents and sucrose concentration in vitro development with out performance of *Polygala paniculata* were tested. The treatments were: fluorescent lamps (LF), LEDs with white light (LB), LED with blue and red light (LAV) with of $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ irradiation of, Nodal segments were inoculated in agar with 15 g L^{-1} (A15) ou 30 g L^{-1} (A30) and Phytigel with 15 g L^{-1} (P15) or 30 g L^{-1} (P30). Thus, a total of 12 treatments were performed: A15LF; A15LB; A15LAV; A30LF; A30LB; A30LAV; P15LF; P15LB; P15LAV; P30LF; P30LB; P30LAV. After 45 days of culture, the morphological and anatomical aspects were evaluated. The evaluated factors significantly influenced the morphology and anatomy of *P. paniculata*. The treatments with LF, in agar or Phytigel, induced the development and anatomy similar to those observed in *ex situ* plants. However, the treatments with 30 g L^{-1} of sucrose induced an increase of leaf blade thickness with an increasing palisade and spongy parenchyma cellular volume and reduction of the intercellular spaces. Plants grown in LB and LAV at higher concentrations of sucrose in both gelling agents showed thinner mesophyll. Fluorescent light favors the *in vitro* development of *P. paniculata*. However, photosynthetic and ultrastructural aspects should be analyzed to evaluate the effect of light quality on the organelles and physiology of the species. Given the importance of AV wavelengths in tissue differentiation and plant development, different ratios of the same assays in *P. paniculata*.

Key words: agar, anatomy, light quality, Phytigel

INTRODUÇÃO

Polygala paniculata L. (Polygalaceae) é uma espécie nativa, herbácea e de valor medicinal amplamente explorado nas Américas Central e do Sul (Persson, 2001). Extratos alcoólicos das raízes de *P. paniculata*, produtoras de óleos essenciais (Pizzolatti *et al.* 2011), são utilizados em tratamentos tópicos de traumas e luxações (Lorenzi e Mattos, 2002). As propriedades medicinais da espécie têm sido confirmadas em estudos que indicam atividades antiinflamatórias, antiedematogênicas (Nogueira *et al.* 2005), antinociceptiva (Lapa *et al.* 2009), vasorelaxantes e hipotensivas (Lapa *et al.* 2011). As folhas de *P. paniculata* também sintetizam óleos essenciais com propriedades químicas semelhantes às observadas na secreção das raízes, embora apresentem proporções químicas distintas entre seus componentes (Pizzolatti *et al.* 2009).

O cultivo de plantas *in vitro* constitui importante estratégia biotecnológica para produção de plantas com valor medicinal, favorecendo a síntese de compostos de interesse. A manipulação e o controle das condições ambientais externas e internas (Gupta e Jatohu, 2013), como determinação do meio de cultura (Saldanha *et al.* 2014), controle das trocas gasosas (Vurro *et al.* 2009; Saldanha *et al.* 2013), concentração de sacarose (Pruski *et al.* 2000) e luminosidade (Alvarez *et al.* 2012), podem contribuir para a obtenção de plantas com uniformidade genética, qualidade morfofisiológica e química (Panizza e Tognoni, 1988; Zuzarte *et al.* 2010; Vieira *et al.* 2015).

A qualidade espectral é determinante para as características morfológicas e fotossintéticas das plantas (Topchy *et al.* 2005). A luz é a principal fonte de energia para o metabolismo fotossintético das plantas (Stuefer e Huber, 1998), e possui papel chave em vários aspectos do desenvolvimento (Arena *et al.* 2016), como a morfogênese (Gupta e Jatohu, 2013), diferenciação do aparato fotossintético (Schuerger *et al.* 1997), bem como a composição química das plantas (Alvarenga *et al.* 2015; Batista *et al.* 2016; Szopa e Ekiert, 2016). O papel modulador da luz sobre os diferentes aspectos do desenvolvimento vegetal é mediado pela qualidade espectral fornecida, a quantidade de radiação e o fotoperíodo (Reuveni e Evernor, 2007; Arena *et al.* 2016; Szopa e Ekiert, 2016).

Lâmpadas fluorescentes apresentam amplo espectro de comprimentos de onda (320 a 800 nm) com poucas possibilidades de ajuste (Vieira *et al.* 2015) e são tradicionalmente utilizadas no cultivo *in vitro* por apresentar resultados significativos sobre o crescimento das plantas (Sæbø *et al.* 1995; Szopa e Ekiert; 2016). No entanto, o uso de lâmpadas LED permite a determinação de comprimentos de ondas específicos e fundamentais aos processos fotossintético das plantas, como a luz azul (450-495nm) e luz vermelha (620-750 nm) e, por isso, tem sido avaliado em diferentes culturas vegetais (Sæbø *et al.* 1995; Shin *et al.* 2008). A irradiação de comprimentos de onda fotossinteticamente ativos pode favorecer a morfogênese dos tecidos foliares, organelas celulares e, conseqüentemente, do aparato fotossintético (Vieira *et al.* 2015), uma vez que, embora sejam pouco estudadas, alterações significativas na anatomia e ultraestrutura foliar podem justificar baixos níveis de fotossíntese, desenvolvimento e síntese de compostos de interesse.

Vários estudos têm indicado respostas distintas em plantas submetidas a diferentes quantidades e qualidades de luz (Barreiro *et al.* 1992; Schuerger *et al.* 1995; Arena *et al.* 2016), sugerindo que a resposta vegetal pode ser espécie-dependente (Arena *et al.* 2016). Apesar disso, estudos sobre os efeitos da qualidade de luz sobre o desenvolvimento vegetal podem ampliar o conhecimento sobre essas respostas e contribuir para o estabelecimento de condições adequadas ao cultivo de espécies de interesse comercial (Szopa e Ekiert, 2016).

Assim como a qualidade espectral, a determinação do agente geleificante afeta o desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro* (Debergh, 1983; Bhattacharya *et al.* 1994; Kumar *et al.* 2003), podendo apresentar composições químicas distintas e influenciar a disponibilidade de água e nutrientes para os explantes cultivados (Dobránszki *et al.* 2011; Ivanova e Van Staden, 2011). O ágar, agente geleificante predominantemente utilizado no cultivo *in vitro* (Puchooa *et al.* 1999; Dobránszki *et al.* 2011) é extraído da parede celular de algas marinhas vermelhas (Gelidiaceae e Graciliaceae), e é constituído por uma mistura complexa dos polissacarídeos agarose e agarpectina (Dobránszki *et al.* 2011). A ampla utilização do ágar justifica-se em função de sua estabilidade e resistência à ação de enzimas vegetais ao longo do cultivo (Puchooa *et al.* 1999). No entanto, seu uso pode representar maior custo, superexploração de sua fonte (Jain e Babbar, 2002) e estar associado a efeitos negativos sobre o desenvolvimento das plantas, como hiperidricidade, em função da

presença de impurezas e contaminantes que podem ser encontrados em lotes de diferentes marcas (Deberg, 1983; Reis *et al.* 2005; Puchooa *et al.* 1999).

Em alternativa ao uso de ágar, outros agentes geleificantes, com o Phytigel (“gellangum” ou Gelrite), têm sido testados em diferentes culturas vegetais (Reis *et al.* 2005; Dobránszki *et al.* 2011). O Phytigel é obtido de bactérias (*Pseudomonas elodea*), apresenta maior qualidade e pureza que o ágar (Reis *et al.* 2005; Ivanova e Van Staden, 2011), coloração translúcida (Reis *et al.* 2005) e menor concentração de substâncias que promovam a resistência ou “dureza” do gel (Ivanova e Van Staden, 2011). Além disso, a utilização do Phytigel como agente geleificante em detrimento ao uso de ágar justifica-se pelo menor custo (Cavallaro *et al.* 2014) e por apresentar resultados significativos sobre o desenvolvimento de diferentes espécies como *Passiflora edulis* (Passifloraceae) (Reis *et al.* 2005) e *Arundo donax* (Poaceae) (Cavallaro *et al.* 2014). Apesar dos resultados positivos, desordens morfoanatômicas, como a hiperidricidade, também foram identificadas em cultivo *in vitro* com Phytigel (Franck *et al.* 1997).

A adição de sacarose ao meio de cultura é essencial ao desenvolvimento e manutenção das plantas em sistemas de cultivo *in vitro* (Pruskiet *al.* 2000; Serret e Trilla, 2000) heterotróficos ou fotomixotróficos (Kozai, 2010). Nesse último sistema, o cultivo em frascos ou outro recipiente pode reduzir os mecanismos fotossintéticos das plantas, mesmo havendo trocas gasosas com o meio (Kozai, 2010). Por isso, a adição de sacarose ao meio de cultivo, nesse sistema, representa fonte de energia para os explantes em desenvolvimento (Kozai, 2010), tendo em vista que o potencial fotossintético em condições *in vitro* pode ser reduzido.

O conhecimento sobre o cultivo *in vitro* de *P. paniculata* é restrito ao estudo de Victório *et al.* (2011), que avaliaram os efeitos de citocininas sobre a produção de biomassa e aumento da concentração de salicilato de metila. Esse estudo, por sua vez, teve por objetivo avaliar o efeito da qualidade de luz, agente geleificante e sacarose sobre o desenvolvimento e anatomia foliar de *P. paniculata*, visando determinar as condições de cultivo que permitam a obtenção de plantas com maior qualidade morfofisiológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e germinação *in vitro*

As sementes maduras foram obtidas da população natural de *Polygala paniculata*, popularmente conhecida como 'gelolzinho', localizada na Reserva Florestal Mata do Paraíso, município de Viçosa (20°48'01'' S e 42°51'51'' W), Minas Gerais, Brasil. As sementes foram escarificadas mecanicamente com o auxílio de lixa (300), e, posteriormente, imersas em etanol 70% por 1 min, transferidas para uma solução a 2.0% (v/v) a partir de hipoclorito de sódio comercial (5.0% cloro ativo; Super Globo[®], Contagem, Brasil) com 100µL de Tween 20[®] por 20 min, e lavadas três vezes em água destilada. As sementes foram, subsequentemente, transferidas para frascos de vidro (250 mL de capacidade), com 10 sementes por frasco (um total de 200 sementes) contendo 70 mL de meio de cultura composto pelos sais e vitaminas do meio MS (Murashige e Skoog 1962), 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 6.5 g L⁻¹ de ágar Merk[®], com pH ajustado para 5,7 ± 0,1, sendo autoclavado a 120 °C, 108 kPa por 20 min. As sementes foram mantidas em sala de crescimento por 30 dias, com fotoperíodo de 16 h, sob irradiância de 36 µmol m⁻² s⁻¹ provenientes de 2 lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia, 20W, Osram, Brazil) e temperatura de 25 ± 2 °C.

Efeito da qualidade da luz, agentes geleificantes e sacarose sobre *Polygala paniculata*

Segmentos nodais (1 cm comprimento) foram transferidos para frascos de vidro com 250 mL de capacidade vedados com tampa rígida de polipropileno com dois orifícios com 10 mm de diâmetro, coberto com duas membranas com 0.45 µm de poro (MilliSeal[®] AVS-045 Air Vent, Tokyo, Japan) com níveis de troca de CO₂ de 25 µL L⁻¹ s⁻¹ (Batista *et al.* 2017). Os explantes, quatro por frasco, foram inoculados em meio de cultura contendo sais MS e vitaminas, duas concentrações de sacarose 15 ou 30 g L⁻¹, 100 mgL⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich[®] Co, St. Louis, MO). Dois agentes geleificantes foram usados nesses tratamentos: 6.5 gL⁻¹ de ágar (A) (Merck[®], Darmstadt, Germany) e 2.5 g L⁻¹ de Phytigel[®] (P) (Sigma-Aldrich[®] Co). O pH ajustado para 5,7 ± 0,1, e o meio de cultura foi autoclavado a 120 °C, 108 kPa por 20 min. Os frascos foram mantidos em salas de crescimento com regime luminoso de 16h e temperatura de 25 ± 2 °C. Cada tratamento foi testado com três

diferentes fontes de luz: duas lâmpadas fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brazil), duas lâmpadas LED branca (SMD 100, 18 W, Vilux[®], Vitória, ES, Brazil), e duas lâmpadas LED com comprimentos de onda azul/vermelho (LabPAR LL-HR/DB-480, 11.6 W) (LabLumens[®], Carapicuíba, SP, Brazil), na proporção 1:1, totalizando 12 tratamentos (Tabela 1) com 10 replicatas por tratamento. A irradiância foi padronizada em 56 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por meio de um irradiômetro (LI-250A, LICOR[®] Inc., Lincoln, NE) e o espectro de absorção luminosa nas bancadas foi registado num intervalo de comprimento de onda de 200 a 800 nm com um espectrorradiômetro Ocean Optics Spectra-Suite, sistema de aquisição de dados de software (Ocean Optics[®], Dunedin, FL). Após 45 dias de cultivo, foram realizadas análises quantitativas e qualitativas da morfoanatomia de *P. paniculata*.

Tabela 1. Tratamentos utilizados no cultivo *in vitro* de *Polygala paniculata*.

Agente geleificante:concentração de sacarose:qualidade de luz	Tratamento
Ágar: 15 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada fluorescente	A15LF
Ágar: 15 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada LED branca	A15LB
Ágar: 15 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada LED azul:vermelho	A15LAV
Ágar: 30 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada fluorescente	A30LF
Ágar: 30 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada LED branca	A30 LB
Ágar: 30 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada LED azul:vermelho	A30 LAV
Phytigel: 15 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada fluorescente	P15LF
Phytigel: 15 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada LED branca	P15LB
Phytigel: 15 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada LED azul:vermelho	P15LAV
Phytigel: 30 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada fluorescente	P30LF
Phytigel: 30 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada LED branca	P30 LB
Phytigel: 30 g L ⁻¹ de sacarose: Lâmpada LED azul:vermelho	P30LAV

Análises anatômicas

Fragmentos foliares de plantas *in situ* e *in vitro* foram coletados em populações naturais e no final do período de cultivo, respectivamente. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsk (2.5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, e 5

mM CaCl₂ em 0.1 M tampão cacodilato, pH 7,2) (Karnovsky, 1965) por 24h a 4°C. Para a microscopia de luz, as amostras foram lavadas três vezes em água por 3 min cada, desidratada em série etanólica e incluídas em 2-hidroxietilmetacrilato (Historesin, Leica, Heidelberg, Alemanha). Secções transversais (5µm de espessura) foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA), coradas com azul de toluidina 0,05% pH 4,4 (O'Brien et al., 1964) e montadas com resina sintética (Permount, Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA). As imagens das análises estruturais foram obtidas em câmera fotográfica digital (AxioCam HRc, Zeiss, Göttinger, Alemanha) e microcomputador com o programa de captura de imagens Axion Vision acoplados a um microscópio de luz (AX-70 TRF, Olympus Optical, Tokyo, Japão).

Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x2x2 (qualidades espectrais x meios de cultura x concentrações de sacarose), totalizando 12 tratamentos, com 10 replicatas, sendo cada replicata composta por um frasco com quatro plantulas. Para avaliar o efeito dos fatores ambientais sobre a anatomia foliar de *P. paniculata*, foram feitas cinco fotografias de três secções de três lâminas histológicas, selecionadas aleatoriamente. Os parâmetros espessura total da folha; da epiderme das faces adaxial e abaxial do mesofilo; do parênquima paliçádico e parênquima lacunoso, foram mensurados com o auxílio do software Image Pro Plus, sendo que para cada variável foram feitas cinco medições. Parâmetros de porte, desenvolvimento, desenvolvimento do sistema radicular e número de brotações laterais foram observados.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, seguida da comparação entre as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico Genes, versão Windows/2011.9.0 (Cruz, 2013).

RESULTADOS

Aspectos morfológicos das plantas de *P. paniculata* cultivadas *in vitro*

Os diferentes fatores testados (qualidade luminosa, agente geleificante e concentração de sacarose) resultaram em características morfológicas variadas das plantas (Figura 1). Os tratamentos em ágar apresentaram plantas de porte ereto, bem desenvolvidas e com sistema radicular diferenciado (Figuras 1A e 1B). As plantas submetidas aos tratamentos A15LB, A15LF e A15LAV apresentaram maior crescimento, menor número de brotações laterais e folhas expandidas com lâmina foliar larga (Figura 1A). As plantas submetidas aos tratamentos A30LB, A30LF e A30LAV apresentaram plantas com menor crescimento, maior número de brotações laterais e folhas expandidas com lâmina foliar estreita (Figura 1B). Os tratamentos em Phytigel apresentaram plantas de porte ereto, pouco desenvolvidas, sem sistema radicular diferenciado e induziram a diferenciação de meristemas reprodutivos (Figuras 1C; 1D). As plantas submetidas aos tratamentos P15LB, P15LF e P15LAV apresentaram menor crescimento, menor número de brotações laterais, folhas pouco expandidas com lâmina foliar estreita (Figura 1C). As plantas submetidas aos tratamentos P30LB, P30LF e P30LAV apresentaram plantas com poucas brotações laterais, folhas diminutas com lâmina foliar estreita (Figura 1D). Nota-se ainda que essas plantas apresentaram abscisão foliar e morte de alguns explantes (Figura 1D). As plantas não apresentaram sinais de hiperidricidade em nenhum tratamento.

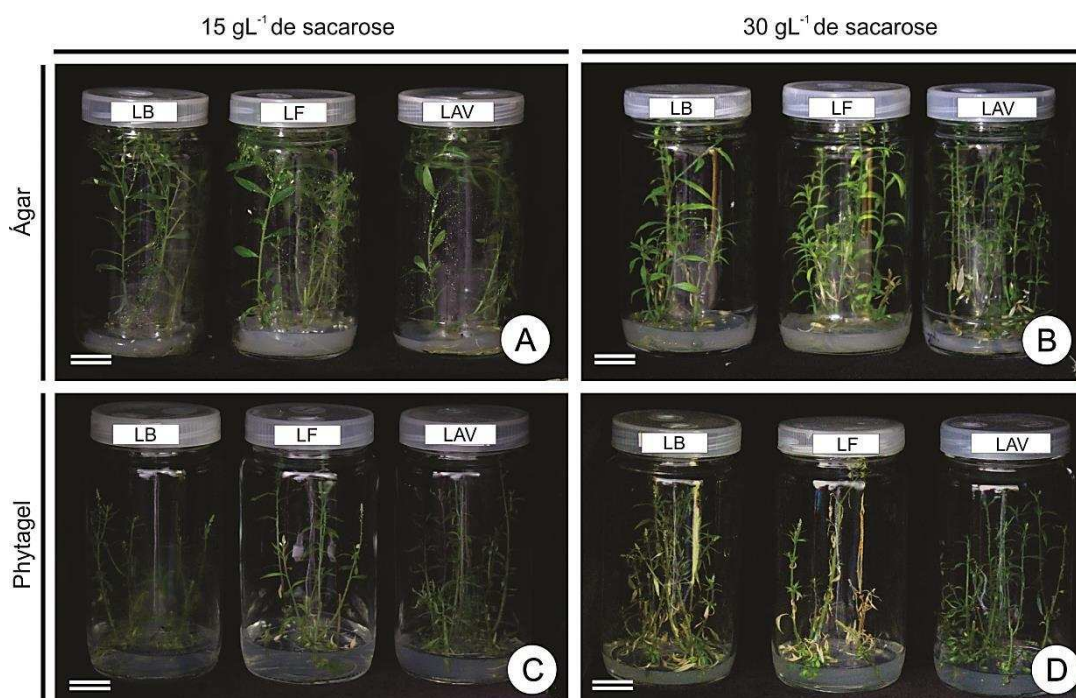


Figura 1. Plantas *in vitro* de *P. paniculata* cultivadas sob diferentes qualidades espectrais, agentes geleificantes e concentração de sacarose. A-D. Plantas com 45 dias de cultivo. **A.** Plantas cultivadas em ágar com 15 gL⁻¹ de sacarose. **B.** Plantas cultivadas em ágar com 30 gL⁻¹ de sacarose. **C.** Plantas cultivadas em Phytigel com 15 gL⁻¹ de sacarose. **D.** Plantas cultivadas em Phytigel com 30 gL⁻¹ de sacarose. LB: luz branca; LF: luz fluorescente; LAV: LED azul:vermelha.

Características anatômicas das folhas de *P. paniculata*

As folhas de *P. paniculata in situ* apresentam estrutura dorsiventral e anfiestomática (Figura 2A). A nervura principal possui contorno côncavo-convexo no ápice e plano-convexo na base e meio (Figura 2B). Não existe tecido especializado de sustentação, sendo o córtex formado por parênquima paliçádico acima do sistema vascular central e parênquima fundamental abaixo do sistema vascular central (Figura 2B). O sistema vascular é do tipo colateral com apenas um feixe central levemente arqueado (Figura 2B). A epiderme é unisseriada e composta por células cuboides (Figura 2C). O mesofilo é dorsiventral, possui parênquima paliçádico unisseriado e parênquima lacunoso com aproximadamente cinco camadas de células (Figura 2A, 2C). Cavidades secretoras estão distribuídas no mesofilo (Figura 2A).

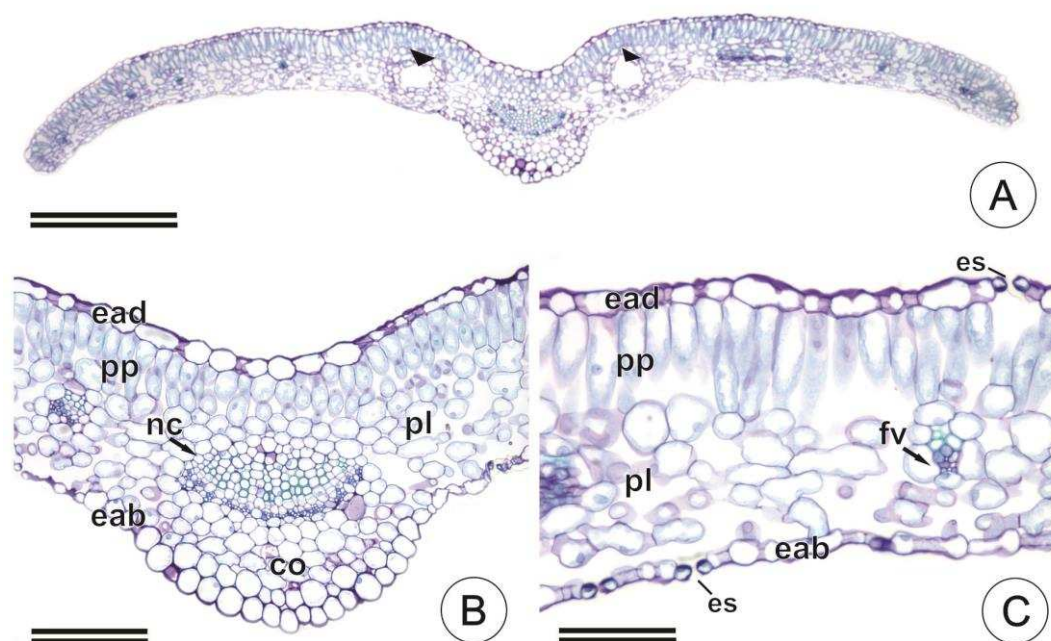


Figura 2. Aspectos anatômicos das folhas de *Polygala paniculata* cultivada *in situ*. **A.** Aspecto geral da folha. **B.C.** Detalhe de A. **B.** Nervura mediana. **C.** Mesofilo

dorsiventral. ead: epiderme adaxial; eab: epiderme abaxial; co: córtex; pl: parênquima lacunoso; pp: parênquima paliçádico. Pontas de seta indicam cavidades secretoras. Barras: A: 200 µm; B.C: 100 µm.

Cultivo in vitro de *P. paniculata*

O cultivo de *P. paniculata* sob diferentes condições ambientais não alterou a estrutura dorsiventral e anfiestomática da lâmina foliar observada em plantas *ex situ* (Figura 2). No entanto, análises estatísticas dos dados mensurados evidenciaram diferenças resultantes das combinações entre qualidade de luz e agentes geleificantes (Tabela 2) e agentes geleificantes e concentração de sacarose (Tabela 3). A relação entre qualidade de luz e concentração de sacarose não apresentou interação estatisticamente significativa.

Qualidade da luz x agente geleificante

Em plantas cultivadas em ágar as características analisadas apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as qualidades espectrais (Tabela 2). A espessura foliar de plantas cultivadas em LF foi maior em relação às plantas cultivadas em LB e em LAV. A espessura da epiderme adaxial de plantas cultivadas em ágar e LF também foi maior em relação a epiderme adaxial de plantas cultivadas em LB e LAV, os quais não diferiram entre si. A espessura do parênquima paliçádico foi maior em plantas cultivadas em ágar e LF em relação àquelas cultivadas em LB e em LAV, que não diferiram entre si. A espessura do parênquima lacunoso de plantas cultivadas em ágar e LF ou LB não diferiram entre si, mas foram maiores que em plantas cultivadas em LAV. A espessura da epiderme abaxial de plantas cultivadas em LF foi maior que em plantas cultivadas em LAV, mas ambos os tratamentos não diferiram das plantas cultivadas em LB.

Em plantas cultivadas em Phytigel, algumas características analisadas também apresentaram diferenças entre as qualidades espectrais (Tabela 2). A espessura foliar de plantas cultivadas em Phytigel não diferiu entre as qualidades de luz testadas. A espessura das epidermes adaxial e abaxial de plantas cultivadas em Phytigel em LF foi menor que aquelas cultivadas em LB e LAV, que não diferiram

entre si. A espessura dos parênquimas paliçádico e lacunoso em plantas cultivadas em Phytigel também permaneceu constante entre as diferentes qualidades espectrais analisadas.

Comparando as plantas cultivadas em ágar com as cultivadas em Phytigel também houveram diferenças significativas entre as características anatômicas avaliadas. A espessura foliar foi maior em plantas cultivadas em ágar que em plantas cultivadas em Phytigel sob LF, e maior em plantas cultivadas em Phytigel que em plantas cultivadas ágar sob LAV, sem diferença significativa entre os dois agentes geleificantes sob LB. Tanto a espessura da epiderme adaxial como a espessura da epiderme abaxial foram maiores em ágar sob LF e maiores em Phytigel nos demais tipos de luz analisados. A espessura do parênquima paliçádico foi maior em plantas cultivadas em ágar sob LF, mas não diferiu entre os agentes geleificantes nas demais qualidades de luz analisados. A espessura do parênquima lacunoso foi maior em plantas cultivadas em ágar sob LF e maior em plantas cultivadas em Phytigel sob LAV, mas não diferiu entre os agentes geleificantes quando cultivadas sob LB.

Tabela 2. Características anatômicas de plântulas *in vitro* de *Polygala paniculata* afetadas pela relação entre condições luminosas e agentes geleificantes, após 45 dias de cultivo.

Espessura foliar (mm)		
Qualidade de luz	Agente geleificante	
	Ágar	Phytigel
Fluorescente	0,225 Aa	0,179 Ba
LED Branca	0,189 Ab	0,199 Aa
LED AV*	0,162 Bb	0,209 Aa
Epiderme adaxial (mm)		
Qualidade de luz	Agente geleificante	
	Ágar	Phytigel
Fluorescente	0,019 Aa	0,017 Bb
LED Branca	0,016 Bb	0,020 Aa
LED A/V*	0,016 Bb	0,019 Aa
Parênquima paliçádico (mm)		
Qualidade de luz	Agente geleificante	
	Ágar	Phytigel
Fluorescente	0,067Aa	0,047 Ba
LED Branca	0,051Ab	0,047 Aa
LED AV	0,049Ab	0,055 Aa
Parênquima lacunoso (mm)		
Qualidade de luz	Agente geleificante	
	Ágar	Phytigel
Fluorescente	0,122 Aa	0,099 Ba
LED Branca	0,102 Aa	0,112 Aa
LED AV	0,081 Bb	0,116 Aa
Epiderme abaxial (mm)		
Qualidade de luz	Agente geleificante	
	Ágar	Phytigel
Fluorescente	0,018Aa	0,014Bb
LED Branca	0,016Bab	0,019Aa
LED AV	0,016Bb	0,018Aa

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas na horizontal e letras minúsculas na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Agentes geleificantes x concentração de sacarose

Plantas cultivadas em ágar com concentrações de 15 gL⁻¹ e 30 gL⁻¹ de sacarose apresentaram alterações estatisticamente significativas entre si (Tabela 3). A espessura das variáveis: limbo; epidermes adaxial e abaxial; e parênquima paliçádico e parênquima lacunoso apresentou aumento estatisticamente significativo em meio

de cultura com maior concentração de sacarose (Tabela 3). Plantas cultivadas em Phytigel com concentrações de 15 gL^{-1} e 30 gL^{-1} de sacarose também apresentaram alterações estatisticamente significativas entre si (Tabela 3). Entretanto, nesse tratamento, a espessura do limbo e da epiderme abaxial foi significativamente maior em plantas cultivadas em meio de cultura com menor concentração de sacarose. A espessura das demais variáveis analisadas, por sua vez, não apresentou diferenças significativas entre as concentrações analisadas (Tabela 3).

Plantas cultivadas em ambos os agentes geleificantes apresentaram diferenças anatômicas significativas de acordo com a concentração de sacarose no meio, mas a interação entre os agentes geleificantes e as concentrações de sacarose no meio de cultivo não foi significativa (Tabela 3). A espessura foliar em plantas cultivadas com 30 gL^{-1} de sacarose foi maior em ágar e em plantas cultivadas com 15 gL^{-1} de sacarose foi maior em Phytigel. A espessura da epiderme adaxial e da epiderme abaxial em plantas cultivadas com 15 gL^{-1} de sacarose foi maior em Phytigel. Em plantas cultivadas com 30 gL^{-1} de sacarose a espessura da epiderme adaxial não diferiu entre os agentes geleificantes, enquanto a espessura da epiderme abaxial foi maior em ágar. A espessura do parênquima paliçádico em plantas cultivadas com 15 gL^{-1} de sacarose foi maior em Phytigel, enquanto em plantas cultivadas com 30 gL^{-1} de sacarose a espessura desse parênquima não diferiu entre os agentes geleificantes. Considerando os agentes geleificantes, a espessura do parênquima paliçádico foi maior em plantas cultivadas em ágar com 30 gL^{-1} de sacarose e, em plantas cultivadas em Phytigel não houve diferença entre as concentrações de sacarose. A espessura do parênquima lacunoso em plantas cultivadas com 15 gL^{-1} de sacarose foi maior em Phytigel, enquanto em plantas cultivadas com 30 gL^{-1} de sacarose a espessura desse parênquima não diferiu entre os agentes geleificantes.

Tabela 3. Características anatômicas de plântulas *in vitro* de *Polygala paniculata* afetadas pela relação entre agentes geleificantes e concentração de sacarose, após 45 dias de cultivo.

Espessura foliar (μm)		
Agentes geleificante	Sacarose (g L^{-1})	
	15	30
Ágar	0,16Bb	0,20Aa
Phytigel	0,21 Aa	0,18Bb
Epiderme adaxial (μm)		
Agentes geleificante	Sacarose (g L^{-1})	
	15	30
Ágar	0,015Bb	0,019Aa
Phytigel	0,019Aa	0,017Aa
Parênquima paliçádico (μm)		
Agentes geleificante	Sacarose (g L^{-1})	
	15	30
Ágar	0,048Ba	0,054Aa
Phytigel	0,063Aa	0,046Ab
Parênquima lacunoso (μm)		
Agentes geleificante	Sacarose (g L^{-1})	
	15	30
Ágar	0,08Bb	0,11Aa
Phytigel	0,11Aa	0,10Aa
Epiderme abaxial (μm)		
Agentes geleificante	Sacarose (g L^{-1})	
	15	30
Ágar	0,015Bb	0,018Aa
Phytigel	0,018Aa	0,016Bb

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas, na horizontal, e letras minúsculas, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Características anatômicas das folhas diferem entre os tratamentos

O cultivo de *P. paniculata* sob diferentes condições luminosas não alterou a estrutura dorsiventral e anfiestomática da lâmina foliar observada *in situ* (Fig. 2). No entanto, observações de imagens de microscopia de luz (Figs. 3 e 4), evidenciaram que características anatômicas qualitativas das folhas de *P. paniculata* foram sensíveis aos tratamentos e apresentaram modificações no tamanho das células, na espessura das paredes celulares e na densidade dos cloroplastos.

Em plantas cultivadas em ágar, em 15 g L⁻¹ (Figs. 3A-3F) e em 30 g L⁻¹ (Figs. 3G-3L) de sacarose, a nervura mediana não apresentou alterações anatômicas.

Da mesma maneira, em plantas cultivadas em Phytigel, em 15 gL⁻¹ (Figs. 3A-3F) e em 30 gL⁻¹ (Figs. 3G-3L) de sacarose, a nervura mediana não apresentou alterações evidentes na estrutura anatômica.

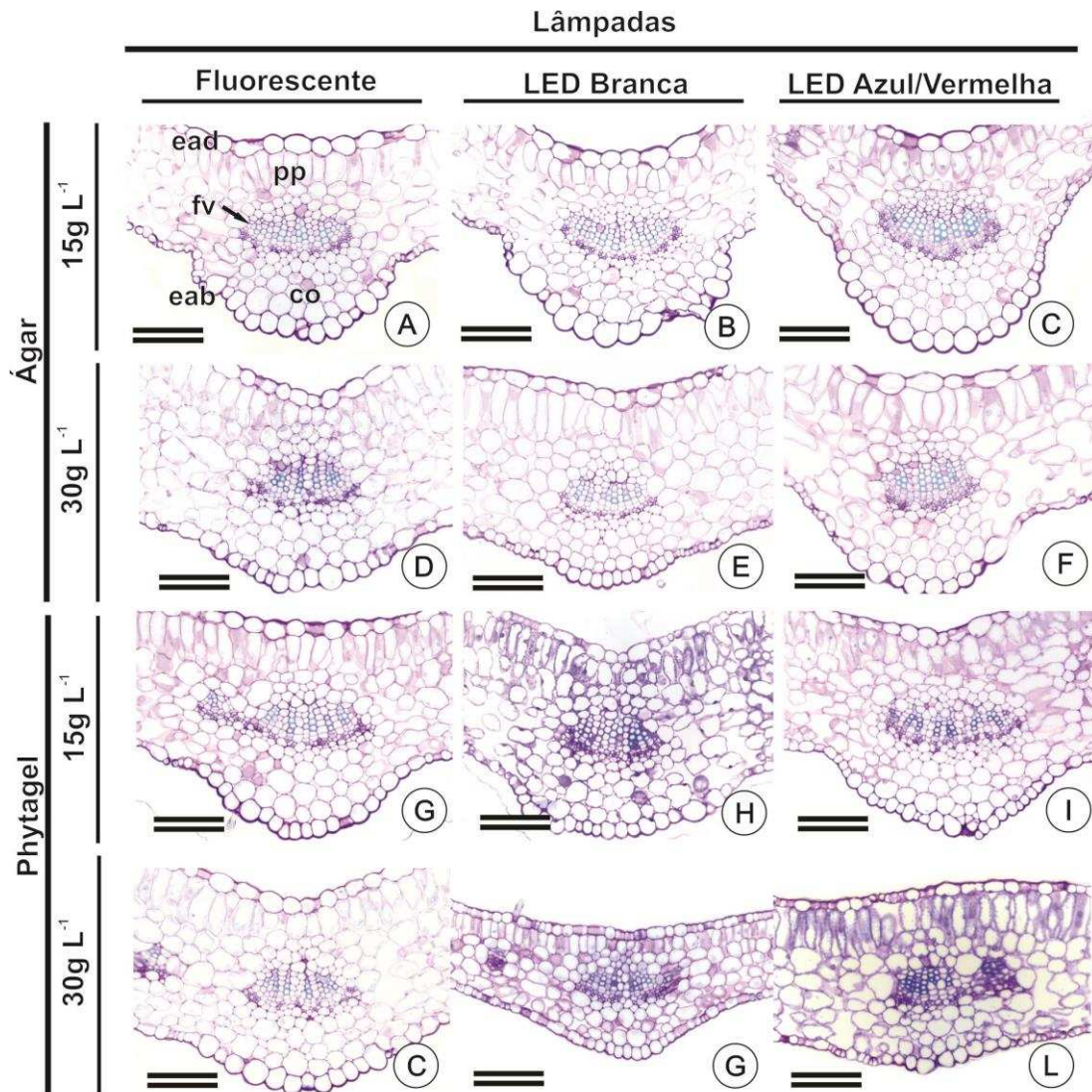


Figura 3. Efeitos da qualidade de luz e concentração de sacarose sobre a anatomia foliar de *Polygala paniculata*, após 45 dias de cultivo *in vitro*. (A-F). Secções transversais da nervura central em plantas cultivadas em ágar (A-C) 15 gL⁻¹ de sacarose. (D-E). 30 gL⁻¹ de sacarose. (G-L). Secções transversais da nervura central em plantas cultivadas em Phytigel. (G-H) 15 gL⁻¹ de sacarose. (I-L). 30 gL⁻¹ de sacarose. ead: epiderme face adaxial; eab: epiderme face abaxial; fv: feixe vascular; co: córtex; pp: parênquima paliçádico. Barras: 100µm.

A estrutura do mesofilo apresentou modificações conspícuas em ambos os tratamentos (Fig. 4). Plantas cultivadas em ALF15 apresentam limbo foliar com estrutura anatômica semelhante à observada em plantas *ex situ*, tais como células

epidérmicas volumosas, parênquima paliçádico apresenta células justapostas com paredes definidas e parênquima lacunoso com células volumosas e espaços intercelulares conspícuos (Fig. 4A). Plantas submetidas ao tratamento A30LF, por sua vez, apresentam mesofilo com menos espaços intercelulares, paredes celulares muito delgadas e pouca distinção entre os parênquimas paliçádico e lacunoso (Fig. 4D). As plantas cultivadas em A15LB apresentam mesofilo com parênquima paliçádico composto por células menos volumosas, com parede celular mais espessada e arranjo frouxo; o parênquima lacunoso apresenta células de menor volume, alongadas periclinalmente e espaços intercelulares conspícuos (Fig. 4B). As plantas submetidas a A30LB (Fig. 4E) apresentaram mesofilo mais denso e compacto; o parênquima paliçádico apresenta células mais volumosas e justapostas com paredes celulares delgadas, enquanto o parênquima lacunoso apresenta células volumosas com paredes celulares espessadas. Plantas cultivadas em A15LAV (Figs. 4C), apresentaram mesofilo com parênquima paliçádico composto por células pouco volumosas, de parede celular delgada e arranjo frouxo; o parênquima lacunoso apresenta células de menor volume, alongadas periclinalmente e espaços intercelulares conspícuos, mas o que se destaca nesse tratamento é a grande densidade dos cloroplastos. As plantas submetidas ao tratamento A30LAV apresentam mesofilo com parênquima paliçádico composto por células mais volumosas e justapostas com paredes celulares mais espessadas, enquanto o parênquima lacunoso apresenta poucas camadas de células alongadas periclinalmente com espaços intercelulares evidentes (Fig. 4F).

Plantas cultivadas em Phytigel com 15 g L^{-1} , observadas pelas imagens de microscopia de luz também evidenciam alterações das características anatômicas qualitativas e quantitativas que não foram mensuradas (Fig. 4). As plantas cultivadas em P15F apresentam o mesofilo composto por parênquima paliçádico com células com arranjo frouxo e parênquima lacunoso com células com forma e volume variados e espaços intercelulares conspícuos (Fig. 4G). Plantas submetidas ao tratamento P30F, por sua vez, apresentam mesofilo compacto constituído por parênquima paliçádico com células justapostas; parênquima lacunoso com células de forma e volume variados e redução dos espaços intercelulares (Fig. 4J). Plantas cultivadas em P15LB apresentam parênquima paliçádico e lacunoso com células volumosas, paredes celulares espessadas e espaços intercelulares (Fig. 4H). Plantas

cultivadas em P30LB apresentam tecidos da nervura mediana (Fig. 4L) e do mesofilo pouco diferenciados e compactos, com células volumosas, citoplasma denso e núcleo conspícuo. Plantas submetidas ao tratamento P15LAV apresentam parênquima paliçádico com células volumosas e justapostas e parênquima lacunoso com células volumosas e espaços intercelulares conspícuos e, provavelmente, preenchidos por mucilagem. (Fig. 4I). Plantas submetidas ao tratamento P30LAV (Fig. 4M) apresentam parênquima paliçádico com células volumosas e justapostas e parênquima lacunoso com células volumosas e espaços intercelulares menos evidentes.

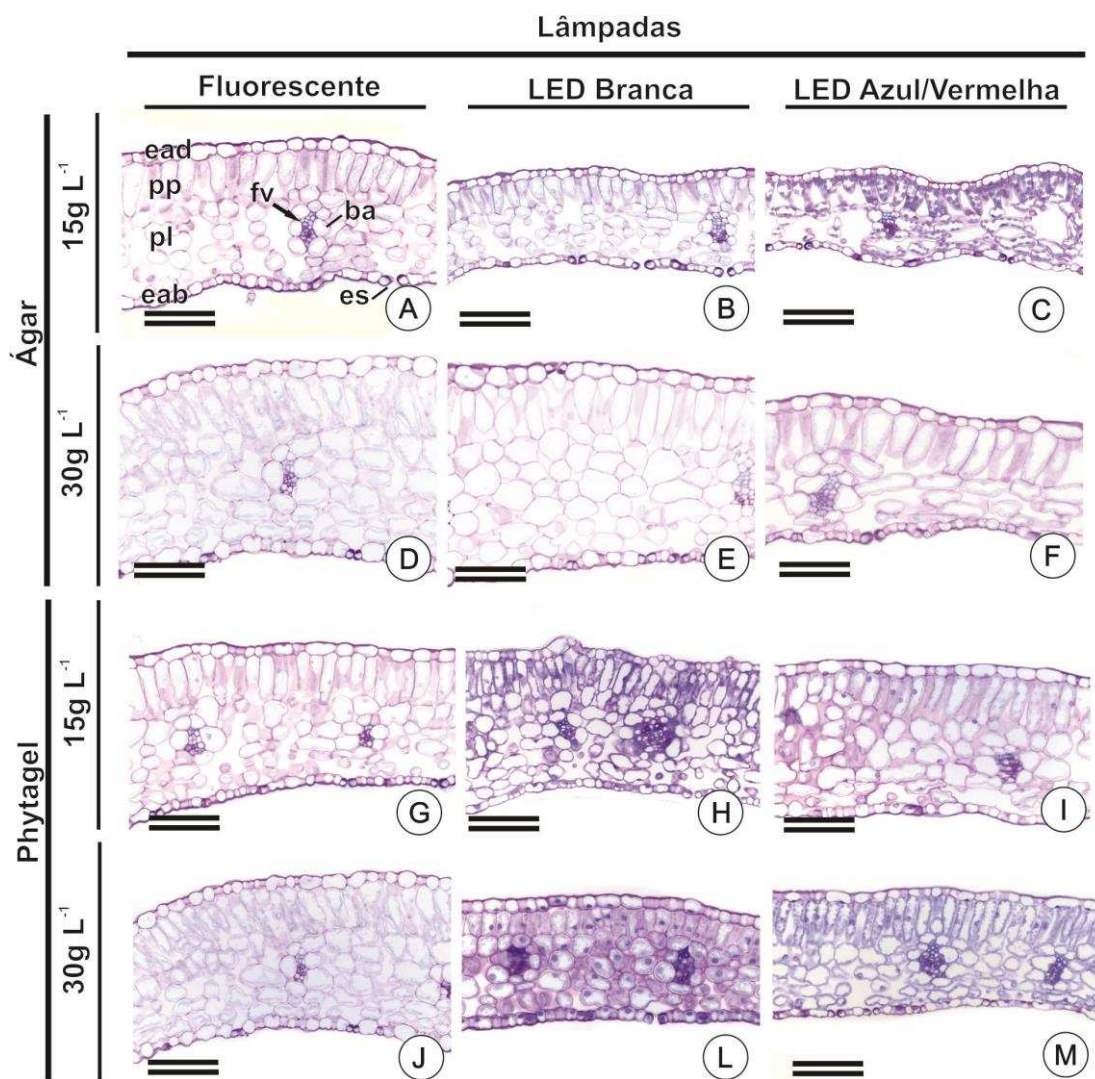


Figura 4. Efeitos da qualidade de luz e concentração de sacarose sobre a anatomia foliar de *Polygala paniculata* cultivada em Phytigel, após 45 dias de cultivo *in vitro*. Secções transversais da nervura central (A, E, I) e do limbo foliar (B, F, J) em plantas cultivadas em Phytigel com 15 gL⁻¹ de sacarose. Secções transversais da nervura central (G, F, L) e do limbo foliar (D, H, M) em plantas cultivadas em

Phytigel com 30 gL⁻¹ de sacarose. ba: bainha do feixe; ead: epiderme adaxial; eab: epiderme abaxial; co: córtex; pl: parênquima lacunoso; pp: parênquima paliçádico. Barras: 100µm.

DISCUSSÃO

Qualidade espectral

A morfogênese das folhas de *P. paniculata* foi responsiva a LF, onde observou-se o aumento da espessura da lâmina foliar, da epiderme adaxial e abaxial, parênquima palilacunoso, quando comparado aos tratamentos com LB e LAV, e similaridade com as características da lâmina foliar de plantas *ex vitro*. Esses resultados estão em consonância com os resultados observados em *Solanum lycopersicum* (Arena *et al.* 2016), quando cultivada sob as mesmas qualidades espectrais do presente estudo. Entretanto, esses resultados diferem dos estudos de Sæbo *et al.* (1995) e Li *et al.* (2013), que indicaram que os comprimentos de onda AV apresentaram resultados mais significativos sobre a anatomia foliar e sobre o desenvolvimento das plantas.

Em LF predominam comprimentos de onda com ampla variação (350 a 750 nm), com irradiâncias ativas em faixas de espectros com menor importância para a fotossíntese das plantas e com energia insuficiente para desenvolvimento das mesmas (Kim *et al.* 2004; Gupta e Jatothu, 2013). Ao passo que, em LAV são disponibilizados os comprimentos de onda específicos, azul (450-495nm) e vermelho (620-750nm), fotossinteticamente importantes para as plantas (Schuerger *et al.* 1997; Gupta e Jatothu, 2013; Alvarenga *et al.* 2015), e responsáveis pela qualidade morfofisiológica das mesmas. Diante dessas características, é comum se esperar que plantas cultivadas em LAV deveriam apresentar melhores taxas de desenvolvimento e diferenciação adequada dos tecidos e órgãos vegetais. No entanto, resultados distintos como os de *P. paniculata* sugerem que as respostas das espécies vegetais respondem de modos distintos a esse fator.

As respostas distintas entre as espécies vegetais podem correlacionar-se à demanda espécie-específica da quantidade de cada comprimento de onda (Silva *et al.*, 2016). O uso de lâmpadas LED, além de permitir a determinação específica de comprimentos dos onda fotossinteticamente importantes, azul e vermelho, em

lâmpadas monocromáticas, possibilita a mistura e combinação balanceada entre esses comprimentos de onda (Bello-Bello *et al.* 2016) e tem sido utilizada como um recurso para aumentar a qualidade morfofisiológica das plantas (Silva *et al.* 2016; Schuerger *et al.* 1997), tendo em vista o papel modulador específico de cada um deles (Gupta e Jatothu, 2013).

Tecidos como o parênquima paliçádico se apresentaram mais delgados em tratamentos com níveis de luz com baixo espectro (Barreiro *et al.*, 1992), altos níveis de luz vermelha e, ou baixo níveis de luz azul (Sæbø *et al.* 1995). Estudos com resultados semelhantes, observaram que pequenas alterações nas proporções entre os comprimentos de onda AV resultam em modificações significativas na anatomia foliar (Schuerger *et al.*, 1997; Sæbø *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2013) e sobrevivência de plantas (Li *et al.*, 2013). Essas observações sugerem que os níveis de fótons AV estejam relacionados a ocorrência células com organelas celulares íntegras e fotossinteticamente funcionais (Sæbø *et al.* 1995). Desse modo, que o ajuste dos níveis dos comprimentos de onda de onda azul e vermelho, para essa espécie possa conduzir à obtenção de plantas com maior qualidade morfofisiológica.

O papel regulador dos espectros fotossintetizantes estão relacionados a fotorreceptores proteicos em plantas (Smith, 1982; Gyula *et al.* 2003). Os fotorreceptores são ativados por comprimentos de onda específicos e, então, modulam a expressão de genes envolvidos em processos fisiológicos e diferenciação celular (Brigs e Olney, 2001; Gyula *et al.* 2003), o que pode induzir a uma maior qualidade morfofisiológica das plantas. Dentre os efeitos desses espectros destaca-se a atividade moduladora da luz vermelha sobre o aparato fotossintético das plantas e acúmulo de grãos de amido em cloroplastos (Schuerger *et al.* 1997; Sæbo *et al.* 1995), e da luz azul sobre a para síntese de clorofila e diferenciação de cloroplastos e estômatos (Sæbo *et al.* 1995, Li *et al.* 2013).

As condições de luz influenciam o metabolismo primário e secundário das plantas (Szopa e Ekiert; 2016; Batista *et al.* 2016), embora os conhecimentos sobre esses efeito ainda sejam fragmentados (Szopa e Ekiert; 2016). Folhas de *P. paniculata* apresentam cavidades secretoras de óleos essenciais (Pizzolati *et al.* 2011), que tem origem a partir do meristema fundamental, tecido primário responsável pela diferenciação dos tecidos fundamentais, como os parênquimas

paliçádico e o lacunoso. Tendo em vista os efeitos da qualidade espectral sobre o mesofilo dessa espécie e sobre o metabolismo secundário, como os voláteis, é possível que haja interação entre esses fatores e a síntese e acúmulo de óleos essenciais pelas cavidades secretoras presentes na folha. (Alvarenga *et al.* 2015; Batista *et al.* 2016).

Concentração de sacarose x agente geleificante

Plantas cultivadas em meios de cultura com agentes geleificantes possuem contato físico direto com os nutrientes e o utilizam como suporte durante o desenvolvimento (Ivanova e Van Standen, 2011). A composição distinta dos agentes geleificantes tem efeitos diretos sobre o desenvolvimento das plantas, mas essa relação é espécie-específica (Ivanova e Van Standen, 2011), e, por isso, deve ser testada e comparada para a adequação do protocolo a ser utilizado (Reis *et al.* 2005). Ágar e Phytigel apresentaram efeitos distintos sobre o desenvolvimento, crescimento e anatomia foliar de plantas de *P. paniculata*. Plantas cultivadas em ágar apresentaram-se morfológicamente mais desenvolvidas que plantas cultivadas em Phytigel, assim como observado em *Aloe polyphylla* (Ivanova e Van Staden, 2010), onde os autores observaram maior desenvolvimento e identificaram menores níveis de hiperidricidade.

As diferenças observadas entre os tratamentos podem ser atribuídas a características físico-químicas do meio, como a concentração dos agentes geleificantes de cada meio (Debergh, 1983; Jain *et al.* 2009; Ivanova *et al.* 2010). O ágar apresenta concentração de 6.5 g L⁻¹, enquanto o Phytigel apresenta concentração de 2.5 gL⁻¹. A diferença na concentração se deve ao grau de firmeza do meio de cultura que altera a difusão e a mobilidade de nutrientes e água disponíveis no meio para os explantes em desenvolvimento (Kumar *et al.* 2003; Jain *et al.* 2009). Desse modo, menores concentrações podem favorecer maiores níveis de translocação e disponibilidade de água e nutrientes às plantas, ao passo que o aumento da concentração pode induzir a diminuição na absorção dessas substâncias (Ivanova e van Staden, 2011).

A despeito das diferenças citadas entre os agentes geleificantes, plantas de *P. paniculata* cultivadas em ágar apresentam maior espessura dos tecidos foliares, quando desenvolvidas em 30 g L⁻¹ de sacarose. No entanto, nesse tratamento observou-se que as plantas apresentaram maior número de folhas, pouco expandidas e com paredes celulares pouco espessadas. Concentrações mais baixas de sacarose, por sua vez, não induziram aumentos significativos na espessura dos tecidos, mas as plantas submetidas a essa condição apresentam plantas maiores, com menor número de folhas, que no entanto, se apresentaram mais expandidas e com paredes celulares espessadas. Essas diferenças podem relacionar-se aos efeitos da sacarose sobre diferenciação ultraestrutural dos tecidos fotossintetizantes, favorecendo a diferenciação de plastídeos com membranas desenvolvidas, e, conseqüentemente, a fotossíntese e o crescimento as plantas (Serret e Trillas, 2000). Em adição, o melhor desenvolvimento de plantas cultivadas em ágar em relação às plantas cultivadas em Phytigel, pode estar relacionado à formação de raízes nesse tratamento, o que sugere que a presença das mesmas pode ter atuado como um mecanismo compensatório para aumentar a absorção de sacarose e água.

CONCLUSÕES

A variação na qualidade espectral, agentes geleificantes e concentração de sacarose induziu as diferenças morfológicas, alterações quantitativas e qualitativas na anatomia de *P. paniculata*. Os tratamentos com LF, em ágar ou Phytigel, induziram o desenvolvimento e a anatomia similares aos observados em plantas *ex situ*. As concentrações de sacarose influenciaram o desenvolvimento da espécie. Plantas em ágar apresentaram aumento da espessura foliar, das epidermes adaxial e abaxial, parênquimas paliçádico e lacunoso, quando cultivadas em 30 gL⁻¹, enquanto plantas cultivadas em Phytigel apresentaram aumento da espessura foliar e da epiderme abaxial, quando cultivadas em em 15 gL⁻¹. O melhor desenvolvimento das plantas cultivadas em ágar pode estar relacionado à formação de raízes, o que provavelmente favoreceu a absorção de água, sacarose e nutrientes. Embora LAV não tenha apresentado resultados significativos, mediante a importância dos comprimentos de onda azul e vermelho para a qualidade morfofisiológica e química das plantas, sugere-se que o efeito das proporções entre esses comprimentos de onda sobre o crescimento

e desenvolvimento seja investigado em *P. paniculata*, bem como suas respostas ultraestruturais e síntese de compostos do metabolismo secundário.

REFERÊNCIAS

- Alvarenga ICA, Pacheco FV, Silva ST, Bertolucci SKV, Pinto JEBP (2015) *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles Plant Cell Tissue Organ Cult 122: 299-308
- Alvarez C, Saéz P, Sáez K, Sánchez-Olate M, Ríos D (2012) Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuinaavellana* Mol Plant Cell Tissue Organ Cult 110: 93-101
- Arena C, Tsonev T, Doneva DV, De Micco M, Michelozzi C, Brunetti M, Centritto S, Fineschi V, Velikova F (2016) The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum*L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.) Environ Exp Bot 16: 8472
- Barreiro JJJ, Gtiimet JB, Montaidi ER (1992) Regulation of the photosynthetic capacity of primary bean leaves by the red: far-red ratio and photosynthetic photon flux density of incident light. Physiol Plantarum 85: 97-101
- Batista DS, Castro KM, Silva AR, Teixeira ML, Sales TA, Soares LI, Cardoso MG, Santos MO, Viccini LF, Otoni WC (2016) Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). *In vitro* Cell DevBiol Plant 52: 276-282
- Batista DS, Dias LLC, Rêgo MM, Saldanha CW, Otoni WC (2017) Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. Cienc Rural 47(3)
- Bello-Bello JJ, Martínez-Estrada E, Caamal-Velázquez JH, Morales-Ramos V (2016) Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). Afr J Biotechnol 15:272-277

- Bhattacharya P, Dey S, Bhattacharyya C (1994) Use of low-cost gelling agents and support matrices for industrial scale plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 37:15-23
- Briggs WR, Olney MA (2001) Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date: five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol.* 125: 85-88
- Cavallaro V, Patane C, Cosentino SL, Di Silvestro I, Copani V (2014) Optimizing *in vitro* large scale production of giant reed (*Arundo donax* L.) by liquid medium culture. *Biomass Bioenergy* 69: 21-27
- Cruz CD (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum, Agronomy* 35: 271 - 27
- Debergh PC (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium, - *Physiol Plant*, 59: 270-276
- Dobránszki J, Magyar-Tábori K, Tombácz E (2011) Comparison of the rheological and diffusion properties of some gelling agents and blends and their effects on shoot multiplication. *Plant Biotechnol Rep* 5:345-352
- Franck TJ, CrSvecoeur M, Wuest J, Creppin H, Caspar T (1997) Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with agar or gelrite. *Biotechnic & Histochem* 73: 32-43
- Gupta SD, Jatothu B (2013) Fundamentals and applications of light emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnol Rep* 7:211-220
- Gyula P, Schäfer E, Nagy F (2003) Light perception and signalling in higher plants. *Curr Opin Plan Biol* 6:446-452
- Ivanova M, Van Staden J (2011) Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 104:13-21
- Jain N, SB Babbar (2002) Gum katira-a cheap gelling agent for plant tissue culture media. *Plant Cell Tiss Org Cult* 71: 223-229.
- Jain A, Poling MD, Smith AP, Nagarajan VK, Lahner B, Meagher RB, Raghothama KG (2009) Variations in the composition of gelling agents affect

- morphophysiological and molecular responses to deficiencies of phosphate and other nutrient. *Plant Physiol* 150: 1033-1049
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137-138
- Kim SJ, Hahn EJ, Heo JW, Paek KY (2004) Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. *Sci Hortic* 101:143-151
- Kozai T (2010) Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. *Prop Ornament Plants* 10:188-204
- Kumar A, Palni LMS (2003) The effect of light source and gelling agent on micropropagation of *Rosa damascena* Mill. and *Rhynchosylys retusa* (L.) Bl. *J Hort Sci Biotechnol* 78:786-79
- Lapa FR, Gadoti VM, Missau FC, Pizzolatti MG, Marques MC, Dafré AL, Farina M, Rodrigues ALS, Santos ARS (2009) antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. *Basic Clin Pharmacol* 104: 306:315
- Lapa FR, Soares KC, Rattmanna YD, Crestiana S, Missaub FC, Pizzolatti MG, Marques MCA, Rieck L, Santos ARS (2011) Vasorelaxant and hypotensive effects of the extract and the isolated flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. *J Pharm Pharmacol* 63: 875-881
- Li H, Tang C, Xu Z (2013) The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plant growth and morphogenesis *in vitro*. *Sci Hortic* 150: 117-124
- Lorenzi H, Matos FJA (2002) Plantas Mediciniais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, São Paulo: Instituto *Plantarum*. 386p
- Mengxi L, Zhigang X, Yang Y, Yijie F (2011) Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 106: 1-10
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497

- Nogueira FLP, Fernandes SOB, Reis GM, Matheus ME, Fernandes PD, Lage CLS, Menezes FS (2005) Atividade analgésica e antiedematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. Rev Bras Farmacogn 154: 310-315
- O'Brien TP, N Feder, ME McCully (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59: 368-373
- Panizza M, Tognoni F (1988) Clonal propagation, callus formation and plant regeneration of LAVandin. Sci Hort 37: 157-163
- Persson C. 2001. Phylogenetic Relationships in Polygalaceae Based on Plastid DNA Sequences from the trnL-F Region. Taxon 50: 763-779
- Pizzolatti MG, Mendes BG, Soldi C, Missau FC, Bortoluzzi JH, Carasek E. (2011) Analysis of volatile compounds released from flowers and roots of *Polygala cyparissias* and *Polygala paniculata* by Headspace/SPME. J. Essent Oil Res 21: 255-258
- Pruski K, Kozai T, Lewis T, Astatkie T, Nowak J (2000). Sucrose and light effects on *in vitro* cultures of potato, chokecherry and saskatoon berry during low temperature storage. Plant Cell Tiss Organ Cult 63: 215-221
- Puchooa D, Purseramen PN, Rujbally BR (1999) Effects of medium support and gelling agent in the tissue culture of tobacco (*Nicotiana tabacum*). Sci Technol 3: 129-145
- Reis LB, Costa RR, Otoni, WC (2005) Influência de agentes gelificantes na organogênese *in vitro* de explantes juvenis de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa Degener). Plant Cell Cult Micropropag 1: 80-88
- Reuveni M, Evenor D (2007) On the effect of light on shoot regeneration in *Petunia*. Plant Cell Tiss Organ Cult 89: 49-54
- Sæbo A, Krekling T, Appelgren M (1995) Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult 41: 177-185
- Saldanha CW, Otoni CG, Notini M M, Kuki KN, Cruz ACF, Rubio NetoA, Dias LLC, Otoni WC (2013) A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of

- brazilian ginseng [*Pfaffiaglomerata* (Spreng.) Pedersen]. *In vitro* Cell Dev Biol-Plant 49: 433-444
- Saldanha CW, Otoni CG, Rocha DI, Cavatte PC, Detmann KSC, Tanaka FAO, Dias LL, DaMatta F M, Otoni WC (2014) CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult 118: 87-99
- Schuerger AC, Brown C, Stryjewski EC (1997) Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) growth under red light emitting diodes supplemented with blue or far-red light. Ann Bot 79:273-282
- Serret MD, MI Trillas (2000) Effects of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of gardenia *Jasmin oidesellis* leaflets cultured *in vitro*. Int J Plant Sci 161:281-289
- Shin KS, Murthy HN, Heo JW, Hahn EJ, Yoeup K (2008) The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. Acta Physiol Plant 30:339-343
- Silva MMA, Oliveira ALB, Oliveira-Filho RA, Camara T, Willadino L, Gouveia-Neto A (2016) The effect of spectral light quality on *in vitro* culture of sugarcane. Acta Scient 38: 157-161
- Smith H (1982) Light quality, photo perception, and plant strategy. Ann Rev Plant Physiol 33:481-518
- Stuefer JF, Huber H (1998) Differential effects of light quantity and spectral light quality on growth, morphology and development of two stoloniferous *Potentilla* species. Oecologia 117:1-8
- Szopa A, Ekiert H (2016) The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult 127:115-121
- Topchiy NM, Sytnik SK, Syvash OO, Zolotareva OK (2005) The effect of additional red irradiation on the photosynthetic apparatus of *Pisum sativum*. Photosynthetica 43:451-456

- Victório VC, Carriço JB, Lage CLS (2011) *Polygala paniculata*: a source of methyl salicylate produced through plant tissue culture. Rev Ceres 58:269-272
- Vieira LN, Fraga HPF, Anjos KG, Puttkammer CC, Scherer RF, Silva DA, Guerra MP (2015) Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) 'NanicãoCorupá' *in vitro* plantlets. Theor Exp Plant Physiol 27: 91-98
- Vurro E, Bruni R, Bianchi A, Toppi LS (2009) Elevated atmospheric CO₂ decreases oxidative stress and increases essential oil yield in leaves of *Thymus vulgaris* grown in a mini-FACE system. Environ Exp Bot 65: 99-106
- Zuzarte MR, Dinis AM, Cavaleiro C, Salgueiro LR, Canhoto JM (2010) Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). Ind Crop Prod 32: 580-587

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A correta classificação de sítios secretores em plantas, assim como informações sobre o seu desenvolvimento e características da secreção e mecanismo secretor devem ser subsidiados por estudos estruturais, ultraestruturais e histoquímicos das estruturas secretoras. A realização desses estudos em *Polygala paniculata* permitiram a correta classificação e identificação de sítios secretores de óleos essenciais na espécie: tricomas unicelulares em folhas e caules, cavidades de origem em folhas e células parenquimáticas no córtex das raízes secretam óleos essenciais, sendo que em tricomas e raízes predominam terpenos de baixo peso molecular, enquanto nas cavidades predominam terpenos de alto peso molecular. O desenvolvimento e processo secretor de tricomas e cavidades envolvem o mecanismo de morte celular programa. Os dados ultraestruturais permitiram compreender o papel das organelas na síntese dos produtos secretados, bem como correlacionar a ultraestrutura com as características químicas específicas da secreção em cada sítio secretor. Adicionalmente, foi possível compreender os mecanismos de síntese e eliminação de substâncias hidrofóbicas, evidenciando particularidades do processo secretor em cada estrutura.

Alterações na qualidade espectral, agentes geleificantes e concentração de sacarose durante o cultivo de *P. paniculata* influenciam o crescimento da espécie e induziram a alterações qualitativas e quantitativas na anatomia foliar. O cultivo de *P. paniculata* sob lâmpadas fluorescentes e em ágar com 30 g L⁻¹ apresentou resultados significativos em relação aos demais tratamentos. Desse modo, o cultivo in vitro de *P. paniculata* sob essas condições é recomendando. No entanto, mediante a importância dos comprimentos de onda azul e vermelho para a diferenciação adequada de organelas, células e tecidos, recomenda-se a análise dos mesmos em lâmpadas LED monocromáticas ou em misturas balanceadas, de modo a compreender o papel modulador dos mesmos sobre essa espécie. Análises adicionais, ultraestruturais, fisiológicas e químicas poderiam esclarecer ainda mais os efeitos das condições ambientais testadas sobre as características folhas de *P. paniculata*, bem como sobre as características fotossintéticas.