

LETÍCIA DE ALMEIDA GONÇALVES

***Herreria salsaparilha* Martius (HERRERIACEAE): ANATOMIA,
CITOGENÉTICA, CITOMETRIA DE FLUXO E PROPAGAÇÃO *in vitro***

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004**

LETÍCIA DE ALMEIDA GONÇALVES

***Herreria salsaparilha* Martius (HERRERIACEAE): ANATOMIA,
CITOGENÉTICA, CITOMETRIA DE FLUXO E PROPAGAÇÃO *in vitro***

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2004.

Profa. Aristéa Alves Azevedo
(Conselheira)

Prof. Carlos Roberto de Carvalho
(Conselheiro)

Prof. Marco Antonio Oliva Cano

Prof. Luiz Orlando de Oliveira

Prof. Wagner Campos Otoni
(Orientador)

Aos meus filhos, Tiago e Lucas G. Maia Geraldine.

Ao meu marido, Robson Maia Geraldine.

Aos meus pais, José Luiz Gonçalves e Maria Adriana de A. Gonçalves

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

À minha família pela confiança e pelo apoio durante todas as fases importantes da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e, em particular, ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Wagner Campos Otoni, pela amizade, confiança e orientação científica e profissional.

À Profa. Aristéa Alves Azevedo, pela amizade, carinho, confiança e ajuda sempre que necessário.

Ao Prof. Carlos Roberto de Carvalho, pela contribuição e espírito de trabalho em equipe.

Ao meu marido, Robson Maia Geraldine, pelo amor, dedicação e enorme contribuição em todas as fases deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos II: Alexandra, Ana Paula, Andréia, Edgar, Carmen, Elisa, Fabiana, Flávio, Leandro, Lili, Lourdes, Luciano, Malu, Miranda, Rejane, Ronelza, Prof. Aluízio, pela alegre convivência e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos do laboratório de Anatomia Vegetal, Rosane Cruz, Profa. Renata, Prof. Eldo e Profa. Luzimar, pela confiança, amizade, ensinamentos e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética Vegetal, Wellington, Francielli e Isane, pela amizade e contribuição técnica e profissional.

À Profa. Rosane Aguiar, pela amizade e auxílio técnico nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao Prof. Marco Oliva Cano e ao Alan pela amizade e pelo auxílio técnico na utilização do IRGA.

Aos amigos, professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado; muito obrigada.

BIOGRAFIA

LETÍCIA DE ALMEIDA GONÇALVES, filha de José Luiz Gonçalves e Maria Adriana de Almeida Gonçalves, nasceu na cidade de Belo Horizonte, no Estado de Minas Gerais, em 05 de janeiro de 1973.

No ano de 1997 concluiu o Curso de Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Em março de 1998 iniciou, na UFV, o Programa de Pós-Graduação em Botânica, em nível de mestrado, submetendo-se à defesa de tese em 11 de fevereiro de 2000.

Em março de 2000 iniciou, na UFV, o Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, em nível de doutorado, submetendo-se a defesa de tese em 20 de fevereiro de 2004.

CONTEÚDO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3

CAPÍTULO I

Herreria salsaparilha Martius (Herreriaceae): anatomia e histoquímica

RESUMO.....	4
INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS	6
Obtenção do material vegetal.....	6
Caracterização anatômica e histoquímica.....	6
Cortes à mão livre.....	7
Inclusão em parafina.....	7
Diafanização.....	7
Testes histoquímicos	7
Documentação fotográfica	8
Microscopia eletrônica de varredura	8
RESULTADOS.....	9
Caracterização anatômica e histoquímica das folhas	9

Caracterização anatômica e histoquímica do caule e da raiz.....	156
Ápices caulinar e radicular.....	212
Caracterização anatômica da flor	21
DISCUSSÃO	245
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	267

CAPÍTULO II

Citogenética e citometria de fluxo em *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae)

RESUMO.....	289
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
Material vegetal.....	31
Análise do cariótipo.....	31
Citometria de fluxo.....	32
RESULTADOS.....	34
Análise do cariótipo.....	34
Citometria de fluxo.....	36
DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

CAPÍTULO III

Propagação *in vitro* de *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae)

RESUMO.....	445
INTRODUÇÃO	456
MATERIAL E MÉTODOS	478
Obtenção das plantas	478
Coleta do material, desinfestação e estabelecimento da cultura <i>in vitro</i>	478
Multiplicação das brotações axilares.....	489
Experimento em tubos de ensaio.....	489
Experimento em frascos.....	50
Aclimação e morfologia dos regenerantes.....	49
Citometria de fluxo.....	51

RESULTADOS.....	53
Coleta do material, desinfestação e estabelecimento da cultura	53
Multiplicação e enraizamento das brotações axilares	53
Experimentos em tubos de ensaio	53
Experimento em frascos.....	57
Aclimação e morfologia dos regenerantes	57
Citometria de fluxo.....	60
DISCUSSÃO	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

CAPÍTULO IV

Influência do tipo de vedação no ambiente interno de frascos na cultura *in vitro* de *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae)

RESUMO.....	69
INTRODUÇÃO	70
MATERIAL E MÉTODOS	72
Material vegetal.....	72
Tipos de vedação, composição gasosa e desenvolvimento das brotações.....	72
Taxas respiratória e fotossintética	73
RESULTADOS.....	75
Tipos de vedação, composição gasosa e desenvolvimento das brotações.....	75
Taxas respiratória e fotossintética	79
DISCUSSÃO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
CONCLUSÕES GERAIS	89

RESUMO

GONÇALVES, Letícia de Almeida, D. S., Universidade Federal de Viçosa; fevereiro de 2004. ***Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae): anatomia, citogenética, citometria de fluxo e propagação *in vitro***. Orientador: Wagner Campos Otoni. Conselheiros: Aristéa Alves Azevedo, Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Carlos Roberto de Carvalho.

Herreria salsaparilha Martius (Herreriaceae), é uma planta utilizada tradicionalmente pela população como depurativa e anti-sifilítica. Tendo em vista sua importância na medicina popular e a escassez de informações sobre a espécie, os objetivos do presente trabalho foram: caracterizar anatomicamente *H. salsaparilha*, determinar seu cariótipo e conteúdo de DNA nuclear, estabelecer protocolo para sua propagação *in vitro*, via proliferação de gemas axilares, e avaliar a influência do tipo de vedação na composição gasosa do ambiente interno de frascos utilizados na cultura *in vitro* de suas brotações axilares. Para os estudos anatômicos foram analisadas amostras das folhas, do caule, da raiz e de flores. O estudo citogenético foi realizado com ápices radiculares pela técnica de dissociação celular e secagem ao ar e o conteúdo de DNA nuclear foi determinado por citometria de fluxo a partir de tecidos foliares. Na propagação *in vitro*, as condições de cultivo testadas, em tubos de ensaio e em frascos, foram: meio semi-sólido com ágar ou Phytigel[®], meio líquido estacionário e sob agitação. Em tubos de ensaio foram utilizadas as concentrações de 0, 0,5 1,0, 1,5, 2,0 mg l⁻¹ de BAP e em frascos apenas a concentração de 1,0 mg l⁻¹ de BAP. No experimento de vedação utilizou-se: tampa rígida de polipropileno (T), tampa rígida de

polipropileno com filtro (TF), filme de PVC com uma (PVC1) ou duas camadas (PVC2). A organização anatômica das folhas, do caule, da raiz, dos ápices radicular e caulinar e da flor de *H. salsaparilha* é semelhante em vários aspectos à maioria das monocotiledôneas. Entretanto, estilóides (não documentados antes para a família Herreriaceae) foram observados nas folhas em idioblastos cristalíferos inseridos no mesofilo. *H. salsaparilha* possui $2n=58$ cromossomos, 12 pares acrocêntricos (1,75 a 10,51 μ m), 16 pares submetacêntricos (1,30 a 3,45 μ m) e 1 par metacêntrico (2,80 μ m). O conteúdo de DNA nuclear determinado pela citometria de fluxo corresponde a $2C=5,5$ picogramas. O conteúdo de DNA nuclear, determinado por citometria de fluxo, corresponde a $2C=5,5$ picogramas. A multiplicação de *H. salsaparilha* em tubos de ensaio contendo meio básico MS semi-sólido com ágar e 1,0 mg l⁻¹ de BAP proporcionou a obtenção de elevado número de brotações. Em frascos contendo meio básico MS líquido, o número de brotações axilares foi maior se comparado ao obtido em meio semi-sólido. O ambiente interno dos frascos foi influenciado pelo tipo de vedação: a evaporação e a evapotranspiração foram superiores nos frascos vedados com TF e nos frascos com brotações vedados com PVC a concentração de O₂ aumentou significativamente ocasionando estufamento do filme de PVC.

ABSTRACT

GONÇALVES, Leticia de Almeida, D.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2004. ***Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae): anatomy, cytogenetics, flow cytometry, and *in vitro* propagation.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Committee Members: Aristéa Alves Azevedo, Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Carlos Roberto de Carvalho.

Herreria salsaparilha Martius (Herreriaceae) is a species traditionally known for its depurative and anti-syphilitic properties. Due to its importance in popular medicine and the lack of information about the species, this present study was carried out in order to: characterize the species based on anatomical evaluations; determine the nuclear DNA content (in picograms) and set up the caryogram; establish an *in vitro* propagation protocol based on axillary shoot proliferation from green-house grown adult material; and to evaluate the influence of vessel culture closure type on the internal atmosphere composition throughout proliferation phase. For anatomical studies, samples obtained from leaf, stem, root and flowers were processed. For cytogenetics, root-tip samples were used and processed according to the air-dry cellular dissociation technique. Leaf DNA content (pg) was determined by flow cytometry using a PARTEC flow cytometer. *In vitro* propagation experiments were set up using either test tubes or baby-food jars, and MS-based medium in both semi-solid (gelled by Phytigel or agar); and liquid (stationary or agitated). Also, several BAP concentrations (0; 0.5.; 1.0; 1.5, and 2.0 mg l⁻¹) were tested. The following vessel closures were evaluated: polypropylene closure (T), polypropylene closure with one Millipore filter membrane (0.22 µm) (TF), and one

(PVC1) or two (PVC2) PVC plastic film (Goodyear, Brasil). It was found that the anatomical organization of *H. salsaparilha* is similar in many aspects with other monocotyledons species. However, stiloids were detected in leaf mesophyll within crystalliferous idioblasts, and it has not been previously reported for Herreriaceae. The species has $2n = 58$ chromosomes, among them 12 acrocentric pairs (1.75 to 10.51 μm), 16 submetacentric pairs (1.30 to 3.45 μm), and 1 metacentric pair (2.80 μm). Total DNA content, as revealed by flow cytometry, corresponded to 5.5 picograms (2C value). Regarding to *in vitro* propagation carried out in test tubes, MS-based semi solid medium, supplemented with 1.0 mg l^{-1} BAP, yielded higher number of axillary shoots among the tested BAP concentrations. However, cultures in baby-food jars presented higher number of axillary shoots in MS-based liquid medium supplemented with 1.0 mg l^{-1} BAP, as compared to semi-solid counterpart. The internal environment of the culture vessels was influenced by the closure type. The evaporation and evapotranspiration rates were higher in culture vessels sealed with TF closures, whereas in those flasks sealed with PVC film occurred a marked increase in O_2 concentration, making the PVC film to inflate.

INTRODUÇÃO

Herreria salsaparilha Martius (Herreriaceae), é uma trepadeira de caule cilíndrico ou anguloso, torcidos, glabros, ásperos verrucosos, com acúleos recurvados com ápice preto e base esverdeada. Folhas geralmente em dois fascículos por nó, lâmina membranácea, elíptica, estreitamente-elíptica, oblanceolada ou lanceolada, base atenuada, margem inteira, plana, ápice agudo acuminado ou apiculado, nervuras conspícuas em ambas as faces, nervura central mais espessa e conspícua na face abaxial, e semelhante às demais na face adaxial. Inflorescência com um racemo, constituído de tríades e díades. Botões florais esverdeados, oblongos e flores amarelas (Lopes, 2003).

H. salsaparilha é uma planta conhecida popularmente como salsaparrilha, mandioquinha, japecanga, salsa do mato, salsa gerdas, salsa caroba e cipó salsa (Lopes, 2003), e desde o período colonial vem sendo utilizada na medicina popular como depurativa e anti-sifilítica (Peckolt, 1936; Rodrigues e Carvalho, 2001). Entretanto, pelas referências dos primeiros historiadores brasileiros, parece que suas virtudes já eram conhecidas pelas populações indígenas desde a época anterior ao descobrimento do Brasil (Peckolt, 1936).

Trabalhos de isolamento e identificação de compostos secundários cujas propriedades justifiquem a utilização das plantas de *H. salsaparilha* na medicina popular não têm sido realizados. Entretanto, é possível que essa espécie produza saponinas esteroidais semelhantes às encontradas em algumas espécies de *Smilax* (Smilacaceae), plantas taxonomicamente próximas das Herreriaceae (Dahlgren e Clifford, 1982) e que, por possuírem os mesmos usos na medicina popular, são

conhecidas também como “salsaparrilha” (Peckolt e Peckolt, 1888; Peckolt, 1936; Cunha, 1941). Saponinas esteroidais já foram identificados, por exemplo, nas raízes *Herreria montevidensis*, encontrada no estado do Paraná (Cecy e Yassumoto, 1972)

No Brasil, *Herreria salsaparilha* é encontrada nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e no Distrito Federal (Lopes, 2003), sendo sua forma de propagação mais comum em cultivo domiciliar a estaquia.

Tendo em vista a importância das plantas de *H. salsaparilha* na medicina popular, a escassez de informações sobre a espécie e a possibilidade de facilitar seu cultivo, difusão e comercialização os objetivos do presente trabalho foram: caracterizar anatomicamente os órgãos vegetativos de *H. salsaparilha*; caracterizar o cariótipo da espécie e quantificar o DNA seu nuclear através de citometria de fluxo; estabelecer protocolos de propagação e regeneração *in vitro*, via proliferação axilar de gemas, buscando avaliar a influência de várias condições de cultivo no desenvolvimento de brotações em fase de alongamento e enraizamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cecy C, Yassumoto Y. 1972. Saponinas esteroidais nas raízes de *Herreria montevidensis* Klotzsch - Liliaceae. **Tribuna Farmacêutica**, XL(1-2): 52-55.
- Cunha NS. 1941. Japacanga ou salsaparrilha? **Tribuna Farmacêutica**, IX(8): 173-180.
- Dahlgren RMT, Clifford HT. 1982. **The monocotyledons: a comparative study**. London: Academic Press Inc., 378p.
- Lopes RC. 2003. **Herreriaceae Endlicher: revisão taxonômica dos gêneros neotropicais *Herreria Ruiz & Pavon* e *Clara Kunth***. Rio De Janeiro: UFRJ/MN. 213p. Tese (Doutorado em Botânica).
- Peckolt O. 1936. Sobre a planta productora da Japacanga. **Revista da Flora Medicinal**, 2(9): 513-518.
- Peckolt T, Peckolt G. 1888. **História das plantas medicinais e úteis do Brazil**. Rio de Janeiro: Typographia Laemmert & C. 368p.
- Rodrigues VEG, Carvalho DA. 2001. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 180 p.

CAPÍTULO I

Herreria salsaparilha Martius (Herreriaceae): anatomia e histoquímica

RESUMO

Herreria salsaparilha Martius, conhecida popularmente como salsaparrilha, é uma planta muito utilizada na medicina popular como depurativa e anti-sifilítica. Historicamente, o gênero *Herreria* já foi considerado pertencente a várias famílias. Entretanto, estudos recentes de revisão concluíram que esse gênero deve ser classificado como Herreriaceae (Ordem Asparagales). O objetivo do presente trabalho foi caracterizar anatomicamente *Herreria salsaparilha*. Foram analisadas amostras das folhas, do caule, da raiz e de flores de plantas cultivadas no telado do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais - Brasil, e de plantas cultivadas no Grupo Entre Folhas - Plantas Medicinais Viçosa, localizado também na UFV. Amostras da região mediana de folhas foram utilizadas no preparo de cortes à mão livre, inclusão em parafina, diafanização, microscopia eletrônica de varredura e, alguns órgãos foram utilizados também em análises histoquímicas. Segmentos do 4º e 5º nós, do ápice para a base, e de regiões diferenciadas das raízes foram coletados e utilizados em cortes a fresco, inclusão em parafina e estudos histoquímicos. Amostras do ápice caulinar e radicular, assim como botões florais e flores abertas, foram utilizadas na inclusão em parafina. A organização anatômica das folhas, do caule, da raiz e da flor, assim como a organização dos meristemas caulinar e radicular de *H. salsaparilha* é típica das monocotiledôneas. Nas folhas, entretanto, foi observada a ocorrência de estilóides, não antes documentados para a família.

Palavras chave: *Herreria salsaparilha*, Herreriaceae, monocotiledônea, anatomia, histoquímica.

INTRODUÇÃO

Herreria salsaparilha Martius, conhecida popularmente como salsaparrilha, mandioquinha, japecanga, salsa do mato, salsa gerdas, salsa caroba e cipó salsa (Lopes, 2003) é uma planta cujas raízes são muito utilizadas na medicina popular com finalidades depurativa e anti-sifilítica (Peckolt, 1936; Rodrigues e Carvalho, 2001). No Brasil, é encontrada nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e no Distrito Federal (Lopes, 2003).

H. salsaparilha é uma trepadeira que possui caule cilíndrico ou anguloso, glabro, áspero, verrucoso e com acúleos de coloração preta no ápice e verde na base. As folhas estão distribuídas geralmente em dois fascículos por nó, com lâmina membranácea e nervuras paralelas conspícuas em ambas as faces, com nervura mediana mais espessa e conspícua na face abaxial (Lopes, 2003).

Historicamente, o gênero *Herreria* já foi considerado pertencente diversas famílias, entre elas as famílias Smilacaceae e Liliaceae (Lopes e Andreato, 2003). Estudos recentes de revisão concluíram que esse gênero deve ser classificado como *Herreriaceae* (Ordem Asparagales) (Lopes, 2003; Lopes e Andreato, 2003), o que está de acordo com a classificação proposta por Dahlgren e Clifford (1982).

As características anatômicas de cada espécie podem, muitas vezes, contribuir para a solução de problemas taxonômicos relacionados à família, ao gênero e, ou, à espécie. Além disso, a propagação *in vitro* de *H. salsaparilha* tem sido realizada com sucesso (Capítulo III) e a caracterização anatômica dos seus órgãos pode auxiliar no entendimento dos processos anatômicos e fisiológicos relacionados ao desenvolvimento da planta no ambiente *in vitro* e *ex vitro*.

Tendo em vista que os estudos anatômicos e histoquímicos de espécies do gênero *Herreria* são escassos (Delucchi et al., 1998, Conran, 1999, Lopes, 2003), o objetivo do presente trabalho foi caracterizar anatômica e histoquimicamente os órgãos vegetativos e reprodutivos de *Herreria salsaparilha* Martius.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

Foram utilizadas plantas cultivadas no Telado do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais – Brasil, e plantas cultivadas nos canteiros do Grupo Entre Folhas - Plantas Medicinais Viçosa, localizado também na UFV, altitude 649 metros (lat. 20°45'20"S long. 42°52'40" W). O clima na região de Viçosa é o do tipo tropical de altitude (Cwb segundo classificação de Köppen), com verões quentes e temperatura no mês mais quente inferior a 22°C (Köppen, 1948).

As características de fertilidade do solo foram determinadas no Departamento de Solos da UFV. Entretanto, devido ao desconhecimento das exigências nutricionais da espécie, as plantas cultivadas em telado, obtidas de estacas de planta matriz procedente de Teixeiras/MG e enraizadas em areia lavada, foram mantidas em vasos (capacidade de 6 L) contendo a mistura de solo, esterco e areia na proporção de 3:1:1, e irrigadas periodicamente.

Os materiais testemunha foram preparados segundo as normas usuais de herborização e depositados no Herbário VIC do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, sob numeração específica (25.825). A identificação da espécie foi confirmada pela especialista da família, Profa. Rosana Conrado Lopes (Universidade Federal do Rio de Janeiro/Ilha do Fundão).

Caracterização anatômica e histoquímica

A caracterização anatômica e histoquímica foi realizada no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV. Amostras da região mediana de folhas foram utilizadas no preparo de cortes à mão livre, inclusão em parafina, diafanização, microscopia eletrônica de varredura e nas análises histoquímicas. Segmentos completamente expandidos do caule entre o 4° e 5° nó, do ápice para a base, e de regiões diferenciadas das raízes foram utilizadas em cortes à fresco, inclusão em parafina e estudos histoquímicos. Amostras do ápice caulinar e radicular, assim como botões florais e flores abertas foram utilizadas na inclusão em parafina.

Foram utilizadas três repetições para cada órgão estudado.

Cortes à mão livre

Os cortes à mão livre foram obtidos a partir de material a fresco, utilizando micrótomo de mesa (LPC – Rolemberg & Bhering), corados com Safrablau (por 2 minutos) ou Safranina O aquosa (por 2 minutos) e Azul de Astra 1% (por 30 segundos) e montados, entre lâmina e lamínula, em glicerina hidratada (50% v/v).

Os materiais processados a fresco foram observados em microscópio OLYMPUS AX - 70 sob luz visível e luz visível polarizada.

Inclusão em parafina

As amostras foram pós-fixadas em FAA₅₀ por 24h, desidratadas em série etílica e em série etílica-butílica progressiva até inclusão em parafina (Johansen, 1940).

Foram realizados cortes transversais e longitudinais das folhas, do caule, dos ápices caulinar e radicular e das flores em dois estádios de diferenciação (botões fechados e flores em início de antese). Os cortes foram obtidos em micrótomo rotativo, com 12 µm de espessura, corados com Safranina O aquosa (por 10 min.) e Azul de Astra 1% (por 1 minuto), montados entre lâmina e lamínula, em bálsamo de Canadá. Algumas lâminas contendo cortes do ápice caulinar e do ápice radicular foram corados com Hematoxilina de Harris (por 2 horas).

Diafanização

As amostras destinadas a diafanização foram colocadas em etanol 50%, armazenadas em etanol 70%; posteriormente foram processadas seguindo procedimento adaptado de Johansen (1940), utilizando-se solução de NaOH 10%, por 3h, solução de hipoclorito de sódio, a 3%, até clarear e cloral hidratada (CCl₃CHO.H₂O) 10% até o material ficar totalmente translúcido. O material foi corado com Safranina O aquosa (por aproximadamente 24h) e, após desidratação, montado entre lâmina e lamínula, em bálsamo do Canadá.

Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos foram realizados em cortes a fresco, obtidos à mão livre, de folhas, caules e raízes. Utilizou-se Lugol para a detecção de amido, Sudan IV para

compostos lipofílicos, Vermelho de Rutênio para substâncias pécticas, Floroglucina ácida para lignina (Jensen, 1962; Johansen, 1940) e reagente de Dragendorff para alcalóides (Svendsen e Verpoorte, 1983). As lâminas foram montadas, entre lâmina e lamínula, em glicerina hidratada.

Documentação fotográfica

A documentação fotográfica foi realizada em microscópio OLYMPUS modelo AX - 70 com sistema U-PHOTO.

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras destinadas à microscopia eletrônica de varredura foram fixadas em FAA₅₀ por 24 h, desidratadas em série etílica progressiva, secas em equipamento de ponto crítico (Balzers CDU 020), fixadas no suporte com cola de prata e recobertas com ouro metálico (10 nm) por um pulverizador (Balzers CSA 010). A documentação fotográfica foi realizada em microscópio de varredura JSMT JEOL-T2000.

RESULTADOS

Caracterização anatômica e histoquímica das folhas

A epiderme das folhas de *H. salsaparilha* é unisseriada e tanto as células da face adaxial, quanto as da face abaxial possuem aspecto quadrangular em corte transversal (Figura 1A) e alongado em vista frontal (Figura 1B-C). Somente na face abaxial, entretanto, ocorrem estômatos e, além disso, as demais células epidérmicas são menores que as que ocorrem na face adaxial (Figura 1A-C). As células subsidiárias, em número de duas e organizadas paralelamente à abertura do ostíolo (Figura 1A e C), possuem projeções que protegem as células guardas, localizadas ligeiramente abaixo das demais células epidérmicas. Segundo a classificação sugerida por Metcalfe e Chalk (1950), os estômatos de *H. salsaparilha* podem ser classificados como paracíticos. A cutícula da face abaxial possui abundância de ceras epicuticulares, que recobrem inclusive os estômatos (Figura 1D).

O mesofilo é homogêneo, tendendo a dorsiventral (Figura 2A). Nas camadas celulares (3-4) voltadas para a face adaxial da epiderme as células são mais alongadas perpendicularmente à superfície e mais justapostas que as células voltadas para a face abaxial, que estão organizadas de maneira mais frouxa, com abundância de espaços intercelulares (Figura 2A).

Os feixes vasculares são do tipo colateral e apresentam 3-4 camadas de fibras nos pólos (Figura 2A). Possuem também bainhas interrompidas, formadas por células parenquimáticas grandes (Figura 2A). As nervuras são paralelas entre si e associados à nervura mediana estão o parênquima clorofiliano, voltado para a face adaxial da epiderme, o parênquima incolor e 2-3 camadas de colênquima voltadas para a face abaxial (Figura 2A). Idioblastos cristalíferos contendo ráfides, monocristais ou estilóides foram observados no mesofilo (Figura 2B-C).

Os testes histoquímicos revelaram, após reação com Sudan IV, que a cutícula é espessa em ambas as faces da folha (Figura 3A). Substâncias pécticas foram evidenciadas nas paredes das células da nervura mediana após reação com vermelho de rutênio, confirmando a presença de colênquima nessa região (Figura 3B). As paredes das células do mesofilo, das células do floema e das células epidérmicas também reagiram com esse último reagente. Os feixes vasculares mostraram, após reação com floroglucina ácida, coloração vermelho-rosa nos pólos e na região do xilema,

evidenciando a presença de lignina nas paredes celulares das fibras e dos elementos de vaso, respectivamente (Figura 3C). O lugol evidenciou a presença de amido apenas nas células do parênquima clorofiliano (Figura 3D). O teste para alcalóide foi negativo nos tecidos da folha. Os resultados são mostrados na Tabela 1.

Figura 1. Caracterização anatômica da folha de *Herreria salsaparilha* Martius. (A) Corte transversal da região mediana da lâmina foliar em microscopia de luz. Vista frontal das faces (B) adaxial e (C) abaxial da epiderme em microscopia eletrônica de varredura. (D) Detalhe da face abaxial da epiderme em microscopia eletrônica de varredura. (A-B) Barras=100 µm. (C) Barra=50 µm. (D) Barra= 10 µm. ED=face adaxial da epiderme. EB=face abaxial da epiderme. Et=estômato.

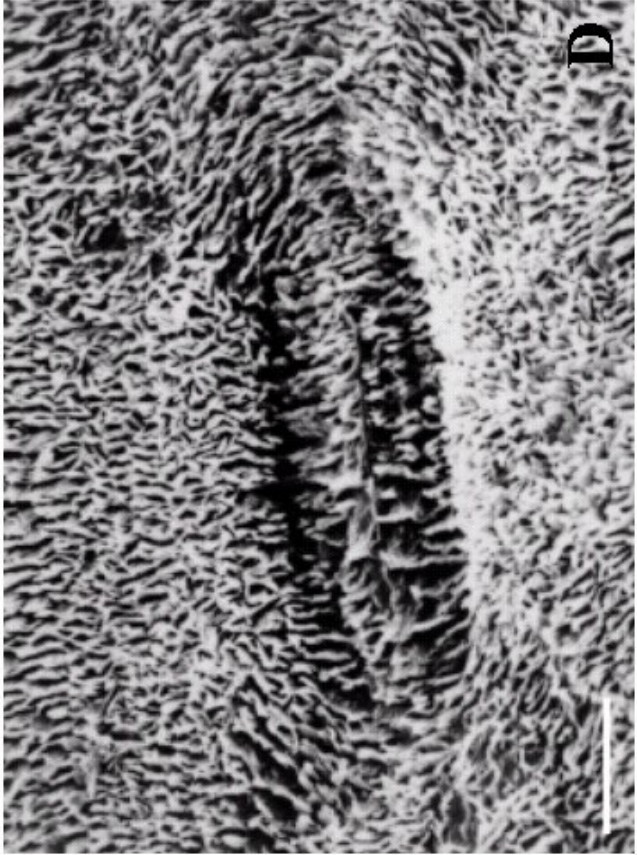
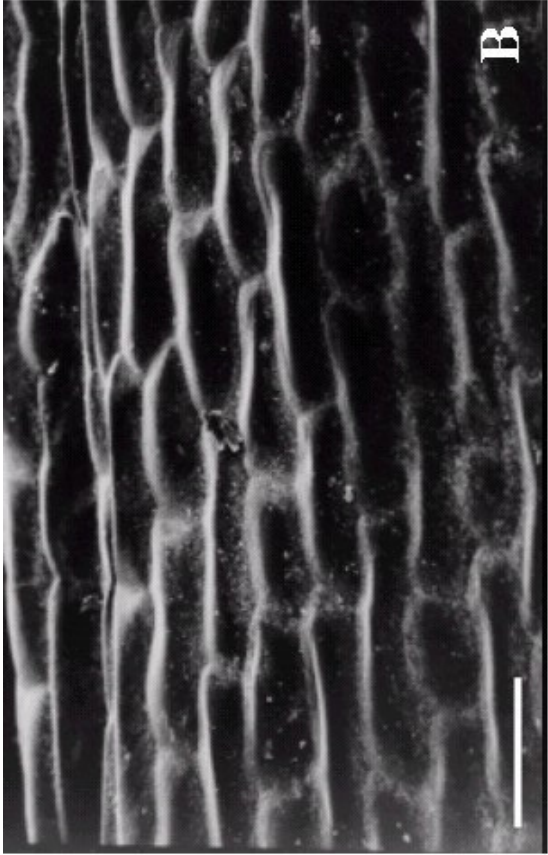
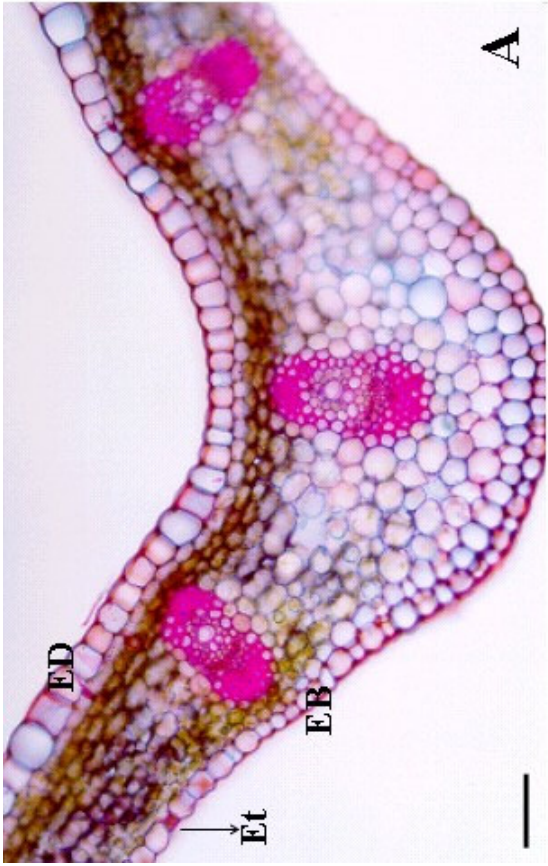


Figura 1

Figura 2. Caracterização anatômica da folha de *Herreria salsaparilha* Martius em microscopia de luz. (A) Lâmina foliar em corte transversal. Barra=100 µm. (B) idioblastos cristalíferos contendo ráfides e (C) estilóides em corte transversal. Barras=50 µm. ED=face adaxial da epiderme. EB=face abaxial da epiderme. Fb=fibras nos pólos do feixe. Xl=xilema. Fl=floema. Id=idioblasto cristalífero. Rf=ráfide. El=estilóides. Mn=monocristais.

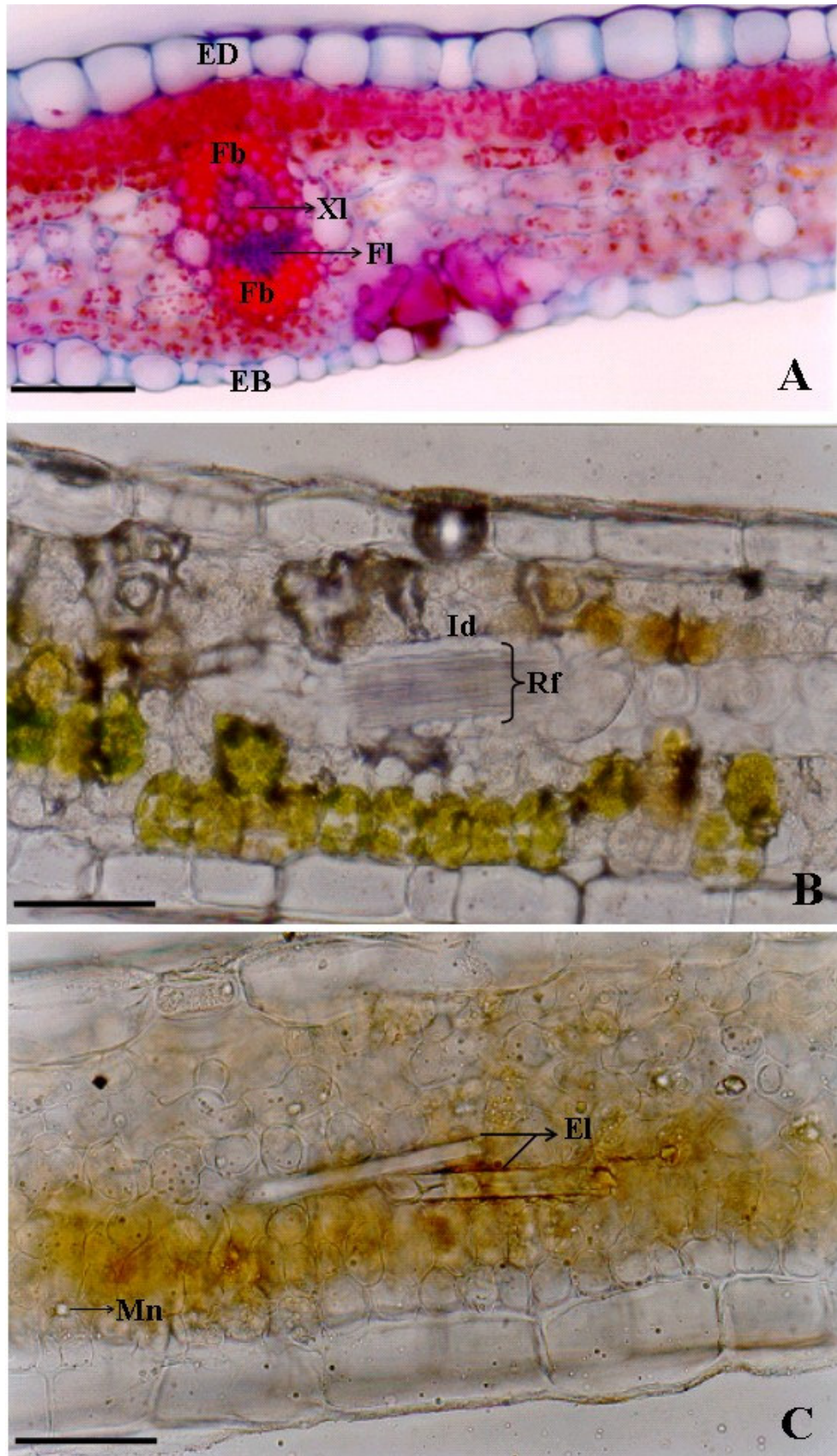


Figura 2

Figura 3. Histoquímica da folha de *Herreria salsaparilha* Martius. Cortes transversais da folha em presença de (A) Sudan VI; (B) Vermelho de Rutênio; (C) Floroglucina ácida e (D) lugol. Barras=100 μ m. ED=face adaxial da epiderme. EB=face abaxial da epiderme. Fb=fibras. Xl=xilema. Fl=floema. CBF=células da bainha do feixe.

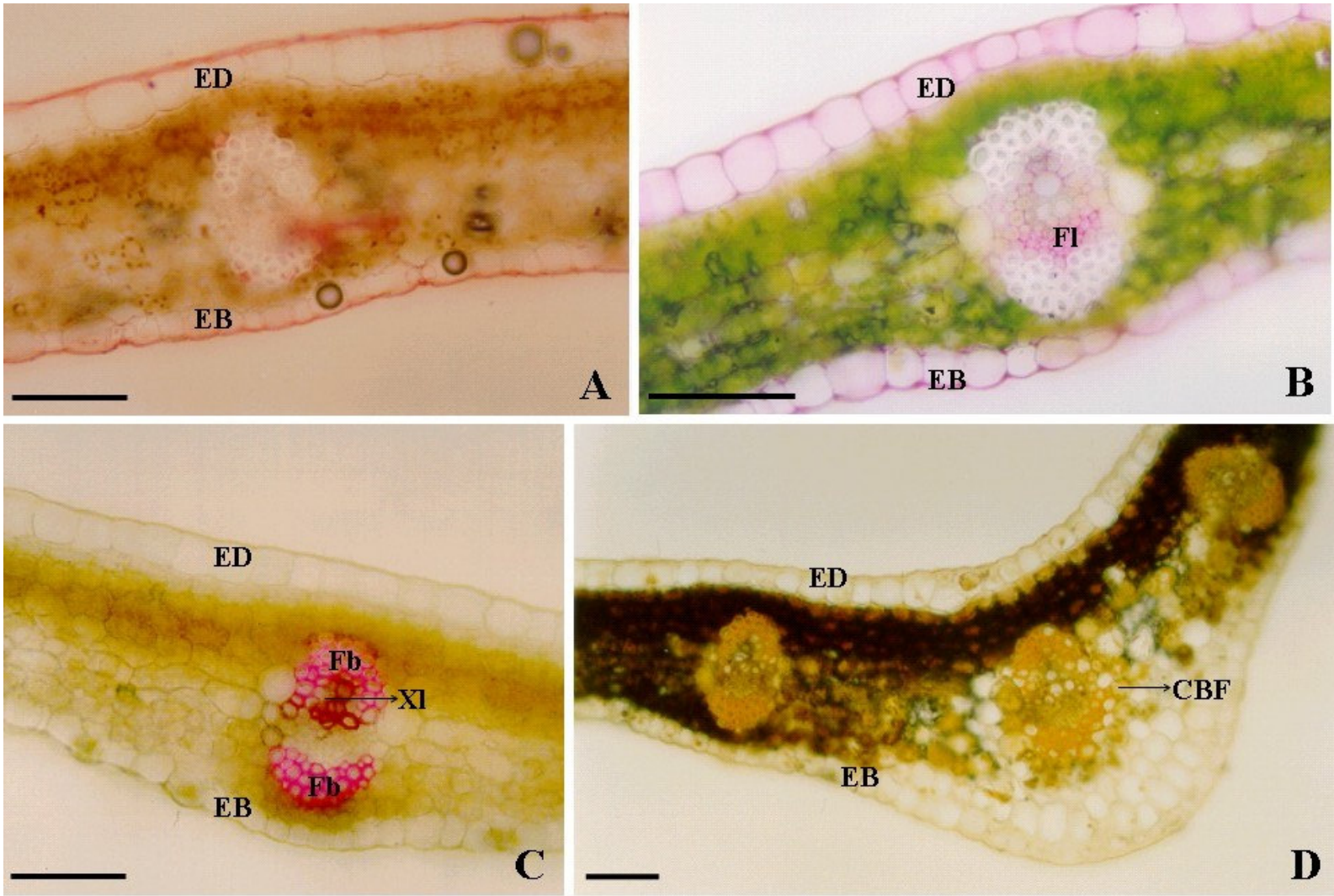


Figura 3

Tabela 1. Testes histoquímicos realizados na folha, no caule e na raiz de *Herreria salsaparilha* Martius.

Órgão	Tecido	Sudan IV (Compostos graxos totais)	Vermelho de Rutênio (Subst. Pécicas)	Floroglucina ácida (Lignina)	Lugol (Amido)	Dragendorff (Alcalóides)
Folha	Epiderme (face adaxial)	+	-	-	-	
	Epiderme (face abaxial)	+	-	-	-	
	Parênquima clorofiliano/ face adaxial	-	+	-	+	
	Parênquima clorofiliano/ face abaxial	-	+	-	+	
	Células da bainha do feixe vascular	-	+	-	-	
	Xilema (elemento de Vaso + fibras)	-	-	+	-	
	Floema	-	+	-	-	-
	Nervura mediana (células subepidérmicas voltadas para a epiderme abaxial)	-	+	-	-	
Caule	Epiderme	+	-	-	-	
	Células subepidérmicas	-	+	-	-	
	Parênquima clorofiliano	-	+	-	+	
	Colênquima	-	+	-	-	-
	Anel esclerênquimático subjacente ao colênquima	-	-	+	-	
	Xilema (elemento de vaso + fibras)	-	-	+	-	
	Floema	-	-	-	-	
	Parênquima de preenchimento	-	+	+	-	
Raiz	Epiderme	-	-	-	-	
	Exoderme	+	-	+	-	
	Córtex/ próximo ao cilindro vascular	-	+	-	-	
	Endoderme	+	-	+	-	
	Cilindro vascular - xilema (elemento de vaso + fibras)	-	-	+	-	-
	Cilindro vascular - floema	-	+	-	-	
	Cilindro vascular/ medula	-	+	-	-	

Caracterização anatômica e histoquímica do caule e da raiz

O caule de *H. salsaparilha* possui estelo do tipo atactostelo e feixes vasculares do tipo colateral, observados em vários estádios de diferenciação (Figura 4A); os feixes menos desenvolvidos são observados próximos ao anel de células de parede espessada, na região cortical, e os mais desenvolvidos no interior do órgão (Figura 4A). A epiderme é unisseriada, possui cutícula espessa e células de aspecto quadrangular em corte transversal (Figura 4A). Os estômatos estão presentes com o mesmo arranjo observado nas folhas. Abaixo da epiderme existe uma camada de hipoderme formada por células incolores e, subseqüentemente, 3-4 camadas de parênquima clorofiliano com células arredondadas e compactadas (Figura 4A). Abaixo do parênquima clorofiliano encontra-se 2-3 camadas de colênquima e 4-5 camadas de células com parede espessada (Figura 4A). Em corte longitudinal, essas últimas camadas são formadas por fibras e células parenquimáticas de parede espessada (Figura 4B). Os elementos de vaso que ocorrem no caule são dos tipos anelado, espiralado, pontoado e escalariforme (Figura C-D). Idioblastos com ráfides também ocorrem no parênquima clorofiliano do caule.

Nas células epidérmicas, a parede periclinal externa e as paredes anticlinais (formando flanges cuticulares) reagiram fortemente com Sudan IV resultando em coloração vermelha-alaranjada (Figura 5A). Substâncias pécticas foram evidenciadas mediante reação com Vermelho de Rutênio entre o parênquima clorofiliano e o anel de células lignificadas, confirmando a presença de colênquima nessa região (Figura 5B). As paredes das células da hipoderme e do floema também reagiram com o Vermelho de Rutênio. As paredes celulares dos elementos condutores do xilema apresentaram, após reação com Floroglucina ácida, coloração vermelho-rosa confirmando a presença de lignina nos elementos de vaso do meta e protoxilema (Figura 5C). As paredes das células do parênquima de preenchimento também reagiram levemente com a Floroglucina ácida e, quando observadas sob luz polarizada, apresentaram-se levemente brilhosas. Apenas nas células do parênquima clorofiliano a reação com Lugol foi positiva (Figura 5D). O teste para alcalóide foi negativo nos tecidos do caule. Os resultados são mostrados na Tabela 1.

A epiderme da raiz de *H. salsaparilha* é unisseriada podendo apresentar pelos persistentes, a hipoderme é formada por 3-4 camadas de células de parede espessada e a região cortical, parenquimática, é bastante expandida (Figura 6A). As paredes anticlinais internas e periclinais da endoderme são espessadas e o periciclo é constituído

por 1-2 camadas de células lignificadas (Figura 6B). O sistema vascular é formado por cordões xilemáticos que se alternam com grupos de floema (Figura 6B). A medula parenquimática é reduzida (Figura 6B) e apenas elementos de vaso do tipo pontoados foram observados em corte longitudinal (Figura 6C).

A parede periclinal externa das células epidérmicas da raiz reagiu fracamente com Sudan IV, indicando a presença de cutícula delgada. As paredes das células da hipoderme e as regiões espessadas das células da endoderme, entretanto, reagiram fortemente com o Sudan e com a floroglucina ácida (Figura A-B), indicando a presença de compostos graxos, provavelmente suberina, e de lignina. Apenas as paredes das células corticais, do floema e da medula reagiram com o Vermelho de Rutênio (Figura 7C-D). Os testes para amido e alcalóide foram negativo nos tecidos da raiz. Os resultados são mostrados na Tabela 1.

Figura 4. Caracterização anatômica do caule de *Herreria. salsaparilha* Martius em microscopia de luz e sob luz polarizada. (A) Vista geral em corte transversal. (B) Vista geral em corte longitudinal. Barras=100 µm. (C) Corte longitudinal evidenciando os elementos de vaso em luz visível. (D) Corte longitudinal evidenciando os elementos de vaso em luz polarizada. Barras=50 µm. EE=elemento de vaso espiralado. Ep=epiderme. Hp=hipoderme. PC=parênquima clorofiliano. ACE=anel de células de parede espessada. FV=feixe vascular. Fb=fibras. Ex=extremidades em bisel. PE=parênquima esclerificado. EP=elemento de vaso pontoado. ES=elemento de vaso escalariforme. EA=elemento de vaso anelado.

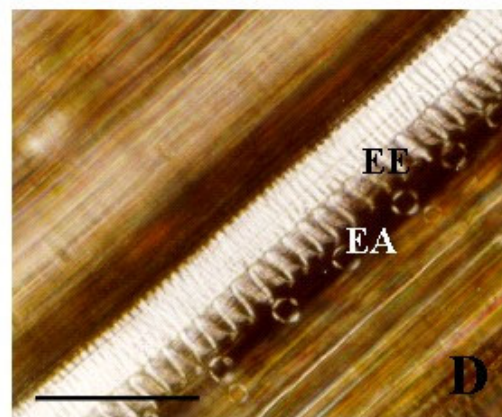
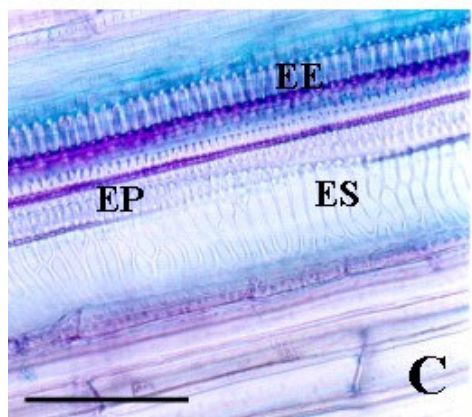
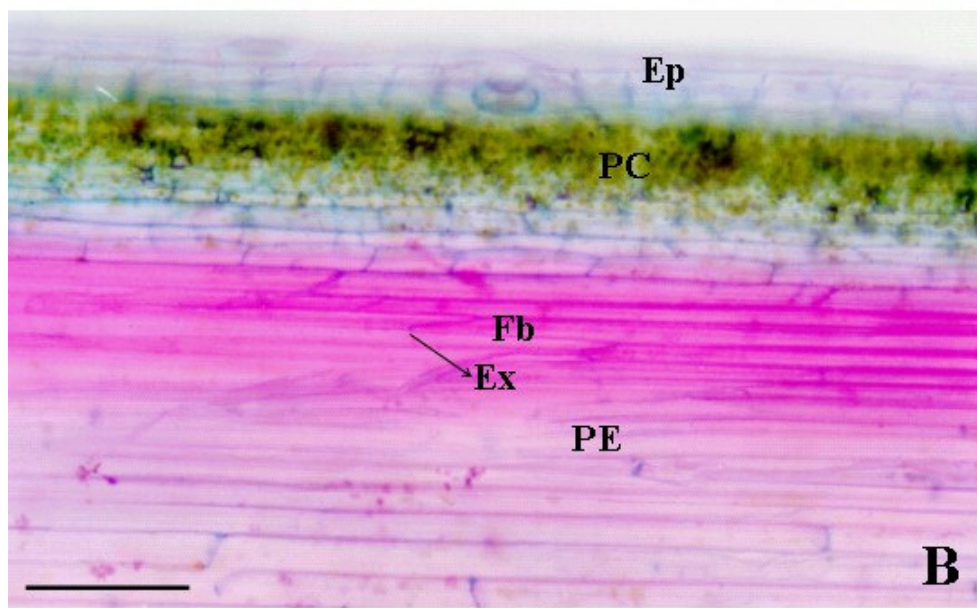
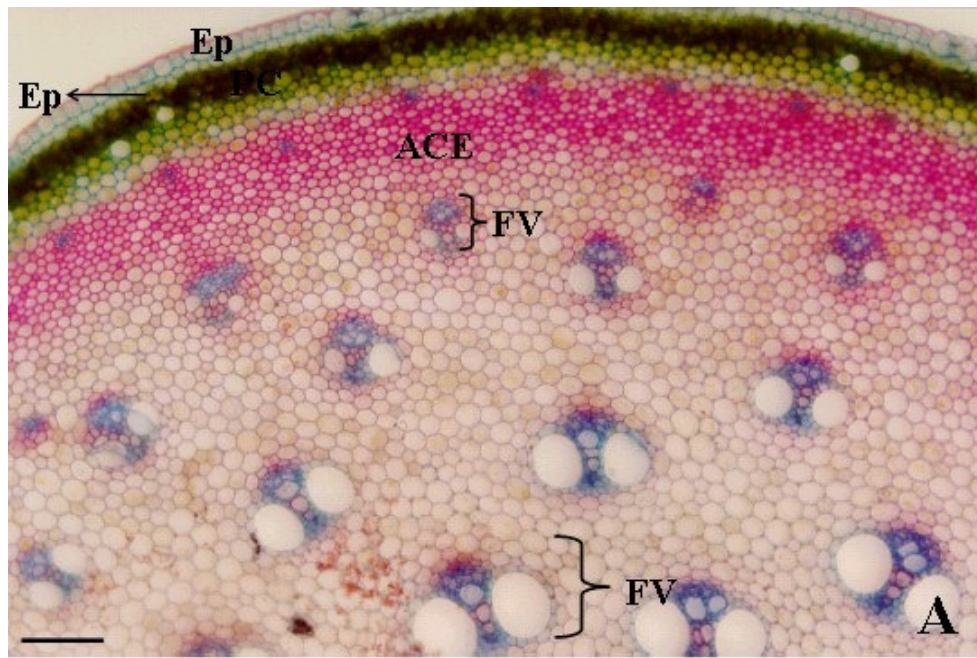


Figura 4

Figura 5. Histoquímica do caule de *Herreria salsaparilha* Martius. Cortes transversais do caule em presença de (A) Sudan VI; (B) Vermelho de rutênio; (C) Floroglucina ácida e (D) lugol. Barras=100 µm. Ep=epiderme. Et=estômato. PC=parênquima clorofiliano. Co=colênquima. Fl=floema. ACE=anel de células de parede espessada.

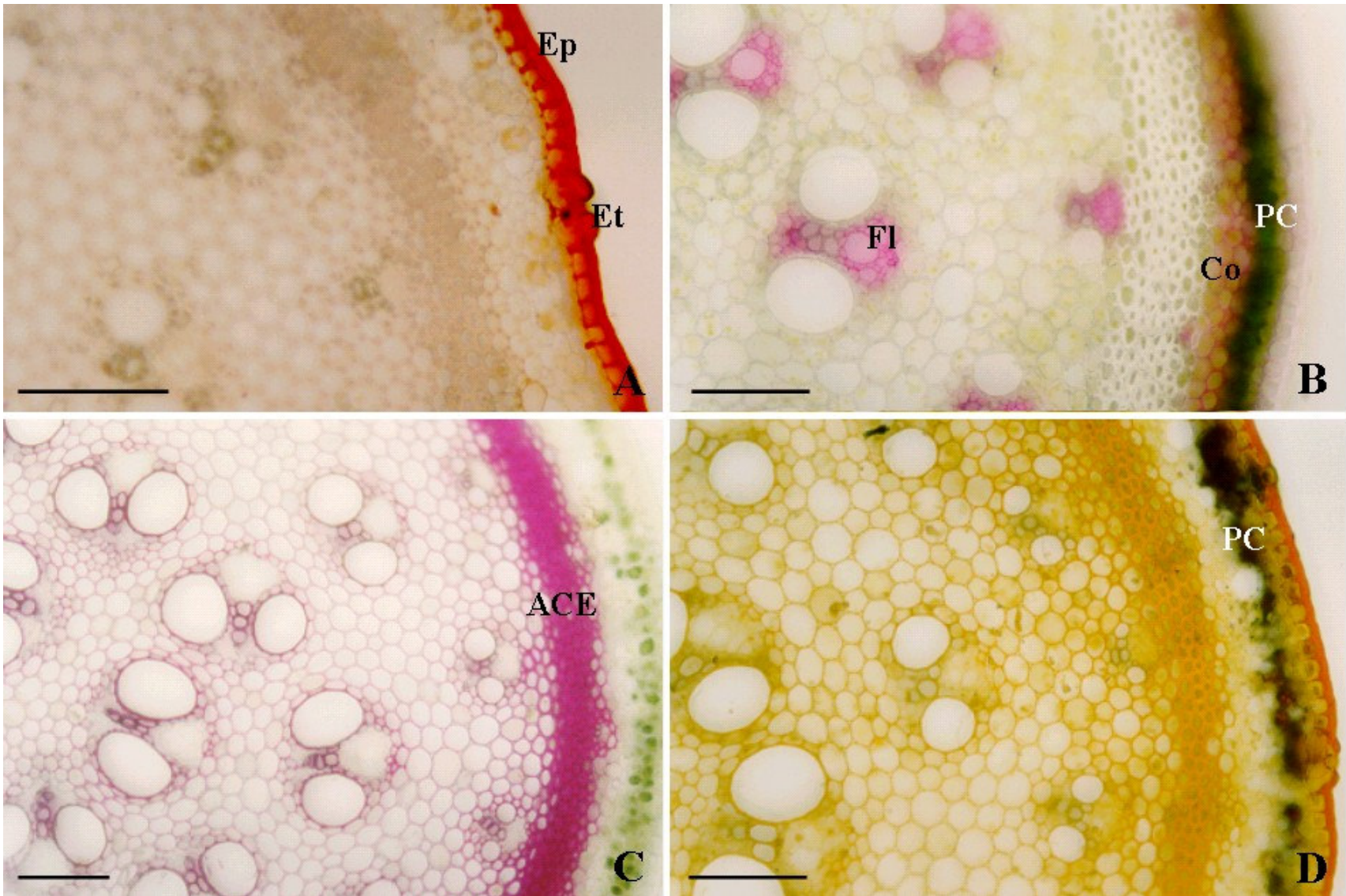


Figura 5

Figura 6. Caracterização anatômica da raiz de *Herreria. salsaparilha* Martius em microscopia de luz. (A) Vista geral em corte transversal. (B) Endoderme e cilindro vascular em corte transversal. Barras=100 µm. (C) Elemento de vaso do tipo pontado em corte longitudinal. Barra=50 µm. Cr=córtex. CV=cilindro vascular. Me=medula. HE=hipoderme esclerificada. En=endoderme. Pe=periciclo. Xl =xilema. Fl=floema. Fb=fibras. EP=elemento de vaso pontado.

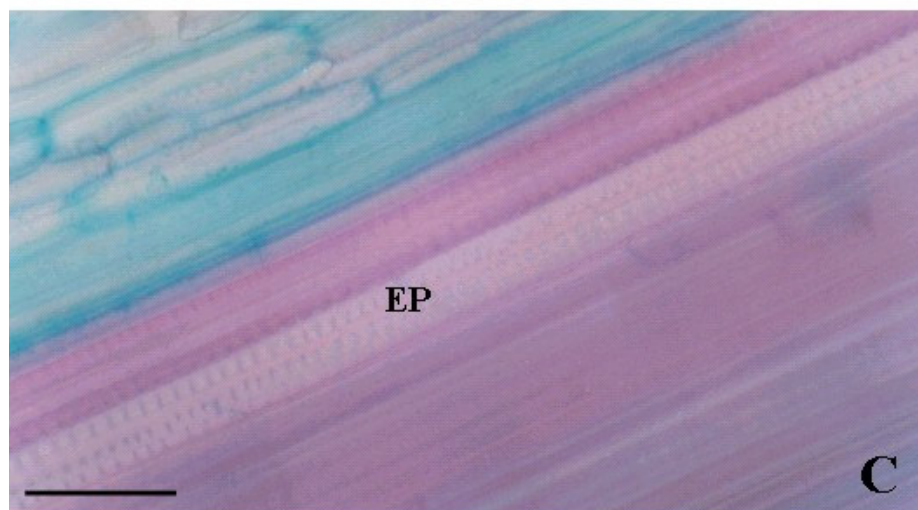
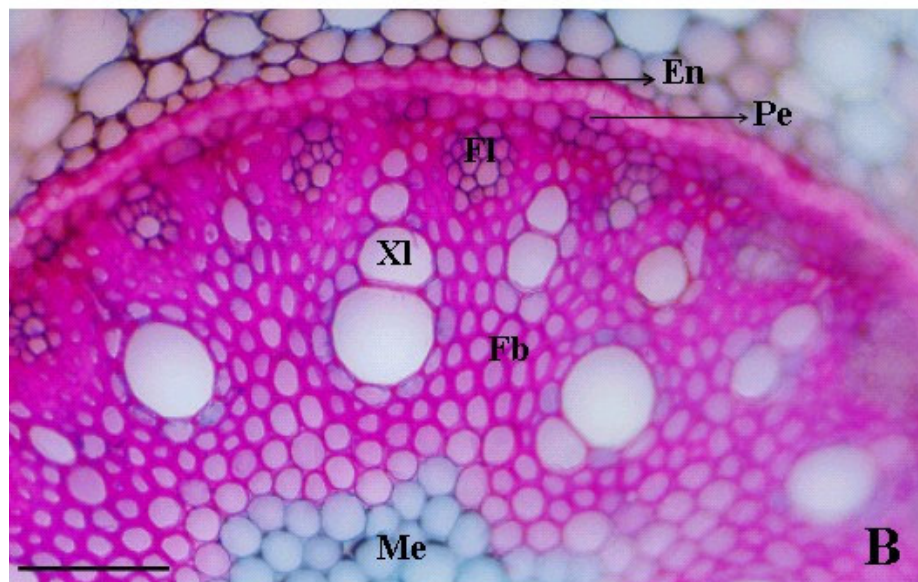
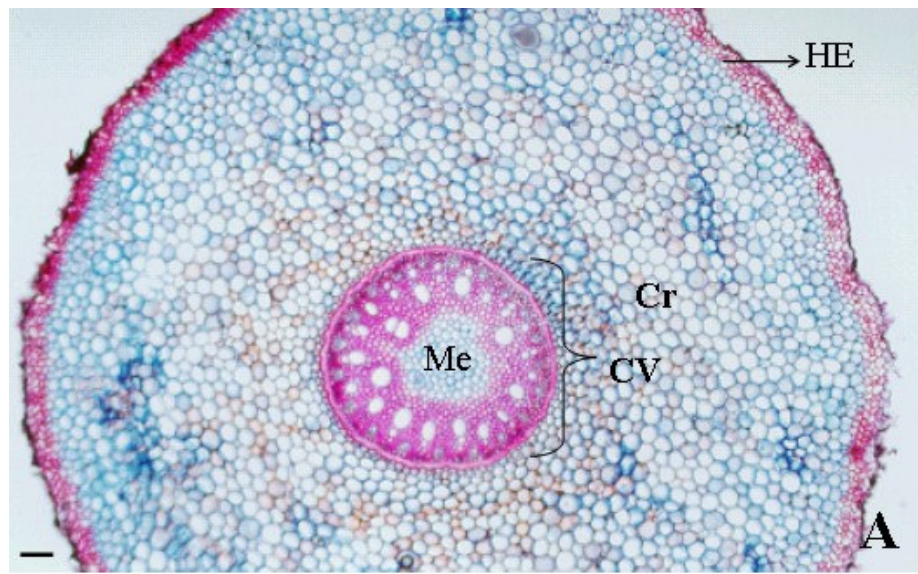


Figura 6

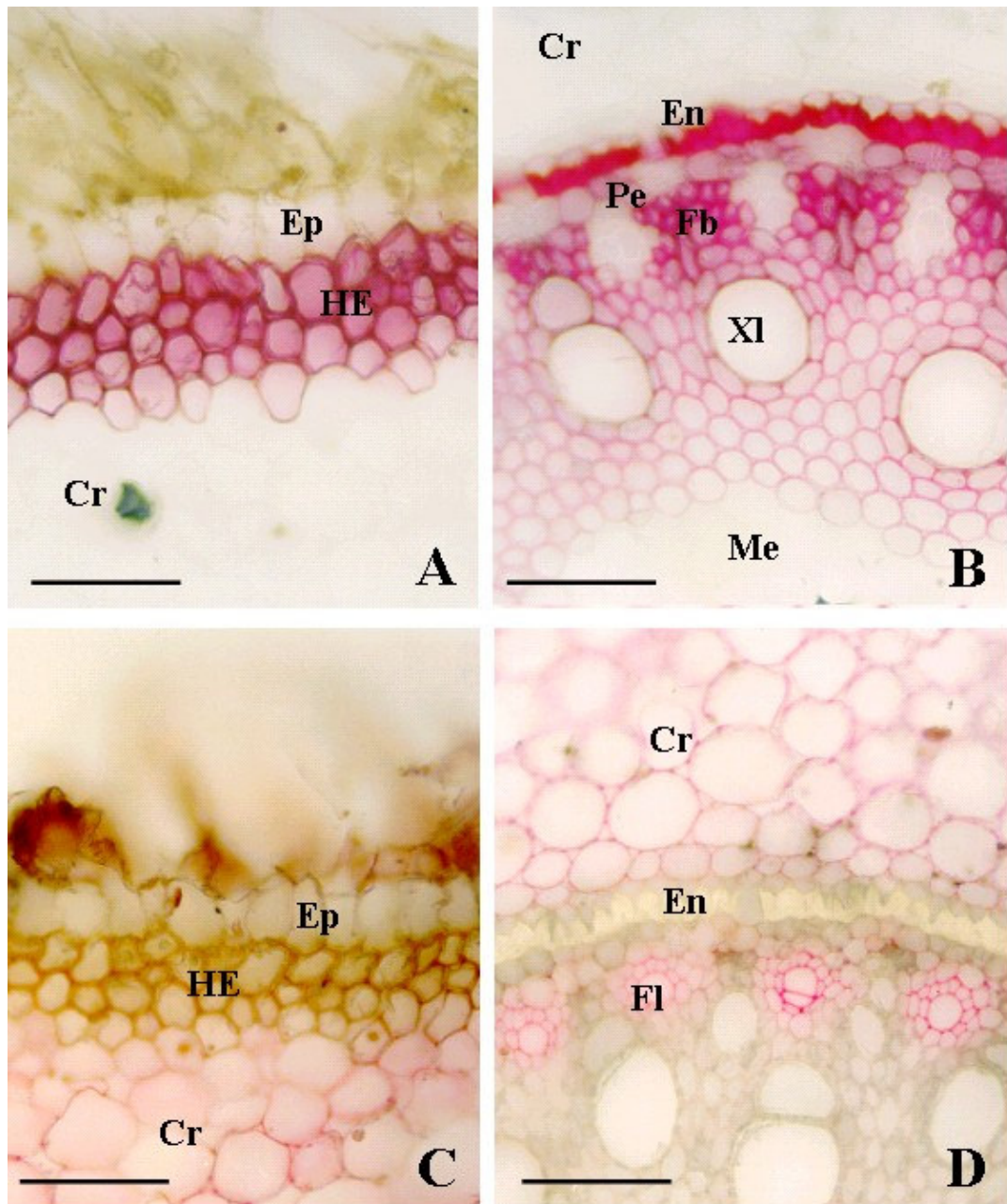


Figura 7. Histoquímica da raiz de *Herreria salsaparilha* Martius. Cortes transversais da raiz em presença de (A-B) Floroglucina ácida e (C-D) Vermelho de Rutênio. Barras=100 μm. Ep=epiderme. HE=hipoderme esclerificada. Em=endoderme. Pe=periciclo. XI =xilema. Fl=floema. Fb=fibras. Cr=córtex. Me=medula.

Ápices caulinar e radicular

Nos cortes longitudinais do ápice caulinar observa-se a região meristemática, constituída por células pequenas, cujos núcleos se coram fortemente por hematoxilina; os primórdios foliares e os primeiros nós e entre-nós (Figura 8A). Elementos de vaso em diferenciação são observados nos primeiros entre-nós (Figura 8B) e ráfides em idioblastos cristalíferos formando fileiras nas regiões de entre-nó e nos primórdios foliares (Figura 8C). Monocristais também ocorrem nos primórdios foliares (Figura 8D) e, em corte transversal, é possível diferenciar a região de procâmbio e do meristema fundamental (Figura 8E), além da protoderme.

Na raiz, as regiões da coifa, da protoderme, do procâmbio e do meristema fundamental são facilmente visualizadas (Figura 8F).

Caracterização anatômica da flor

A flor de *H. salsaparilha* é constituída tépalas, estames e carpelos - apêndices modificados que emergem do receptáculo.

As tépalas, em número de seis, possuem a face abaxial da epiderme constituída por células maiores e mais altas que as células encontradas na face abaxial (Figura 9A). Estômatos estão presentes em ambas as faces. Os feixes vasculares ocorrem na região mediana e, geralmente, em número de três por tépala. O estigma é trífido, indicando a presença de três folhas carpelares formando o pistilo.

As anteras, em número de seis, são tetraesporangiadas e apresentam duas tecas unidas pelo conectivo (Figura 9B). A epiderme dessas anteras é constituída de células pequenas (Figura 9B). O endotécio é uniestratificado (Figura 9B) e as células apresentam parede espessada, característica também observada na região do conectivo. Sob luz polarizada as paredes celulares das células do endotécio e das células do conectivo são visualizadas com brilho (Figura 9C). O tapete não foi observado no material analisado.

O ovário é trilocular (Figura 9D), com 2-3 óvulos por lóculo. Na região mediana de cada carpelo ocorre um feixe vascular inserido no parênquima de preenchimento.

Os cristais de oxalato de cálcio na forma de ráfides são encontrados nas tépalas, nos carpelos (paredes do ovário), no estilete, nas anteras e nos filetes.

Figura 8. Caracterização dos ápices caulinar e radicular de *Herreria salsaparilha* Martius. (A) Ápice caulinar em corte longitudinal. Barra=100 µm. (B) Elementos de vaso em início de diferenciação nos primeiros entre-nós do ápice caulinar visualizado em corte longitudinal. (C) Ráfide e (D) monocristal observados nos primórdios foliares em corte longitudinal. Barras=50 µm. (E) Procâmbio e meristema fundamental visualizados em corte transversal do ápice caulinar. Barras=100 µm. (F) Protoderme, meristema fundamental e procâmbio visualizados em corte longitudinal do ápice radicular. PF=primórdios foliares. RM=região meristemática. EV=elemento de vaso (em início de diferenciação). Rf=ráfide. Mn=monocristal. Pc=Procâmbio. MF=meristema fundamental. Pt=protoderme. Cf=coifa .

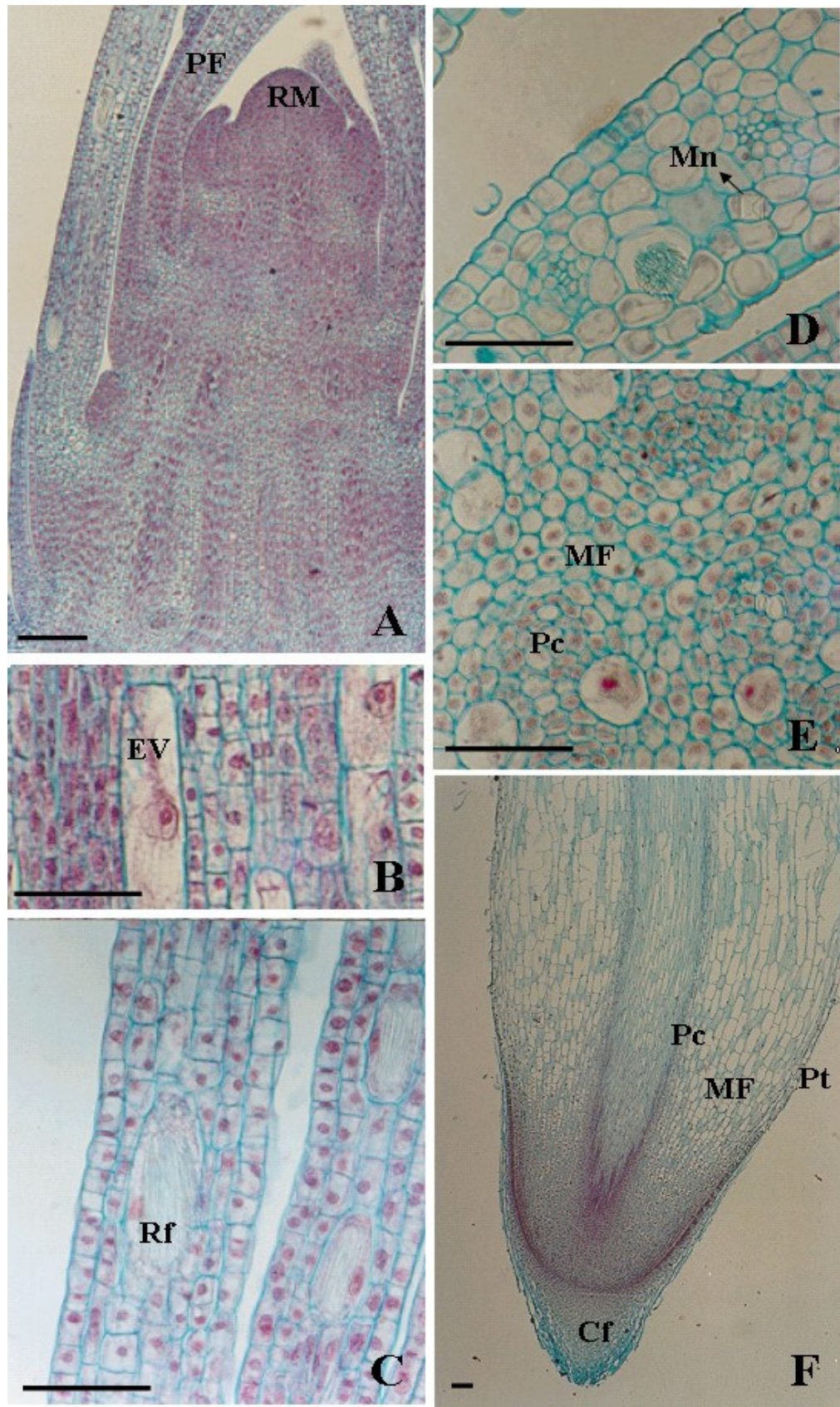


Figura 8

Figura 9. Anatomia floral de *Herreria salsaparilha* Martius. (A) Botão floral em corte transversal. (B) Corte transversal da antera em microscopia de luz e em (B) luz polarizada. (C) ovário em corte transversal. Barras=100 μm . Te=tépala. At=antera. Es=estilete. Ed=endotécio. OT=ovário trilocular.

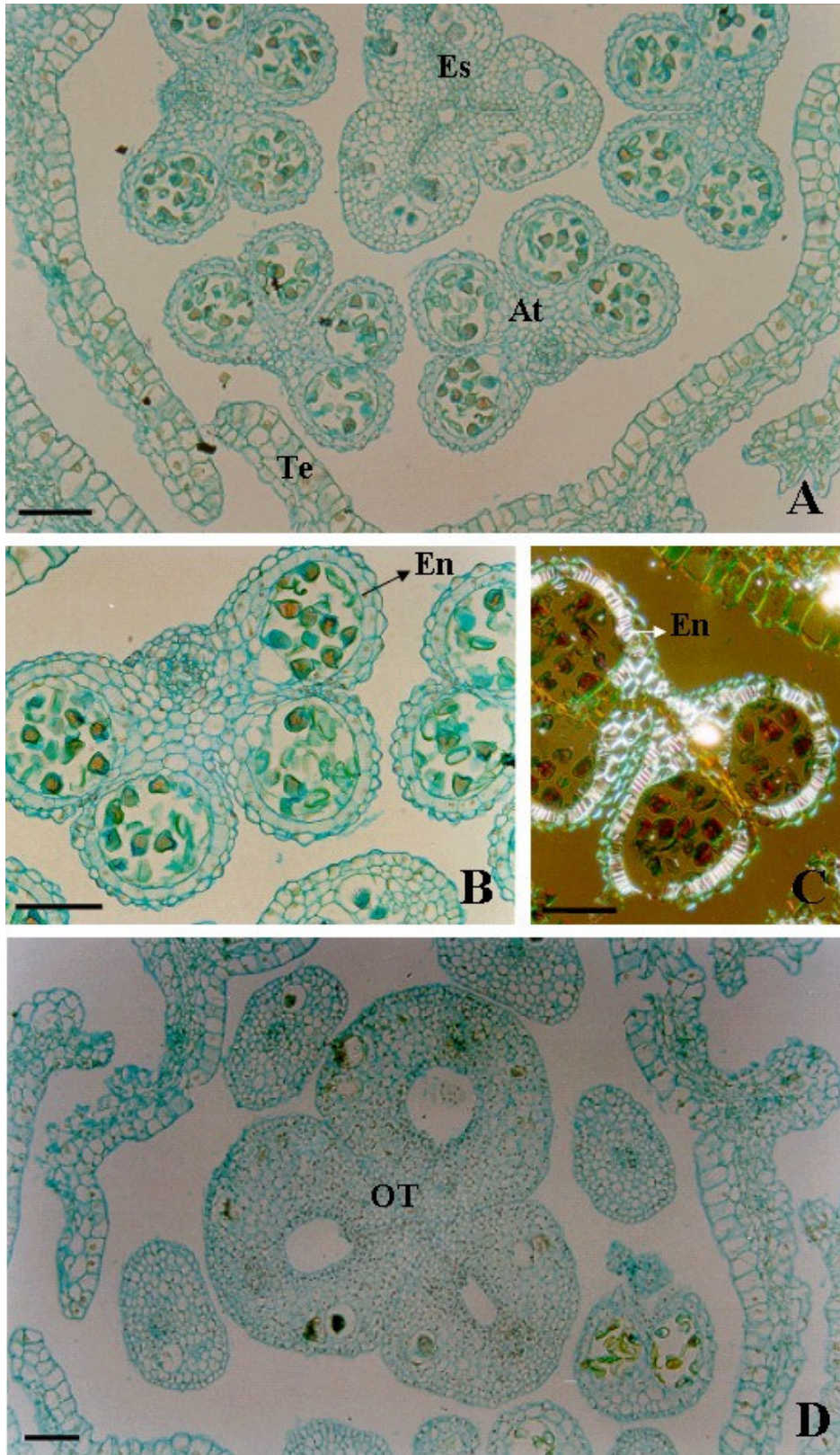


Figura 9

DISCUSSÃO

Os órgãos vegetativos de *H. salsaparilha* analisados no presente trabalho apresentam organização anatômica típica da maioria das monocotiledôneas: folhas com nervuras paralelas entre si, caule do tipo atactostélico, raiz poliarca com córtex expandido, região parenquimática mediana formando a medula, grande quantidade de fibras (Metcalf e Chalk, 1950).

A presença de idioblastos cristalíferos, em tecidos e órgãos específicos ou distribuídos em todo corpo da planta, tem sido observada em muitos grupos de plantas (Al-Rais et al., 1971; Prychid e Rudall, 1999), sendo a presença ou a ausência utilizada como uma importante característica taxonômica (Prychid e Rudall, 1999). Cristais de oxalato de cálcio são observados nas monocotiledôneas mais comumente sob a forma de ráfides, estilóides e drusas. Ráfides são feixes pequenos de cristais aciculares e os estilóides, também chamados de pseudo-ráfides, são usualmente solitários e mais espessos que as ráfides. Nas monocotiledôneas, as ráfides são o tipo de ocorrência mais comum e freqüentemente são encontrados na planta com drusas ou com estilóides, simultaneamente. As drusas e os estilóides, entretanto, raramente ocorrem juntos na planta (Prychid e Rudall, 1999). Em *H. salsaparilha*, além de ráfides e estilóides, esses últimos não antes documentados na família Herreriaceae (Prychid e Rudall, 1999), foram observados também monocristais que ocorrem simultaneamente nas folhas com os dois primeiros tipos. No caule, somente ráfides foram observadas.

O meristema de espessamento secundário (STM), responsável pelo crescimento em espessura do caule em várias monocotiledôneas (Rudall, 1991) e que, segundo Rudall (1995), ocorre no caule de *Herreria montevidensis*, não foi observado no caule de *H. salsaparilha*. Entretanto, segundo Lopes (2003), esse meristema ocorre no rizóforo da mesma. Em famílias como Agavaceae e Dracaenaceae, ocorrem alguns gêneros que também apresentam esse tipo de espessamento como *Yucca*, *Agave*, *Sansevieria* e *Dracaena* (Rudall et al., 2000).

Algumas características anatômicas das raízes de *H. salsaparilha* são semelhantes às observadas nas raízes de *H. montevidensis*: ausência de cristais, endoderme com espessamento nas paredes anticlinais e periclinal interna e elementos de vaso com espessamento de parede na forma pontoada (Kauff et al., 2000). Entretanto, diferentemente de *H. salsaparilha*, a medula das raízes de *H. montevidensis* é

esclerenquimatosos e a hipoderme é dimórfica, ou seja, apresenta alternância regular de células pequenas com células alongadas. Cristais de oxalato de cálcio podem ser encontrados nas raízes de alguns poucos gêneros pertencentes a famílias próximas de Herreriaceae (Rudall et al., 2000). A endoderme, lignificada em *H. salsaparilha*, também foi observada com esse tipo de espessamento em raízes velhas de *Behnia* (Conran, 1999).

Nos estudos taxonômicos, a anatomia, assim como a morfologia externa e a disposição dos órgãos vegetativos e reprodutivos, a ocorrência de determinados compostos e a citogenética, é muito utilizada nos estudos taxonômicos. A estrutura anatômica de *H. salsaparilha* é semelhante à estrutura geral da maioria das monocotiledôneas. Entretanto, a presença e os tipos de cristais, caracteres de ocorrência específica em alguns grupos, talvez possam contribuir na taxonomia do gênero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Rais AH, Myers A, Watson L. 1971.** The isolation and properties of oxalate crystals from plants. *Annals of Botany*, 35: 1213-1218.
- Conran JG. 1999.** Anatomy and morphology of *Behnia* (Behniaceae) and its relationships within Liliales: Asparagales. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 131: 115-129.
- Dahlgren RMT, Clifford HT. 1982.** *The Monocotyledons: a comparative study.* Academic Press Inc. London, 378p.
- Delucchi G, Colares MN, Monti C, Freire SE. 1998.** Anatomia y etnobotánica de las especies medicinales de monocotiledóneas de la estepa pampeana argentina. *Acta Farmacologica Bonaerense*, 17(2): 91-96.
- Jensen WA. 1962.** *Botanical histochemistry.* San Francisco: H. Freeman and Co, 408 p.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique.* New York: McGraw Hill Book, 523p.
- Kauff F, Rudall PJ, Conran JG. 2000.** Systematic root anatomy of Asparagales and other monocotyledons. *Plant Systematics and Evolution*, 223: 139-154.
- Lopes RC. 2003.** *Herreriaceae Endlicher: revisão taxonômica dos gêneros neotropicais *Herreria* Ruiz & Pavon e *Clara* Kunth.* Rio De Janeiro: UFRJ/MN. 213p. Tese (Doutorado em Botânica).
- Lopes RC, Andreato RHP. 2003.** *Clara* Kunth. (Herreriaceae): novo posicionamento taxonômico para o gênero. *Bradea*, IX: 17-20.
- Metcalf CR, Chalk L. 1950.** *Anatomy of the dicotyledons.* Vol. 1. Oxford: Clarendon Press.

- Peckolt O. 1936.** Sobre a planta productora da Japecanga. *Revista da Flora Medicinal*, 2(9): 513-518.
- Peckolt T, Peckolt G. 1888.** História das plantas medicinaes e uteis do Brazil. Rio de Janeiro: Typographia Laemmert & C. p.98-115.
- Prychid CJ, Rudall PJ. 1999.** Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. *Annals of Botany*, 84: 725-739.
- Rodrigues VEG, Carvalho DA. 2001.** Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 180p.
- Rudall PJ. 1991.** Lateral meristems and stem thickening growth in monocotyledons *The Botanical Review*, 57: 150-163.
- Rudall P. 1995.** New records of secondary thickening in monocotyledons. *Iawa Journal*, 16: 261-268.
- Rudall PJ, Conran JG, Chase MW. 2000.** Systematics of Ruscaceae/Convallariaceae: a combined morphological and molecular investigation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 134: 73-92.
- Svendsen AB, Verpoorte R. 1983.** Chromatography of alkaloids. New York: Elsevier Scientific Publishing Company.

CAPÍTULO II

Citogenética e citometria de fluxo em *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae)

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi determinar o cariótipo e quantificar o DNA nuclear de *Herreria salsaparilha* Martius, planta conhecida popularmente como salsaparrilha e utilizada tradicionalmente desde tempos remotos como depurativa e anti-sifilítica. Ápices de raízes adventícias formadas na base de estacas, provenientes de plantas cultivadas em telado, foram utilizados na determinação do cariótipo. As amostras foram pré-tratadas com solução de amiprofos-metil (BayerTM), fixadas com metanol:ácido acético e armazenadas a -20°C. Utilizou-se solução enzimática recém-preparada de Flaxzyme (Novo FermentTM) e água destilada. Lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular e secagem ao ar. A coloração foi realizada utilizando solução de Giemsa, em tampão fosfato pH 6,8. A quantidade de DNA, em picogramas, foi determinada utilizando amostras foliares das plantas cultivadas em telado. Utilizou-se a metodologia de citometria de fluxo, com DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) e IP (iodeto de propídio) (SigmaTM) como fluorocromos específicos de DNA, e amostras foliares de *Pisum sativum* (9,09 pg) como padrão interno. *H. salsaparilha* possui 29 pares de cromossomos homólogos (2n=58), 12 pares acrocêntricos (com comprimento total variando de 1,75 a 10,51 µm), 16 pares submetacêntricos (1,30 a 3,45 µm) e 1 par metacêntrico (2,80 µm). A análise de citometria de fluxo, em ambos os tipos de coloração utilizados (DAPI e IP), gerou histogramas com coeficiente de variação menor que 3% e revelou que *H. salsaparilha* possui conteúdo de DNA nuclear com 2C=5,5 pg, aproximadamente.

Palavras chave: *Herreria salsaparilha*, Herreriaceae, cariótipo, citometria de fluxo, valor C.

INTRODUÇÃO

Herreria salsaparilha Martius é uma monocotiledônea conhecida popularmente como salsaparrilha, mandioquinha, japecanga, salsa do mato, salsa gerdas, salsa caroba e cipó salsa (Lopes, 2003) e desde o período colonial suas raízes são utilizadas na medicina popular como depurativa e anti-sifilítica (Peckolt, 1936; Rodrigues e Carvalho, 2001). No Brasil, é encontrada nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e no Distrito Federal (Lopes, 2003), mas espécies do gênero *Herreria* ocorrem também no Paraguai, Uruguai, Argentina e Chile (Lopes e Andreatta, 2003).

Historicamente, o gênero *Herreria* já foi considerado como sendo pertencente a diversas famílias, entre elas Smilacaceae e Liliaceae (Lopes e Andreatta, 2003). Entretanto, estudos recentes de revisão do gênero, concluíram que o mesmo deve ser classificado como Herreriaceae (Ordem Asparagales) (Lopes, 2003), o que está de acordo com a classificação proposta por Dahlgren e Clifford (1982).

Os estudos citológicos de *H. salsaparilha* são escassos. Satô (1942) estudando o cariótipo em espécies de Liliaceae e famílias co-relacionadas descreveu simplificada o cariótipo de *H. salsaparilha*, mas seus estudo deixam margem a dúvidas.

Estudos de citogenética fornecem informações importantes acerca da organização genômica da planta, como número e morfologia dos cromossomos e essas informações podem, muitas vezes, auxiliar na solução de problemas taxonômicos de identificação e, ou, classificação (Ohri, 1998) e nos estudos evolutivos, uma vez que permite identificar as alterações cromossômicas e os mecanismos envolvidos no processo de especiação (Greilhuber, 1998).

O objetivo do presente trabalho foi determinar o cariótipo e quantificar o DNA nuclear, em picogramas, de *Herreria salsaparilha* Martius.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

As plantas de *Herreria salsaparrilha* Martius foram obtidas de estacas a partir de planta matriz procedente de Teixeira/MG, altitude 649 metros (lat. 20°45'20" S long. 42°52'40" W). O clima na região de Teixeira é o do tipo tropical de altitude (Cwb segundo classificação de Köppen), com verões quentes e temperatura no mês mais quente inferior a 22°C (Köppen, 1948). As estacas com aproximadamente 15 cm de altura e com duas gemas foram colocadas em leito de enraizamento contendo areia lavada, sob sombrite 50% e irrigadas diariamente. Após enraizamento, as estacas foram transplantadas para vasos de polietileno com capacidade de 6 L contendo a mistura de solo, esterco e areia na proporção de 3:1:1 e mantidas em telado coberto do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa/MG, onde receberam irrigação periódica e controle fitossanitário.

Os materiais testemunha foram preparados segundo as normas usuais de herborização e depositados no Herbário VIC do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, sob numeração específica (25.825). A identificação da espécie foi confirmada pela especialista da família, Profa. Rosana Conrado Lopes (Universidade Federal do Rio de Janeiro - Ilha do Fundão/RJ).

Análise do cariótipo

As análises de cariótipo e citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Citogenética Vegetal, do Departamento de Biologia Geral (DBG) da UFV.

A partir das plantas no telado foram preparadas estacas que, após enraizamento em areia lavada, foram utilizadas na coleta de ápices radiculares. Esses ápices foram transferidos para tubo de ensaio contendo 3 µM do bloqueador APM (amiprofos-metil) onde permaneceram por 4 h. Após esse período, os ápices foram lavados em água destilada e fixados em solução, recém preparada, de metanol:ácido acético (3:1), realizando-se 3 trocas, e estocados a -20°C. No procedimento de maceração enzimática os ápices radiculares foram lavados em água destilada e transferidos para tubos Eppendorf contendo 10 µL Flaxzyme (Novo FermentTM) e 120 µL de água destilada, onde permaneceram por 1 h 30 minutos a 34 °C, em banho maria. Após esse período, os

ápices radiculares foram submetidos à nova lavagem, fixação e estocagem. As lâminas foram preparadas por dissociação celular do meristema e secagem ao ar (Carvalho e Saraiva, 1993, 1997). Posteriormente, foram mantidas em placa aquecedora à temperatura de 37°C. A coloração das lâminas foi realizada com solução Giemsa a 3%, em tampão fosfato pH 6,8, por 4 minutos, à temperatura ambiente.

As lâminas foram observadas com objetiva de imersão de 100X, em fotomicroscópio OlympusTM (modelo BX60), equipado com acessórios de análise de imagem e iluminação de campo claro.

As imagens de interesse foram capturadas diretamente por uma vídeo-câmera, acoplada ao microscópio e a um computador MacintoshTM equipado com placa digitalizadora. As figuras armazenadas foram processadas através do programa de domínio público “NIH Imagem Program” (Rasband, 1998).

Os comprimentos total, do braço curto e do braço longo dos cromossomos (μm) foram medidos e, posteriormente, o tamanho relativo (CR %), o índice centromérico (IC) e a relação entre os braços longo e curto (R) foram calculados. A classificação dos cromossomos seguiu a revisão de nomenclatura proposta por Guerra (1986).

Citometria de fluxo

A determinação do DNA nuclear de *H. salsaparilha* foi realizada pela técnica de citometria de fluxo (Doležel e Gohde, 1995 com modificações).

Discos foliares, com 6 mm de diâmetro, foram retirados de folhas totalmente expandidas, provenientes das plantas cultivadas em telado, e colocados em placa de Petri, devidamente identificada, contendo 1 ml de solução tampão utilizada na extração de núcleos (ácido cítrico 0,1M e Tween 20 a 5%). As amostras foram picotadas com uma lâmina de barbear e filtradas em telas de 30 μm de mesh para um Eppendorf. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspendido, utilizando Vortex, em 100 μl do mesmo tampão utilizado na extração dos núcleos e estocado por 10 minutos a 5° C no escuro.

As amostras foram submetidas à coloração com DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol, Sigma Chem. Co, US) e IP (Iodeto de Propídio, Sigma Chem. Co, USA). Na coloração com DAPI utilizou-se 1,5 ml de solução contendo: 500 μl de DAPI 15 μM e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4M. O material foi incubado à temperatura ambiente, no escuro, por 10-15 minutos. Na coloração com IP utilizou-se 1,5 ml de solução contendo: 500 μl de

iodeto de propídio 15 mM, 500 µl de RNase 1mg/ml e Na₂HPO₄.2H₂O 0,4 M. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos.

Após coloração as amostras foram transferidas para tubos de leitura de um citômetro de fluxo Partec PAS II/III (PARTEC GmbH, Munster, Germany), equipado com fontes de laser e lâmpada de mercúrio de alta pressão (HBO) – 100 W e filtros de excitação KG-1, BG-38 e UG-1; este último utilizado para excitação em UV de 200-700 nm. As posições dos picos G₀/G₁ e os coeficientes de variação (CV) foram calculados por meio do programa FlowMax Partec. Utilizou-se como padrão interno *Pisum sativum* L. (2C=9,09 pg de DNA) (Doležel et al., 1992) e o conteúdo de DNA nuclear foi estimado segundo Doležel (1991). O padrão interno foi cedido pelo Dr. J. Doležel (Institute of Experimental Botany, Olomuc, Czech Republic). Foram analisados, no mínimo, 10.000 núcleos por amostra e análises das amostras com coeficiente de variação (CV) maior que 3% foram descartadas.

RESULTADOS

Análise do cariótipo

Os procedimentos adotados no pré-tratamento e no preparo das lâminas resultaram em metáfases morfológicamente definidas e espalhadas no mesmo plano de foco da lâmina, permitindo a montagem do primeiro cariograma da espécie. *Herreria salsaparilha* possui 29 pares de cromossomos homólogos ($2n=58$) (Figura 1) em todas as células analisadas: 12 pares acrocêntricos (com comprimento total variando de 1,75 a 10,51 μm), 16 pares submetacêntricos (1,3 a 3,45 μm) e 1 par metacêntrico (2,80 μm) (Tabela 1).

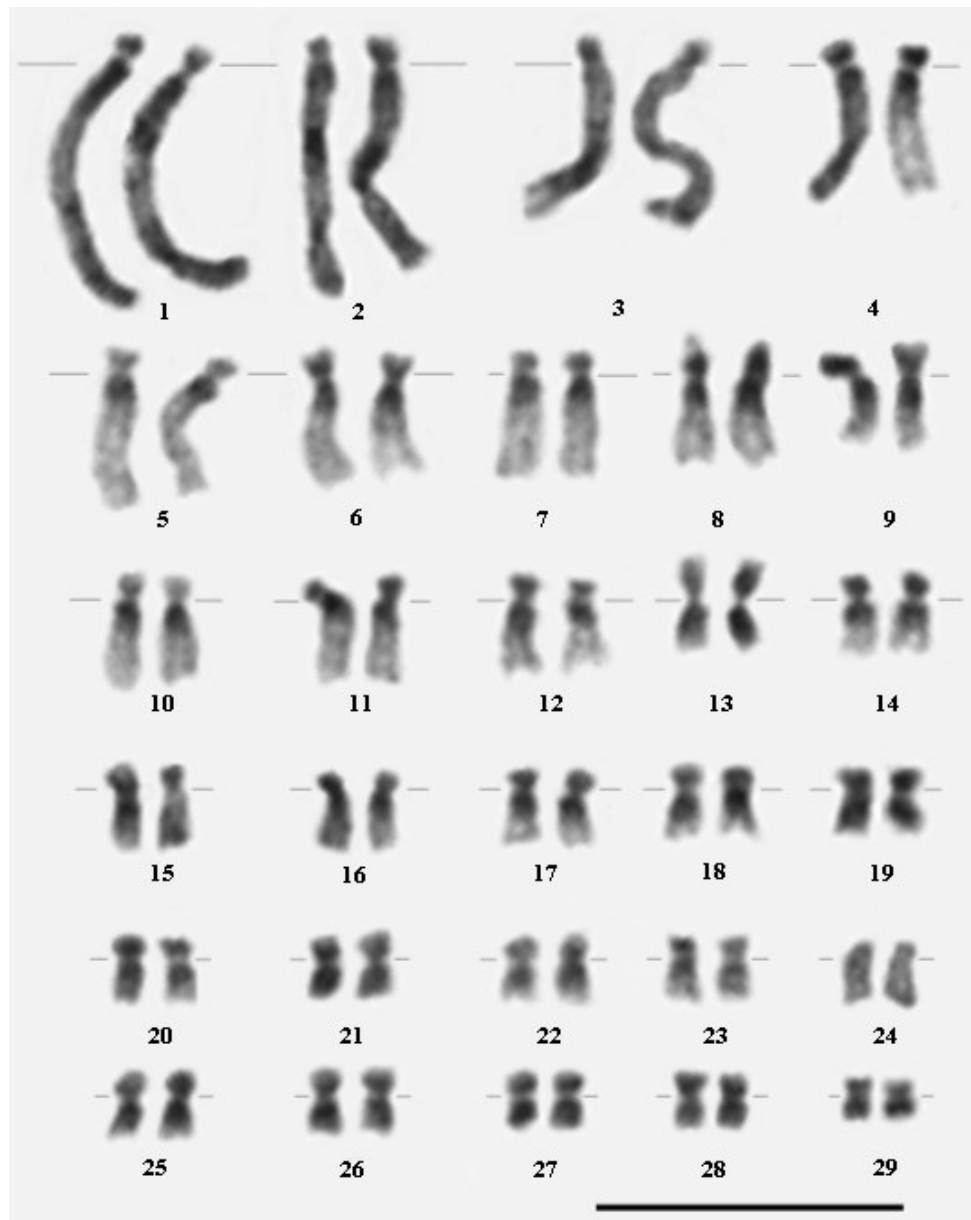


Figure 1. Cariograma de *Herreria salsaparilha* Martius. Cromossomos metafásicos pré-tratados com APM a 3,0 μ M, por 4 h, e corados com Giemsa a 3%, organizados em 29 pares homólogos ($2n=58$). Barra = 10 μ m.

Tabela 1. Dados morfométricos dos cromossomos de *Herreria salsaparilha* Martius mostrados na Figura 1.

Par Homólogo	Comprimento			R	IC	Classe	Comprimento relativo (%)
	Comprimento Total (µm)	Braço Curto	Braço Longo				
1	10,05	0,70	9,35	13,36	7,0	A	10,51
2	8,35	0,65	7,70	11,85	7,8	A	8,73
3	7,10	0,65	6,45	9,92	9,2	A	7,42
4	5,15	0,65	4,50	6,92	12,6	A	5,38
5	4,95	0,50	4,45	8,90	10,1	A	5,18
6	4,15	0,75	3,40	4,53	18,1	A	4,34
7	4,05	0,60	3,45	5,75	14,8	A	4,23
8	3,95	0,95	3,00	3,16	24,1	A	4,13
9	3,45	1,05	2,40	2,29	30,4	SM	3,61
10	3,40	0,65	2,75	4,23	19,1	A	3,55
11	3,25	0,55	2,70	4,91	16,9	A	3,40
12	3,05	0,65	2,40	3,69	21,3	A	3,19
13	2,80	1,30	1,50	1,15	46,4	M	2,93
14	2,65	0,80	1,85	2,31	30,2	SM	2,77
15	2,55	0,70	1,85	2,64	27,5	SM	2,67
16	2,50	0,65	1,85	2,85	26,0	SM	2,61
17	2,40	0,70	1,70	2,43	29,2	SM	2,51
18	2,25	0,70	1,55	2,21	31,1	SM	2,35
19	2,10	0,70	1,40	2,00	33,3	SM	2,20
20	2,05	0,70	1,35	1,93	34,1	SM	2,14
21	1,95	0,75	1,20	1,60	38,5	SM	2,04
22	1,85	0,65	1,20	1,85	35,1	SM	1,93
23	1,80	0,55	1,25	2,27	30,6	SM	1,88
24	1,75	0,30	1,45	4,83	17,1	A	1,83
25	1,75	0,65	1,10	1,69	37,1	SM	1,83
26	1,75	0,70	1,05	1,50	40,0	SM	1,83
27	1,65	0,65	1,00	1,54	39,4	SM	1,73
28	1,65	0,65	1,00	1,54	39,4	SM	1,73
29	1,30	0,50	0,80	1,60	38,5	SM	1,36
Total	95,65	20,00	75,65				
Média				3,78	20,9		100,00

R = razão entre os braços longo e curto; IC = índice centromérico; A = acrocêntrico; SM= submetacêntrico; M = metacêntrico

Citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo, em ambos os tipos de coloração utilizados (DAPI e IP), gerou histogramas (Figura 2) com coeficientes de variação (CV) inferiores a 3%, indicando que os núcleos não sofreram danos significativos durante a extração, coloração e análise. Assim, o procedimento aplicado para estimar o conteúdo de DNA nuclear em amostras de *H. salsaparilha* pode ser considerado apropriado.

A citometria de fluxo revelou que *H. salsaparilha* possui aproximadamente $2C=5,5$ pg de DNA por núcleo (Tabela 2). A conteúdo de DNA do padrão *Pisum sativum* (9,09 pg) foi determinada por Doležel et al. (1992) (Tabela 1).

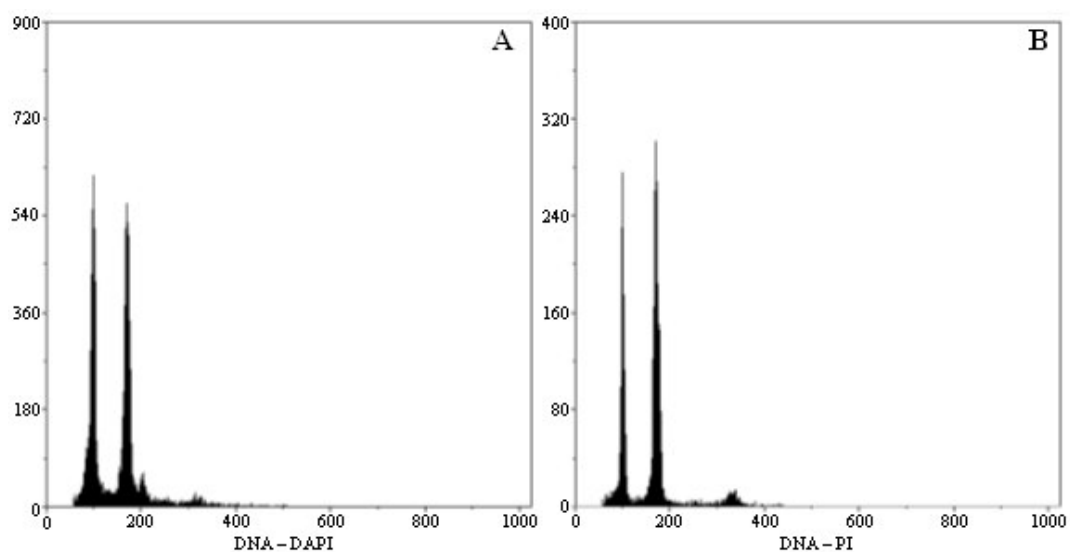


Figure 2. Histogramas de núcleos corados com fluorocromos (A) DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) e (B) IP (iodeto de propídio), usando como padrão interno *Pisum sativum* L. ($2C=9,09$ pg). Os eixos vertical e horizontal representam a quantidade de núcleos e a intensidade de fluorescência (canal com 100 bits), respectivamente. O pico GO/G1 para *Herreria salsaparrilha* Martius corresponde ao canal 100 nos dois histogramas gerados (DAPI e IP) e para *P. sativum* aos canais 166 no histograma A (DAPI) e 166 no histograma B (IP), respectivamente.

Tabela 2. Quantidade de DNA nuclear, em picogramas, de *Herreria salsaparilha* Martius utilizando DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) e IP (iodeto de propídio) como fluorocromos e *Pisum sativum* L. como padrão interno.

Fluorocromo	Espécie	Canal	DNA (pg)
DAPI	<i>H. salsaparilha</i>	100	5,51
	<i>P. sativum</i>	165	9,09
IP	<i>H. salsaparilha</i>	100	5,48
	<i>P. sativum</i>	165	9,09

DISCUSSÃO

Em plantas, o nível de ploidia, o número e o tamanho dos cromossomos e a quantidade de DNA nuclear se diferem, geralmente, entre os táxons. Nas Angiospermas o número de cromossomos pode variar de dois (dicotiledôneas e monocotiledôneas) a 250 (dicotiledôneas). Entretanto, esses caracteres são relativamente constantes para muitas espécies e, por esse motivo, possuem valor taxonômico e têm sido determinados para muitas espécies (Bennett, 1987).

O número de cromossomos encontrado em *H. salsaparilha*, $2n=58$, difere do valor observado por Satô (1942), $2n=54$. Segundo esse autor, *H. salsaparilha* possui quatro pares de cromossomos longos, com constrição subterminal e 23 pares de cromossomos curtos, o que lembra o tipo *Yucca-Agave* (5 longos e 25 curtos) (Satô, 1935). *Yucca* sp. e *Agave* sp. são gêneros pertencentes à família Agavaceae, bastante correlacionada com a família Herreriaceae (Dahlgren e Clifford, 1982). É importante ressaltar que no trabalho de Satô (1942) foram utilizados ápices caulinares que, após terem sido fixados e emblocados em parafina, foram cortados em micrótomo (cortes com 10-25 μm de espessura), corados com Violeta de Genciana; os resultados foram documentados por meio de desenhos em câmara clara. Essa metodologia difere da utilizada no presente trabalho e pode ser o motivo da discordância entre os resultados.

A utilização do bloqueador mitótico APM e a fixação em solução metanol: ácido acético proporcionou a obtenção de cromossomos metafásicos com ótima integridade morfológica. Segundo Planchais et al. (2000), o APM apresenta elevada atividade de despolimerização dos microtúbulos, impedindo que as células atinjam a anáfase; outra vantagem desse herbicida está no fato de ser eficiente em concentrações da ordem de micromolar. A solução fixadora evita a perda de ácidos nucléicos e proteínas, preservando a morfologia dos cromossomos e provoca a precipitação de nucleases que podem danificar os mesmos (Leitch et al., 1994). Além disso, a metodologia de dissociação celular permitiu a obtenção de metáfases com cromossomos bastante individualizados na lâmina. Com a captura de imagens foram realizadas análises detalhadas de cada par de homólogos e, conseqüentemente, montagem adequada do kariograma. Em concordância com outros trabalhos (Carvalho e Saraiva, 1993, 1997; Caixeta e Carvalho, 1998), a metodologia de dissociação celular permite obtenção de preparações de cromossomos de excelente qualidade.

Atualmente, a citometria de fluxo tem sido utilizada com sucesso na determinação da quantidade de DNA nuclear de plantas (Bennett et al., 2000). A técnica apresenta precisão, rapidez, pouca variação de resultados obtidos de experimentos repetidos em laboratórios diferentes (Doležel et al., 1998) e compatibilidade com outras metodologias utilizadas com a mesma finalidade como a citometria fotométrica e a citometria de imagem (Vilhar et al., 2001). Este método é baseado no isolamento de células ou núcleos em suspensão e a utilização de fluorocromos específicos para DNA. A fluorescência emitida de cada núcleo é quantificada utilizando um citômetro de fluxo. O método foi originalmente aplicado em células animais e seu uso tem se estendido para estudos em plantas (Doležel, 1991).

A quantidade de DNA nuclear de *H. salsaparilha* ($2C=5,5$ pg) é maior que a quantidade encontrada na maioria das monocotiledôneas analisadas por Bennett et al. (2000). Entretanto, existe muita variação quanto a quantidade de DNA em plantas, em particular entre as monocotiledôneas. Em *Brahea dulcis* (Palmae), por exemplo, a quantidade de DNA encontrada foi de $2C=112.6$ pg. em *Carex nubigera* ssp. *albata* (Cyperaceae) o valor foi de $2C=0,3$ pg de DNA nuclear (Bennett et al., 2000).

Em *H. salsaparilha* os valores de DNA (pg) encontrados com DAPI e IP foram muito semelhantes, com todos os CV inferiores a 3%. Segundo Doležel (1997), CV entre 1% e 3% são tidos como de alto nível de resolução para estimar o conteúdo de DNA nuclear em plantas. A eficiência de um determinado corante ou de um determinado protocolo de coloração é avaliada pelo CV do pico GO/G1 do histograma gerado pelo citômetro. O CV é uma indicação da resolução do pico. Quanto maior o valor do CV, mais largo será o pico, maior a dificuldade para que dois picos localizados muito próximos sejam discriminados e, conseqüentemente, menor a eficácia na determinação da região S do histograma (Yanpaisan et al., 1999). A semelhança nos valores encontrados com DAPI e IP (aproximadamente 5,5 pg) deve-se a não diferença significativas na relação de bases AT/CG em relação à preferência por fluorocromos. Tendo em vista essa semelhança, tanto o DAPI quanto o IP podem ser utilizados na análise de citometria de fluxo em *H. salsaparilha*.

Os fluorocromos utilizados na citometria de fluxo podem ser classificados em dois grupos: os intercalantes, como é o caso do IP, e os que se ligam preferencialmente às bases nitrogenadas como o DAPI (bases AT) (Doležel, 1991). O mesmo autor comparando a resposta de DAP, IP e mitramicina (fluorocromo que se liga preferencialmente à bases nitrogenadas CG) em *Raphanus sativus* L., *Lycopersicon*

esculentum Mill., *Zea mays* L., *Pisum sativum* L., *Vicia faba* L. e *Allium cepa* L. observou que o resultado obtido com IP foi semelhante aos obtidos por outros autores usando outras técnicas. Entretanto, os valores obtidos com DAPI e mitramicina foram significativamente diferentes. O autor conclui que este ocorrido se deve as diferenças das razões AT/CG, e pelas diferenças de reconhecimento espécie-específico desses fluorocromos ao DNA. A utilização de fluorocromos intercalantes, associada aos que se ligam preferencialmente a bases nitrogenadas podem fornecer informações adicionais sobre a organização do DNA.

Tendo em vista a escassez de informações citogenéticas sobre as espécies de *Herreria*, a caracterização do cariótipo e a quantificação do DNA de *H. salsaparilha* fornecem informações que iniciam os estudos sobre o gênero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bennett MD. 1987.** Variation in genomic form in plants and its ecological implication. *New Phytologist* **106**(Suppl.): 177-200.
- Bennett MD, Bhandol P, Leitch IJ. 2000.** Nuclear DNA amounts in Angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. *Annals of Botany* **86**: 859-909.
- Carvalho CR, Saraiva LS. 1993.** A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG banding technique for maize chromosomes. *Heredity* **70**: 515-519.
- Carvalho CR, Saraiva LS. 1997.** High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes. *Journal of Plant Research* **110**: 417-420.
- Caixeta ET, Carvalho CR. 2000.** Chromomeric pattern of maize pachytene chromosomes after trypsin treatment. *Hereditas* **133**: 183-187.
- Dahlgren RMT, Clifford HT. 1982.** The Monocotyledons: A Comparative Study. Academic Press Inc. London, 378p.
- Doležel J. 1991.** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis* **2**: 143-154.
- Doležel J. 1997.** Application of flow cytometry for the study of plant genome. *Journal Applied Genetics* **38**: 285-302.
- Doležel J, Gohde W. 1995.** Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* **19**: 103-105.
- Doležel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysák MA, Nardi L, Obermayers R. 1998.** Plant genome size estimation by flow cytometry: interlaboratory comparison. *Annals of Botany* **82**(Suppl.): 17-26.

- Doležel J, Sgorbati S, Lucretti S. 1992.** Compararison of threee DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* **85**: 625-631.
- Greilhuber J. 1998.** Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. *Annals of Botany* **82**: 27-35.
- Guerra MS. 1986.** Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genética* **9**: 741-743.
- Köppen W. 1948. Climatologia: com un estudio de los climas de la tiera. Trad. P. R. Hendrichs Pérez.** Fondo de cultura Econômica, México, DF, 152-182.
- Leitch AR, Schwarzacher T, Jackson D, Litch IJ. 1994.** In situ hibridization: a practical guide. Oxford, BIOS Scientific, 118p.
- Lopes RC. 2003.** Herreriaceae Endlicher: revisão taxonômica dos gêneros neotropicais *Herreria* Ruiz & Pavon e *Clara* Kunth. Rio De Janeiro: UFRJ/MN. 213p. Tese (Doutorado em Botânica).
- Lopes RC, Andreatta RHP. 2003.** *Clara* Kunth (Herreriaceae): novo posicionamento taxonômico para o gênero. *Bradea* **IX**: 17-20.
- Ohri D. 1998.** Genome size variation and plant systematics. *Annals of Botany* **82**: 75-83.
- Peckolt O. 1936.** Sobre a planta productora da Japecanga. *Revista da Flora Medicinal*, **2**(9): 513-518.
- Planchais S, Glab N, Inzé D, Bergounioux C. 2000.** Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBBS Letters* **476**:78-83.

- Rasband W. 1998.** NIH Image is a public domain program developed at the U.S. National Institute of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>.
- Rodrigues VEG, Carvalho DA. 2001.** Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 180p.
- Satô D. 1935.** Analysis of the karyotypes in *Yucca*, *Agave* and the related genera with special reference to the phylogenetic significance. *The Japanese Journal of Genetics* **XI**: 272-278.
- Satô D. 1942.** Karyotype analysis in Liliaceae and allied families. *Japanese Journal of Botany* **12**: 57-161.
- Vilhar B, Greilhuber J, Koce JD, Tensch EM, Dermastia M. 2001.** Plant genome size measurement with DNA image cytometry. *Annals of Botany* **87**: 719-728.
- Yanpaisan W, King NJC, Doran PM. 1999.** Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing. *Biotechnology Advances* **17**: 3-27.

CAPÍTULO III

Propagação *in vitro* de *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae)

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer protocolo de propagação *in vitro* de *Herreria salsaparilha* Martius via proliferação axilar de gemas. Inicialmente, segmentos nodais do 4º e 5º nós, do ápice para a base caulinar, de ramos jovens de plantas, em fase de crescimento vegetativo, foram desinfestados e inoculados em meio básico MS suplementado com 30 g l⁻¹ de sacarose, 100 mg l⁻¹ de inositol, complexo vitamínico e 5 g l⁻¹ de ágar (Merck). Os subcultivos foram realizados utilizando meio básico MS nas mesmas condições citadas acima com o acréscimo de 1,0 mg l⁻¹ de BAP e 2,8 mg l⁻¹ de Phytigel®. Nos experimentos de multiplicação as condições de cultivo testadas, em tubos de ensaio e em frascos, foram: meio semi-sólido com 5 g l⁻¹ de ágar (Merck) ou 2,8 g l⁻¹ de Phytigel®, meio líquido estacionário com e sem suporte e meio líquido sob agitação orbital (100 rpm). Em tubos de ensaio foram utilizadas as concentrações de 0, 0,5 1,0, 1,5, 2,0 mg l⁻¹ de BAP e em frascos apenas a concentração de 1,0 mg l⁻¹ de BAP. O meio básico MS semi-sólido meia força com ágar (Merck), em tubos, foi testado com sucesso no enraizamento das brotações. Cinquenta brotações enraizadas foram aclimatadas e transferidas para vasos de polietileno contendo solo, areia e esterco orgânico, mantidas em telado e irrigadas diariamente. Foram realizadas análises de citometria de fluxo das brotações na fase de multiplicação e dos regenerantes. A anatomia foliar das brotações axilares na fase de enraizamento, na fase de aclimação e cultivadas em telado também foi avaliada. A multiplicação de *H. salsaparilha* em tubos de ensaio contendo meio básico MS semi-sólido com ágar e 1,0 mg l⁻¹ de BAP proporcionou a obtenção de elevado número de brotações. Em frascos contendo meio básico MS líquido o número de brotações axilares foi maior se comparado ao obtido em meio semi-sólido. A análise dos regenerantes por citometria de fluxo confirmou a semelhança do conteúdo de DNA em relação às plantas matrizes. Após quatro meses de cultivo em telado as alterações anatômicas observadas nas brotações axilares cultivadas *in vitro* foram reparadas.

Palavras chaves: *Herreria salsaparilha*, plantas medicinais, micropropagação, gemas axilares, agentes gelificantes, meio líquido, anatomia.

INTRODUÇÃO

Herreria salsaparilha Martius (Herreriaceae) é uma trepadeira, conhecida vulgarmente como salsaparrilha, mandioquinha, japecanga, salsa do mato, salsa gerdas, salsa caroba e cipó salsa, que ocorre no Brasil nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e no Distrito Federal (Lopes, 2003). Suas raízes são utilizadas na medicina popular desde a época do descobrimento com finalidade depurativa, anti-sifilítica, sudorífera e estimulante (Peckolt, 1936; Rodrigues e Carvalho, 2001).

Em razão da crescente valorização comercial dos metabólitos secundários de plantas, as pesquisas têm se direcionado no sentido de produzir em grande escala, e de maneira mais uniforme, as plantas medicinais e, conseqüentemente, seus compostos de interesse medicinal, farmacêutico, aromático e alimentício. Nesse sentido, é crescente o número de trabalhos na área de cultura de tecidos objetivando a micropropagação de plantas medicinais e, ou, a produção de compostos secundários (Rout et al., 2000).

Tendo em vista a presença de saponinas esteroidais em *H. montevidensis* Klotzsch (Cecy e Yassumoto, 1972), planta encontrada no sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina (Basualdo et al., 1995) e em *Smilax officinalis* Kunth (Bernardo et al., 1996), planta nativa do Brasil, muito próxima taxonomicamente das Herreriaceae (Dahlgren e Clifford, 1982), é provável que em *H. salsaparilha* essa classe de compostos secundários também esteja presente. Segundo Peckolt e Peckolt (1888), as espécies de *Smilax* importantes na medicina popular são utilizadas, semelhante a *H. salsaparilha*, como diuréticas, emenagogas ou ant-isifilíticas. Por esse motivo, as espécies de *Herreria* e de *Smilax* são conhecidas popularmente como salsaparilha ou japecanga (Cunha, 1941; Lorenzi, 2002).

A micropropagação de plantas medicinais tem sido realizada principalmente via proliferação de ápices caulinares e gemas axilares, processo vantajoso uma vez que plantas obtidas são, em geral, geneticamente idênticas à planta original (Rout et al., 2000) e entre os fatores que podem influenciar esse processo estão: o tipo e a concentração de auxina e citocinina utilizadas (Andrade et al., 1999; Atta-Alla e Staden, 1997) e as condições de cultivo, incluindo o tipo e concentração do agente gelificante (Ebrahim e Ibrahim, 2000; Nestaková et al., 2000; Podwyszynska e Olszewski, 1995).

Monocotiledôneas como *Yucca alaiifolia* L. e *Agave parrasana* Berger – Agavaceae têm sido micropropagadas com sucesso (Atta-Alla e Staden, 1997,

Santacruz-Ruvalcaba et al., 1999). Entretanto, a forma mais comum de propagação de *H. salsaparilha* é a estaquia e, desta maneira, os estudos relacionados à propagação *in vitro* podem facilitar seu cultivo, difusão e comercialização.

No presente trabalho objetivou-se estabelecer protocolo de propagação *in vitro* de *Herreria salsaparilha* Martius via proliferação de gemas axilares.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das plantas

As plantas de *Herreria salsaparilha* Martius foram obtidas de estacas a partir de planta matriz procedente de Teixeira/MG, altitude 649 metros (lat. 20°45'20" S long. 42°52'40" W). O clima na região de Teixeira é o do tipo tropical de altitude (Cwb segundo classificação de Köppen), com verões quentes e temperatura no mês mais quente inferior a 22°C (Köppen, 1948). As estacas com aproximadamente 15 cm de altura e com duas gemas foram colocadas em leito de enraizamento contendo areia lavada, mantidas em local parcialmente sombreado e irrigadas diariamente. Após enraizamento, as estacas foram transplantadas para vasos de polietileno com capacidade de 6 L contendo a mistura de solo, esterco e areia na proporção de 3:1:1. As plantas foram mantidas em telado coberto do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, MG, onde receberam tratos culturais e foram irrigadas periodicamente.

Os materiais testemunha foram preparados segundo as normas usuais de herborização e depositados no Herbário VIC do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, sob numeração específica (25.825). A identificação da espécie foi confirmada por especialista da família, Profa. Dra. Rosana Conrado Lopes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Ilha do Fundão), RJ/Brasil.

Coleta do material, desinfestação e estabelecimento da cultura *in vitro*

Foram coletadas, como material inicial, segmentos nodais do 4° e 5° nós, do ápice para a base caulinar, de ramos jovens das plantas de *H. salsaparilha* em fase de crescimento vegetativo.

O material coletado foi inicialmente lavado em água corrente e posteriormente desinfestado com hipoclorito de cálcio (200 mg l⁻¹ de cloro ativo) e Tween 20 a 0,1% (v/v) por 15 minutos. Subseqüentemente procedeu-se enxaguadura em água deionizada e autoclavada, por quatro vezes consecutivas.

Os explantes nodais foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 ml de meio básico MS (Murashige e Skoog, 1962) com 30 g l⁻¹ de sacarose, 100 mg l⁻¹ de inositol e complexo vitamínico (0,2 g l⁻¹ de glicina, 0,05 g l⁻¹ de ácido nicotínico, 0,05 g

l^{-1} de piridoxina e $0,01\text{ g } l^{-1}$ de tiamina) e $5\text{ g } l^{-1}$ de ágar (Merck), como agente gelificante. O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$. As culturas foram mantidas sob irradiância de $35\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h (duas lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil) e temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{ C}$.

Os subcultivos foram realizados utilizando meio básico MS nas mesmas condições citadas acima com o acréscimo de $1,0\text{ mg } l^{-1}$ BAP (6-benzilaminopurina) e $2,8\text{ mg } l^{-1}$ de Phytigel[®] como agente gelificante.

Multiplicação das brotações axilares

Os experimentos de multiplicação foram realizados em tubos de ensaio e em frascos de vidro, utilizando brotações axilares do 6^o subcultivo.

Experimento em tubos de ensaio

Nos experimentos realizados em tubos, foram testadas as seguintes condições de cultivo: meio básico MS semi-sólido com $5\text{ g } l^{-1}$ de ágar (Merck) e $2,8\text{ g } l^{-1}$ de Phytigel[®] como agentes gelificantes, meio básico MS líquido na condição estacionária com suporte de algodão, meio básico MS líquido na condição estacionária sem suporte e meio básico MS líquido sob agitação orbital (100 rpm). O meio básico MS foi, em todas as condições, suplementado com $30\text{ g } l^{-1}$ de sacarose, $100\text{ mg } l^{-1}$ de inositol, complexo vitamínico ($0,2\text{ g } l^{-1}$ de glicina, $0,05\text{ g } l^{-1}$ de ácido nicotínico, $0,05\text{ g } l^{-1}$ de piridoxina e $0,01\text{ g } l^{-1}$ de tiamina). Em todos os tratamentos foram utilizadas as concentrações de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 $\text{mg } l^{-1}$ de BAP. O pH dos meios foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$. As culturas foram mantidas sob irradiância de $35\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h (duas lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osram, Brasil) e temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{ C}$. Foram utilizados 15 ml de meio por tubo.

As características analisadas foram: número e altura (cm) das brotações axilares por explante, número e comprimento (cm) das raízes adventícias por explante. As avaliações foram realizadas em períodos diferenciados tendo em vista o desenvolvimento desincronizado das brotações axilares entre as diferentes condições de cultivo.

Objetivando otimizar o processo de enraizamento das brotações utilizou-se meio básico MS e meio básico MS modificado (meia força), contendo a metade da concentração de macro e micronutrientes. As características analisadas foram: número e

comprimento (cm) das raízes por explante. A avaliação foi realizada após 45 dias de cultivo.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com vinte repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por uma brotação axilar/tubo.

Experimento em frascos

A concentração de BAP mais eficaz na multiplicação das brotações axilares de *H. salsaparilha* em tubos de ensaio foi testada em frascos de vidro (200 ml de capacidade) vedados com tampas de poliestireno, nas mesmas condições de cultivo do item anterior, à exceção do meio líquido estacionário com suporte (meio semi-sólido com ágar ou Phytigel[®], meio líquido sob agitação e meio líquido estacionário sem suporte, sob irradiância de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{C}$). Foram utilizados 45 ml de meio por frasco.

As características analisadas, após 30 dias de cultivo, foram: número e altura (cm) de brotações axilares por explante. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com dez repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por duas brotações/frasco.

Aclimação e morfologia dos regenerantes

Cinquenta brotações, mantidas por 45 dias em tubos de ensaio contendo meio básico semi-sólido MS meia força, tendo ágar como agente gelificante, na ausência de regulador de crescimento, foram utilizadas no processo de aclimação. Após serem retiradas dos tubos as raízes foram cuidadosamente lavadas em água corrente, para remoção do excesso de meio de cultura. Em seguida, essas brotações foram acondicionadas em copos plásticos contendo água e esses envolvidos por saco plástico. Sob condições ambientais e a cada dois dias, pequenos orifícios foram feitos nos vértices do saco plástico.

Após seis dias, as plantas foram transferidas para copos contendo areia lavada e autoclavada, onde permaneceram por mais quinze dias, e posteriormente para vasos de polietileno contendo solo, areia e esterco orgânico na proporção de 3:1:1. As plantas foram levadas ao telado do Departamento de Fitotecnia da UFV onde foram irrigadas diariamente.

Avaliou-se a produção de massa seca das partes aérea e radicular dos regenerantes no período de pré-aclimatação, dos regenerantes com 15 dias em areia lavada e dos regenerantes com quatro meses de cultivo em telado. Foram utilizadas seis plantas de cada um dos estádios de desenvolvimento.

Com o objetivo de analisar a anatomia das plantas de *H. salsaparilha* propagadas *in vitro*, amostras da região mediana de folhas de plantas no período de pré-aclimatação, com 15 dias em areia lavada e de regenerantes com quatro meses de cultivo em telado, foram utilizadas para a obtenção de cortes a fresco no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV.

Alguns cortes foram corados com Safrablau (por 30 segundos) e outros cortes foram utilizados no teste histoquímico com Sudan IV que é específico para compostos graxos totais (Jensen, 1962). O material foi observado também sob luz polarizada. As observações e a documentação fotográfica foi realizada em microscópio OLYMPUS modelo AX - 70 com sistema U-PHOTO. Foram utilizadas três repetições para cada condição estudada.

Seis plantas nos mesmos períodos citados acima foram utilizadas para avaliar o desenvolvimento do sistema radicular.

Citometria de fluxo

Com objetivo de avaliar a quantidade de DNA nuclear de *H. salsaparilha* cultivada *in vitro*, utilizou-se a técnica de citometria de fluxo (Doležel e Gohde, 1995 com modificações). A determinação do DNA nuclear foi realizada nos regenerantes na fase de pré-aclimatação (em meio básico MS meia força sem adição de BAP e com ágar como agente gelificante) e em brotações axilares cultivadas em meio semi-sólido com ágar e Phytigel® (em tubos) e em meio líquido estacionário sem suporte (em frascos), suplementados com 1 mg l⁻¹ de BAP.

Discos foliares, com 6 mm de diâmetro, e folhas inteiras foram retiradas de regenerantes e das brotações, respectivamente, e transferidos para placas de petri, devidamente identificadas, contendo 1 ml de solução tampão utilizado na extração de núcleos (ácido cítrico 0,1M e Tween 20 a 5%). As amostras foram picotadas com uma lâmina de barbear, filtradas em telas de 30 µm para um tubo Eppendorf. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado, o sedimento

ressuspendido, utilizando Vortex, em 100 µl do tampão utilizado na extração dos núcleos e estocado por 10 minutos a 5° C, no escuro.

As amostras foram submetidas à coloração com DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol) utilizando 1,5 ml de solução contendo: 500 µl de DAPI a 15 µM e Na₂HPO₄.2H₂O 0,4 M. O material foi incubado a temperatura ambiente, no escuro, por 10-15 minutos.

Após a coloração, as amostras foram transferidas para tubos de leitura de um citômetro de fluxo Partec PAS II/III (PARTEC GmbH, Munster, Germany), equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão (HBO) – 100 W e filtros de excitação KG-1, BG-38 e UG-1, este último utilizado para excitação em UV de 200-700 nm. As posições dos picos dos picos G0/G1 e os coeficientes de variação (CV) foram calculados usando o programa FlowMax Partec. Utilizou-se como padrão interno amostras foliares provenientes de plantas matrizes de *H. salsaparilha* cultivadas em telado (15,04 pg) (Capítulo II) e o conteúdo de DNA nuclear foi estimado segundo Doležel (1991). Foram analisados, no mínimo, 10.000 núcleos por amostra. Análises cujos resultados apresentaram CV maior que 3% foram descartadas.

RESULTADOS

Coleta do material, desinfestação e estabelecimento da cultura

A desinfestação com hipoclorito de cálcio reduziu consideravelmente a contaminação por fungos e bactérias nos explantes nodais de *H. salsaparilha* introduzidos *in vitro*. As brotações que surgiram nas gemas axilares de aproximadamente 80% desse material, em média duas por explante, foram aproveitadas no subcultivo seguinte realizado nas mesmas condições utilizadas na introdução dos segmentos nodais.

Multiplicação e enraizamento das brotações axilares

Experimentos em tubos de ensaio

Em meio semi-sólido com ágar e em meio líquido sob agitação o número de brotações, surgidas nas gemas axilares mais basais dos explantes, foi maior nas concentrações de 1,0 e 1,5 mg l⁻¹ de BAP (Tabelas 1 e 2). Em meio semi-sólido com Phytigel[®] e em meio líquido estacionário com suporte, entretanto, o número de brotações não diferiu significativamente entre as concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 mg l⁻¹ de BAP (Tabelas 1 e 2). Em meio líquido estacionário as brotações não foram avaliadas tendo em vista seu aspecto retorcido e impossibilidade de utilização seja para multiplicação, seja para enraizamento.

Em meio contendo Phytigel[®], o tamanho das brotações não diferiu significativamente entre as concentrações de BAP (Tabela 1). Entretanto, em meio semi-sólido com ágar e 0,5, 1,0 e 1,5 mg l⁻¹ de BAP (Tabela 1), em meio líquido sob agitação com 0,5 mg l⁻¹ de BAP e em meio líquido estacionário com suporte com 1,0 e 1,5 mg l⁻¹ de BAP, o tamanho das brotações foi significativamente maior (Tabela 2).

Na ausência de BAP, brotações axilares não se desenvolveram (Tabelas 1 e 2), verificando-se elevada propensão à rizogênese na base dos explantes. O número e o tamanho médio das raízes obtidas em todas as condições de cultivo é mostrado na Figura 1 e o aspecto dessas raízes e das brotações surgidas nos explantes cultivados em meio semi-sólido com ágar e Phytigel[®], na presença ou ausência de BAP, é mostrado na Figura 2.

As avaliações foram realizadas aos 75 dias de cultivo para os explantes cultivadas em meio semi-sólido com ágar e Phytigel[®], aos 30 dias para os cultivados em meio líquido sob agitação e 60 dias de cultivo para os cultivados em meio líquido com suporte.

Entre o meio básico MS e o meio básico MS meia força, ambos contendo ágar como agente gelificante, não houve diferença significativa quando ao número e o tamanho das raízes (Figura 3).

Tabela 1. Efeito de concentrações de BAP e do tipo de agente gelificante na multiplicação de gemas axilares de *Herreria salsaparilha* Martius.

BAP (mg l ⁻¹)	Agente gelificante			
	Phytigel [®]		Ágar	
	Número	Tamanho (cm)	Número	Tamanho (cm)
0,0	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
0,5	3,88 ± 0,60 b	1,30 ± 0,11 b	7,25 ± 1,17 b	1,27 ± 0,10 c
1,0	13,56 ± 1,70 c	1,63 ± 0,13 b	15,00 ± 1,75 c	1,23 ± 0,05 c
1,5	13,19 ± 1,76 c	1,34 ± 0,12 b	12,69 ± 0,99 c	1,14 ± 0,07 bc
2,0	10,13 ± 1,43 c	1,30 ± 0,13 b	8,88 ± 1,06 b	0,85 ± 0,12 b

±. Erro padrão da média.

Médias acompanhadas de mesma letra dentro de uma mesma coluna não diferiram significativamente a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Avaliação realizada aos 75 dias de cultivo.

Tabela 2. Efeito de concentrações de BAP e da condição de cultivo na multiplicação de gemas axilares de *Herreria salsaparilha* Martius.

BAP (mg l ⁻¹)	Meio líquido			
	Sob agitação ¹		Estacionário com suporte ²	
	Número	Tamanho (cm)	Número	Tamanho (cm)
0,0	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
0,5	5,25 ± 0,27 b	1,82 ± 0,10 c	1,88 ± 0,38 b	0,94 ± 0,13 bc
1,0	7,94 ± 0,41 d	1,73 ± 0,09 b	5,50 ± 0,56 c	1,50 ± 0,05 d
1,5	6,88 ± 0,46 cd	1,47 ± 0,08 b	4,94 ± 0,46 c	1,30 ± 0,07 cd
2,0	6,50 ± 0,29 bc	1,47 ± 0,08 b	3,63 ± 0,45 c	0,68 ± 0,17 b

±. Erro padrão da média. nc tratamento não avaliado

Médias acompanhadas de mesma dentro de uma mesma coluna não diferiram significativamente a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

¹Avaliação realizada após 30 dias de cultivo.

²Avaliação realizada após 60 dias de cultivo.

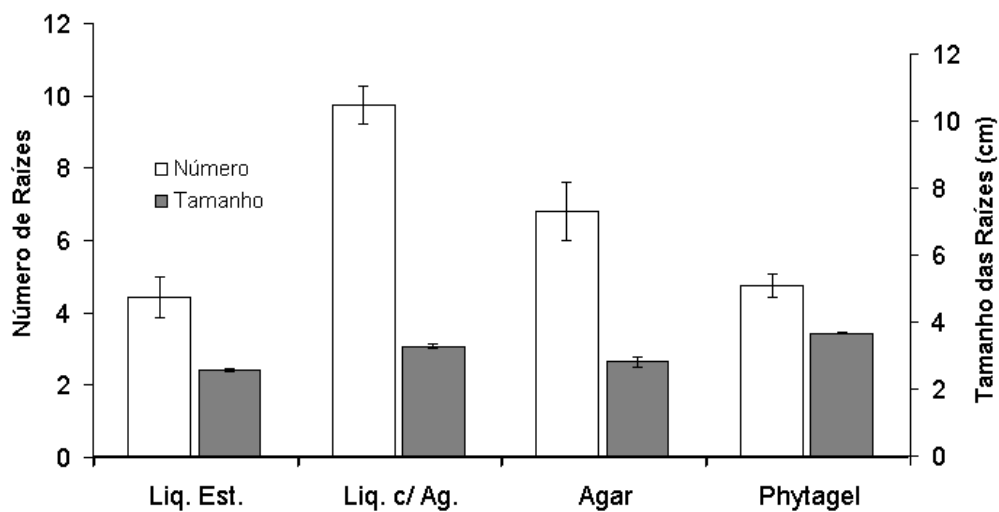


Figura 1. Enraizamento de brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius em meio básico MS líquido na condição estacionária (Liq. Est.), em meio básico MS líquido sob agitação de 100 rpm (Liq. c/Ag.), em meio básico MS semi-sólido com ágar - Merck (Agar) e com Phytigel® (Phytigel).

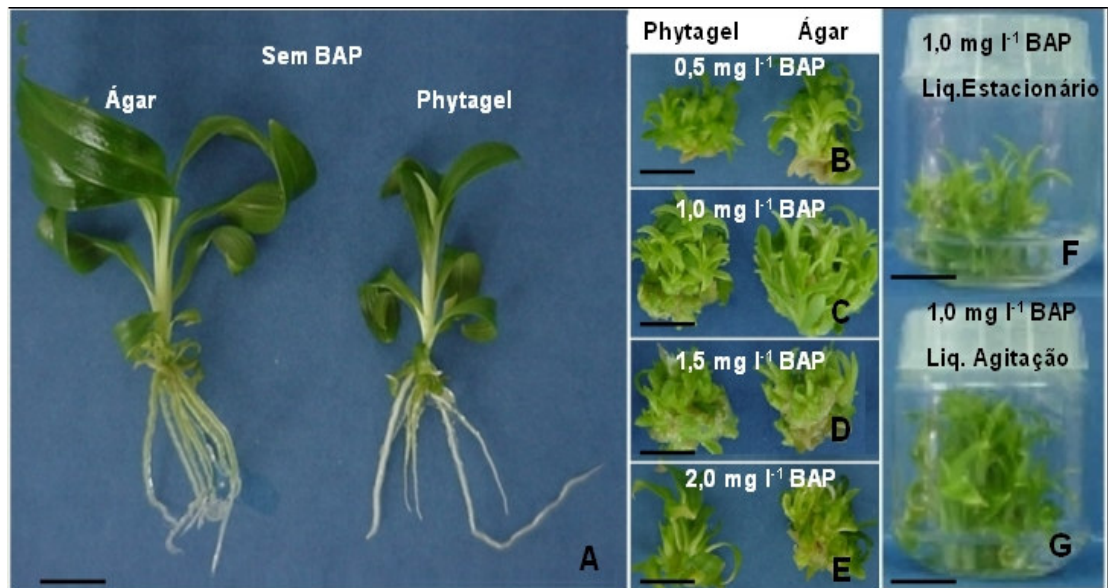


Figura 2. Aspecto das brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius cultivadas em: (A-E) tubos de ensaio; (F-G) frascos de vidro, aos 75 e 30 dias de cultivo, respectivamente. A-E barra = 3 cm; F-G barra = 2 cm.

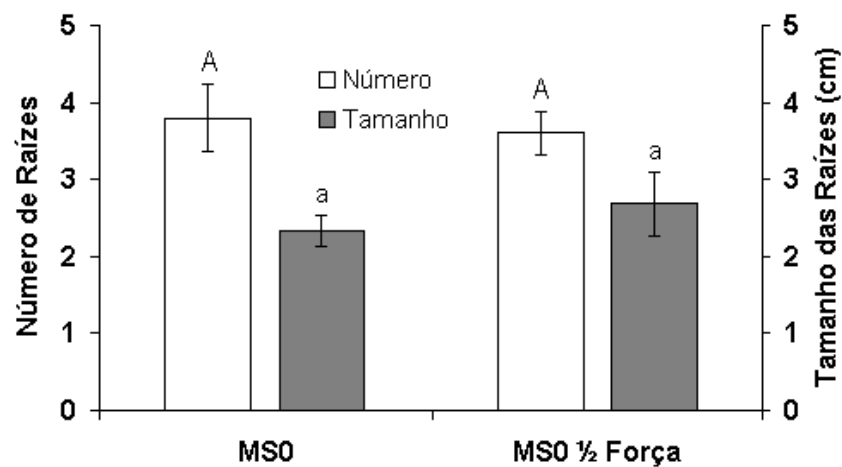


Figura 3. Efeito da concentração de sais no enraizamento de brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius após 45 dias de cultivo em meio básico MS (MSO) e meio básico MS meia força (MSO 1/2 força). Médias acompanhadas de mesma letra não diferiram a 5% de probabilidade pelo teste de F.

Experimento em frascos

O número de brotações obtidas a partir dos explantes cultivados em meio líquido sob agitação e em meio líquido estacionário foi significativamente maior (Tabela 3), não tendo havido desenvolvimento de brotações nos explantes cultivados em meio com ágar e Phytigel[®] ao final de 30 dias (Tabela 3). O número de brotações foi significativamente maior em meio líquido sob agitação se comparado ao obtido em meio líquido estacionário (Tabela 3). Entretanto, é importante ressaltar que o tamanho médio das brotações obtidas em meio líquido, seja sob agitação ou estacionário, permite facilmente a manipulação das brotações, seja com finalidade de multiplicação ou enraizamento.

Tabela 3. Efeito do tipo de agente gelificante e da condição de cultivo na multiplicação de gemas axilares de *Herreria salsaparilha* Martius, após 30 dias de cultivo.

Condição de cultivo	Brotações axilares	
	Número	Tamanho (cm)
Líquido sob agitação	8,73 ± 0,58 a	2,72 ± 0,15 a
Líquido estacionário	8,45 ± 0,45 a	2,03 ± 0,08 b
Phytigel [®]	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 c
Ágar	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 c

±. Erro padrão da média.

Médias acompanhadas de mesma letra em uma mesma coluna não diferiram significativamente a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Aclimação e morfologia dos regenerantes

As brotações foram removidas do meio de cultura sem causar, aparentemente, danos às raízes e as plantas aclimatadas tiveram 100% de sobrevivência no telado, mantendo as características fenotípicas das plantas originais.

A matéria seca da parte aérea e da parte radicular dos regenerantes é mostrada na Tabela 5.

Tabela 5. Massa seca dos regenerantes de *Herreria salsaparilha* Martius em diferentes estádios de desenvolvimento.

Estádios de desenvolvimento	Massa seca (g)	
	Parte aérea	Parte radicular
Pré-aclimatação ¹	0,054 ± 0,012	0,015 ± 0,002
Aclimação ²	0,149 ± 0,02	0,077 ± 0,019
Cultivo em telado ³	4,931 ± 0,93	2,612 ± 0,65

±. Erro padrão da média.

¹ 45 dias de cultivo em MS zero meia força.

² 15 dias de aclimação em areia lavada.

³ 4 meses de cultivo em telado.

As folhas dos regenerantes de *H. salsaparilha* na fase de pré-aclimatação apresentam, se comparadas às folhas das plantas matrizes cultivadas no telado (Capítulo I), algumas das características anatômicas modificadas : cutícula delgada em ambas as faces (Figura 5A), parênquima clorofiliano formado por 4-5 camadas de células, com reduzida quantidade de espaços intercelulares, ausência de fibras associadas aos feixes vasculares (Figuras B).

Com quinze dias em areia lavada a cutícula ainda é delgada (Figura 5C) e as fibras ainda estão ausentes (Figura 5D). Entretanto, a organização do parênquima clorofiliano já é semelhante ao observado nas folhas das plantas matrizes (homogêneo tendendo a dorsiventral) (Figura D). Com 4 meses de cultivo em telado a anatomia foliar das plantas provenientes do cultivo *in vitro* é semelhante a organização anatômica das plantas matrizes: cutícula espessa em ambas as faces da epiderme (Figura 5E), mesofilo homogênero tendendo a dorsiventral (com as células do parênquima clorofiliano, voltadas para a superfície adaxial mais compactadas) e feixes vasculares apresentando 3-4 camadas de fibras nos pólos (Figura F).

Apesar das alterações anatômicas observadas nos estádios de pré-aclimatação e de aclimação, as raízes adventícias (provenientes dos segmentos nodais) nesses estádios são vigorosas, com os pêlos radiculares conspícuos (Figura G-H) e as brotações possuem elevadas concentrações de clorofilas a e b e fotossíntese líquida positiva (dados não mostrados). O aspecto desenvolvido das raízes presentes nas plantas com quatro meses de cultivo é mostrado na Figura 5H.

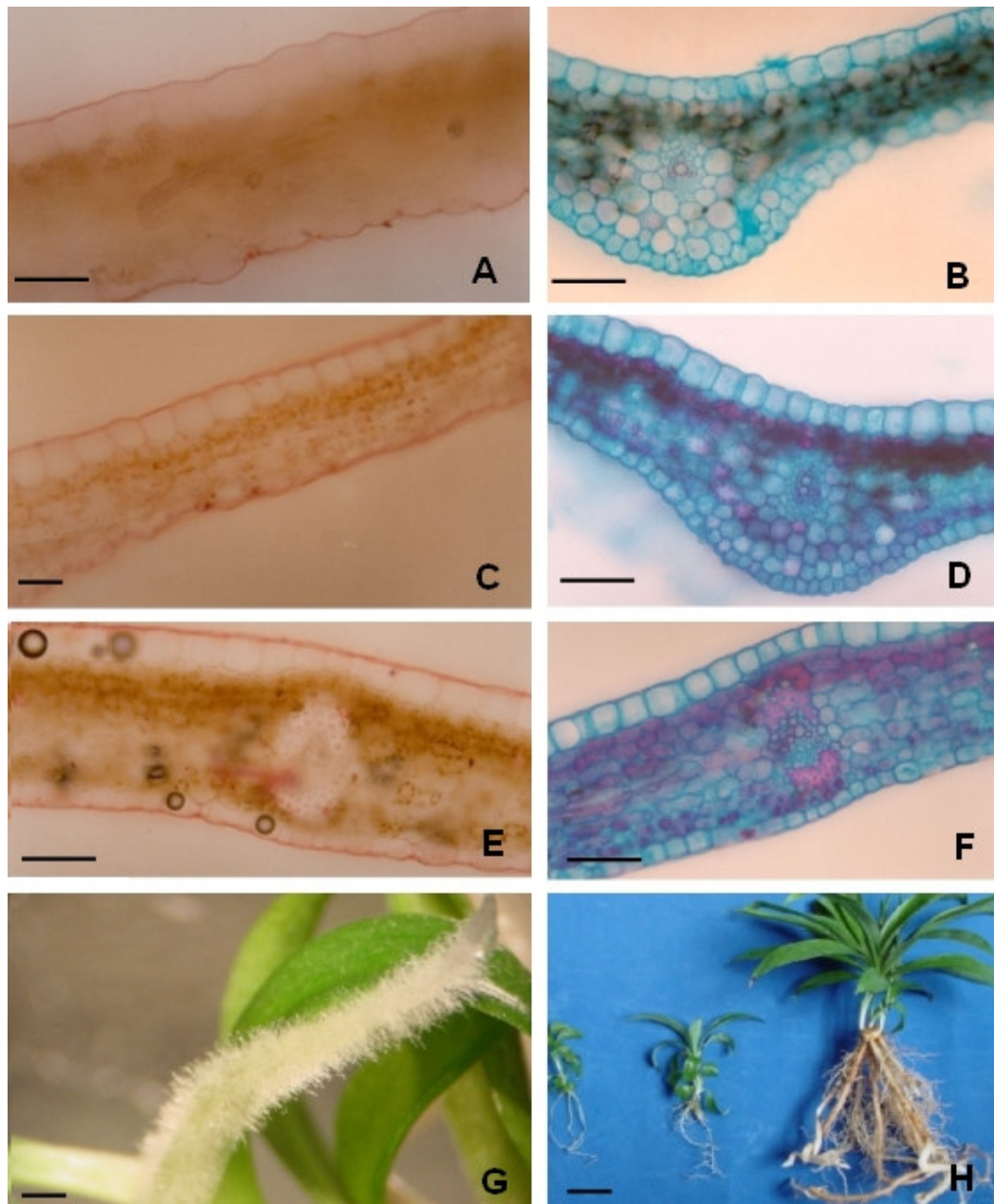


Figura 5. Anatomia foliar e morfologia das raízes das brotações e dos regenerantes de *Herreria salsaparilha* Martius. (A-F) Região mediana da folha em corte transversal no: período de pré-aclimatação (A-B), com 15 dias de aclimação (C-D) e com 4 meses de cultivo em telado (E-F). Reação com Sudan IV (A, C e E). Coloração com Safranblau (B, D e F). Barras = 100 μ m. (G) Detalhe da raiz adventícia surgida na base da brotação. Barra = 0,5 cm. (H) Sistema radicular de *H. salsaparilha* nos mesmos estádios citados acima. Barra = 2 cm.

Citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo gerou histogramas de excelente resolução (Figura 4) e com coeficientes de variação (CV) inferiores a 3% (Tabela 4). Os histogramas gerados a partir dos regenerantes e das brotações são semelhantes e apresentaram apenas um pico GO/G1 localizado no canal 100 (Figura 4). Esses resultados indicam que todas os núcleos analisados possuem aproximadamente 15,04 pg de DNA (conteúdo de DNA nuclear do padrão interno *H. salsaparilha* matriz).

Tabela 4. Razão entre a quantidade de DNA da amostra e do padrão interno (expresso em Index) e coeficientes de variação (CV) da planta matriz, dos regenerantes e das brotações de *Herreria salsaparilha* Martius analisados por citometria de fluxo.

Amostras	Canal (leitura)	Index	CV (%)
PM	100	1	1,97
PM+R5	100	1	2,25
PM+R13+R9	100	1	1,76
PM+R7	100	1	2,13

PM: planta matriz, mantida em telado e utilizada como fonte de explante no estabelecimento da cultura *in vitro*.

R5: regenerante cultivado em meio básico MS meia força, sem adição de BAP, utilizando ágar, em tubos

R13 e R9: brotações axilares cultivadas em meio semi-sólido utilizando ágar e Phytigel[®], suplementado com 1 mg l⁻¹ de BAP, em tubos

R7: brotações axilares cultivadas em meio líquido estacionário sem suporte, suplementado com 1 mg l⁻¹ de BAP, em frascos

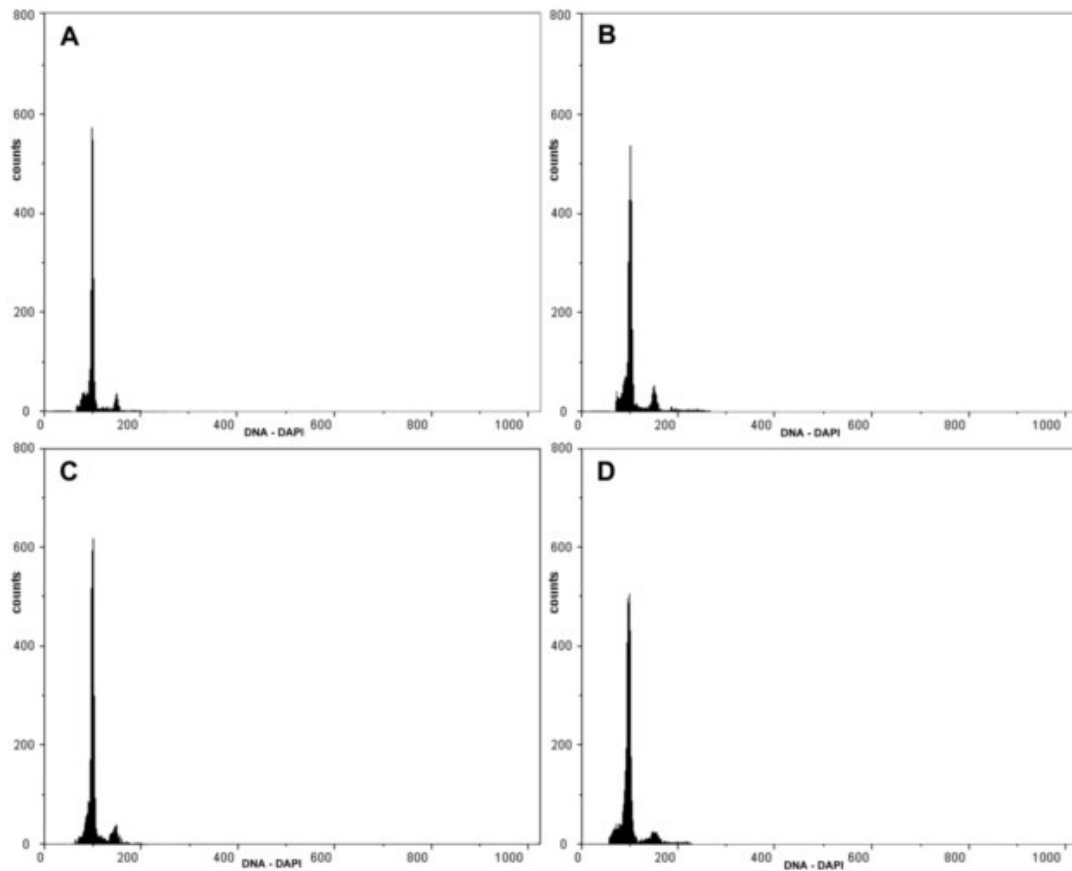


Figura 4. Histogramas das quantidades de DNA nuclear (pg) presentes nas plantas matrizes, nas brotações axilares e nos regenerantes de *Herreria salsaparilha* Martius. (A) Histograma gerado a partir da análise dos núcleos extraídos da planta matriz, utilizada como padrão interno ($2C=15,04$ pg DNA nuclear). (B) Histograma gerado utilizando núcleos de regenerantes + núcleos do padrão interno. (C) Histograma gerado utilizando dos núcleos extraídos de brotações axilares cultivadas em meio MS suplementado com 1 mg l^{-1} de BAP, solidificado com ágar e com Phytigel[®], em tubos. + padrão interno. (D) Histograma gerado utilizando núcleos extraídos das brotações axilares cultivadas em meio MS líquido estacionário sem suporte suplementado com 1 mg l^{-1} de BAP, em frascos + padrão interno. Nos histogramas B, C e D apenas um pico G1/G0 foi gerado, não discriminando diferença no conteúdo de DNA nuclear da amostra de interesse e do padrão interno (planta matriz).

DISCUSSÃO

Em todas as condições de cultivo testadas, a utilização do BAP foi essencial para o surgimento e desenvolvimento de brotações axilares em *H. salsaparilha*. Em meio semi-sólido com Phytigel® e em meio líquido estacionário com suporte, o número de brotações aumentou significativamente nas concentrações de 1,0, 1,5 e 2,0 mg l⁻¹ de BAP, se comparado ao número obtido em 0,5 mg l⁻¹ de BAP. Entretanto, em meio semi-sólido com ágar a concentração de 2 mg l⁻¹ de BAP, se comparada as concentrações de 1,0 e 1,5 mg l⁻¹, prejudicou a proliferação das gemas axilares.

Vários reguladores de crescimento têm sido utilizados, separadamente ou em associação, na proliferação de gemas axilares: BAP, AIB, Cinetina, ANA, TDZ. Andrade et al. (1999) avaliaram o efeito do BAP, da Cinetina, do TDZ e do 2iP na proliferação de brotações axilares de *Lavandula vera* DC e concluíram que os meios suplementados com 1,0 mg l⁻¹ de BAP ou TDZ foram os mais efetivos na promoção do desenvolvimento das brotações. Entretanto, neste mesmo trabalho, os autores indicam a utilização do BAP, por ser mais viável economicamente que o TDZ. Em *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. o número de brotações axilares aumentou com o aumento da concentração de BAP, utilizado isoladamente ou em associação com AIB. Entretanto, a melhor resposta foi obtida utilizando BAP associado a AIB (Juliani et al., 1999). Em *Santolia canescens* Lagasca, as brotações axilares, semelhante à *H. salsaparilha*, não se desenvolveram na ausência de BAP. A proliferação de brotações axilares foi elevada com 1,33, 2,2 e 4,4 µM dessa citocinina. Entretanto, o desenvolvimento dessas brotações foi menor com 2,2 e 4,4 µM, indicando, neste caso, o efeito deletério do BAP (Casado et al., 2002).

Em tubos de ensaio, o tempo necessário na obtenção das brotações axilares de *H. salsaparilha* foi diferente entre as condições de cultivo utilizadas. Em meio semi-sólido e em meio líquido com suporte, brotações com tamanhos adequados ao subcultivo (1,0 -2,0 cm) só foram obtidas aos 75 e 60 dias de cultivo, respectivamente. Em meio líquido sob agitação e na condição estacionária as brotações se alongaram mais rapidamente proporcionando a avaliação aos 30 dias de cultivo. Em frascos, onde foi utilizado meio básico MS suplementado com 1,0 mg l⁻¹ de BAP, os agentes gelificantes dificultaram a o processo de proliferação e desenvolvimento das gemas axilares. Após trinta dias de cultivo havia brotações somente nos explantes cultivados em meio líquido, seja em agitação ou na condição estacionária. Esses resultados

indicam que as condições químicas e físicas utilizadas do meio de cultivo têm influência no desenvolvimento das gemas axilares em *H. salsaparilha*.

As condições físicas do meio de cultivo podem disponibilizar de maneira diferenciada os nutrientes e os reguladores de crescimento e desta maneira influenciar os processos morfogênicos *in vitro* (multiplicação de gemas axilares, organogênese e embriogênese somática) (Grattapaglia e Machado, 1998). Segundo Debergh (1983), a ausência de agentes gelificantes permite melhor contato entre o explante e o meio, aumentando, desta maneira, o acesso ao regulador de crescimento e a habilidade de absorção dos nutrientes. Em *Ananas comosus* L., o número de brotações obtidas via gema axilar em meio básico MS líquido sob agitação de 90-100 rpm e suplementado com sacarose, ANA, AIB e Cinetina foi muito maior que o número obtido em meio sólido nas mesmas condições, 10,17 e 64,58 respectivamente (Soneji et al., 2002). Em *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana, o número e o comprimento das brotações, o número de folhas, a viabilidade e o vigor das mesmas foram maiores em meio líquido se comparado com os resultados obtidos em meio semi-sólido utilizando ágar e, ou, gelrite como agentes gelificantes (Ebrahim e Ibrahim, 2000). O meio líquido com 0,5 μM de Cinetina também foi considerado melhor na propagação *in vitro* de *Isoplexis canariensis* (L.) G. Don (Arrebola et al., 1997).

O tipo e a qualidade do agente gelificante também pode influenciar a disponibilidade dos compostos presentes no meio de cultura e, conseqüentemente, os processos morfogênicos *in vitro* (Grattapaglia e Machado, 1998; Scholten e Pierik 1998a e b). A presença de canamicina no meio utilizado na cultura *in vitro* de *Linum usitatissimum* L., por exemplo, foi menor em meio com Phytigel[®] se comparado com o meio gelificado com ágar (Laine et al., 2000).

Os regenerantes de *H. salsaparilha* no ambiente *in vitro* e no ambiente *ex vitro* apresentam características anatômicas diferenciadas. As folhas dos regenerantes no período de pré-aclimatação e aclimatação apresentam a epiderme foliar com cutícula delgada e parênquima clorofiliano reduzido. Entretanto, as raízes adventícias são vigorosas, com os pêlos radiculares presentes em toda sua extensão. No estágio de pré-aclimatação ocorrem ainda elevadas concentrações de clorofilas e a ocorrência de fotossintética líquida positiva (dados não mostrados), indicando que o aparato fotossintético deve estar apto ao seu total funcionamento.

Com quatro meses de cultivo em telado a organização anatômica das folhas é muito parecida com a organização encontrada nas folhas das plantas matrizes (dados

não mostrados) indicando assim que a folha das brotações de *H. salsaparilha* cultivadas *in vitro* responde, com sucesso, às modificações ambientais impostas pela condição *ex vitro*.

O ambiente *ex vitro* da casa de vegetação ou do campo, se comparado ao ambiente *in vitro*, apresenta baixa umidade relativa do ar, níveis mais elevados de irradiância e condição não asséptica (Sciutti e Morini, 1995). Nesse contexto, rápidas alterações anatômicas e fisiológicas da planta durante a transição do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* são importantes para sua sobrevivência (Pospíšilová et al., 1999). Entretanto, algumas espécies não são capazes de restaurar rapidamente, as modificações impostas pela condição *in vitro* e desta maneira requerem mais tempo para se adaptar ao ambiente *ex vitro* ou ainda de pré-tratamentos. Kadlecěk et al. (2001) verificaram que plantas de *Nicotiana tabacum* L. se desenvolveram melhor no ambiente *ex vitro* quando ainda no ambiente *in vitro* foram cultivadas em condição fotomixotrófica sob elevada irradiância.

A análise de citometria de fluxo mostrou que a propagação de *H. salsaparilha* mediante a proliferação de gemas axilares, resultou em regenerantes com a mesma quantidade de DNA nuclear que ocorre nas plantas matrizes. A técnica de citometria de fluxo tem sido usada com várias finalidades, dentre elas, a caracterização de regenerantes obtidos na propagação *in vitro* (Lim et al., 1997; Thiem e Sliwińska, 2003).

A propagação *in vitro* de *H. salsaparilha* via proliferação de gemas axilares não alterou a quantidade de DNA nuclear dos regenerantes, promovendo rápida multiplicação da espécie com elevado número de brotações axilares e facilidade de aclimação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade LB, Echeverrigaray S, Fracaro F, Pauletti GF & Rota L (1999) The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 79-83.
- Arrebola ML, Socorro O & Verpoorte R (1997) Micropropagation of *Isoplexis canariensis* (L.) G. Don. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: 117-119.
- Atta-Alla H & Staden JV (1997) Micropropagation and establishment of *Yucca alaiifolia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48: 209-212.
- Basualdo I, Zardini EM & Ortiz M (1995) Medicinal plants of Paraguay: underground organs. II. *Economic Botany* 49: 387-394.
- Bernardo RR, Pinto AV & Parente JP (1996) Steroidal saponins from *Smilax officinalis*. *Phytochemistry* 43: 465-469.
- Casado JP, Navarro MC, Utrilla MP, Martínez A & Jiménez J (2002) Micropropagation of *Santolina canescens* Lagasca and in vitro volatiles production by shoot explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 147-153.
- Cecy C & Yassumoto Y (1972) Saponinas esteróides nas raízes de *Herreria montevidensis* Klotzsch - Liliaceae. *Tribuna Farmacêutica* XL(1-2): 52-55.
- Cunha NS (1941) Japecanga ou Salsaparrilha. *Tribuna Farmacêutica*, IX(8): 173-180.
- Dahlgren RMT & Clifford HT (1982). *The monocotyledons: a comparative study*. London: Academic Press. 378p.
- Debergh PC (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiologia Plantarum* 59: 270-276.

- Doležel J (1991). Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis* 2: 143-154.
- Doležel J & Gohde W (1995) Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19: 103-106.
- Ebrahim MKH & Ibrahim IA (2000) Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana. *Scientia Horticulturae* 86: 211-221.
- Grattapaglia D & Machado MA (1998) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS, Buso JA (Eds.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ.
- Jensen WA (1962) *Botanical Histochemistry*. San Francisco: H. Freeman and Co. 408 p.
- Juliani HR, Koroch AR, Juliani HR & Trippi VS (1999) Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59: 175-179.
- KadleceK P, Tichá I, Haisel D, Capková V & Shafer C (2001) Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161: 695-701.
- Köppen W (1948) *Climatologia: com un estudio de los climas de la tierra*. Trad. P. R. hendrichs Pérez. Fondo de cultura Econômica, México, DF, 152-182.
- Laine E, Lamblin F, Lacoux J, Dupre P, Roger D, Sihachakr D & David A (2000) Gelling agent influences the detrimental effect of kanamycin on adventitious budding in flax. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 77-80.
- Lim HT, Lee HS, Eriksson T (1997) Regeneration of *Panax ginseng* C.A. Meyer by organogenesis and nuclear DNA analysis of regenerants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: 179-187.

- Lopes RC (2003). *Herreriaceae* Endlicher: revisão taxonômica dos gêneros neotropicais *Herreria* Ruiz & Pavon e *Clara* Kunth. Rio De Janeiro: UFRJ/MN. 213p. Tese (Doutorado em Botânica).
- Lorenzi H & Matos FJA (2002) Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. São Paulo: Instituto Plantarum. 512p.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nestáková, M, Havrlentová M & Faragó J (2000) Effect of gelling agents on *in vitro* multiplication of two ornamental plants. *Biologia, Bratislava* 55: 409-411.
- Peckolt O (1936) Sobre a planta productora da Japocanga. *Revista da Flora Medicinal*, 2(9): 513-518.
- Peckolt T, Peckolt G (1888) História das plantas medicinaes e uteis do Brazil. Rio de Janeiro: Typographia Laemmert & C. p.98-115.
- Podwyszynska M & Olszewski T (1995). Influence of gelling agents on shoot multiplication and the uptake of macroelements by *in vitro* culture of rose, cordyline and homolomena. *Scientia Horticulturae* 64: 77-84.
- Pospíšilová J, Tichá I, Kadlec P, Haisel D & Plzáková S (1999) Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Physiologia Plantarum* 42: 481-497.
- Rodrigues VEG & Carvalho DA (2001) Plantas medicinais no domínio dos cerrados. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 180 p.
- Rout G R, Samantaray S & Das P (2000) *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* 18: 91-120.

- Santacruz-Ruvalcaba F, Gutiérrez-Pulido H & Rodríguez-Garay B (1999) Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 163-167.
- Scholten HJ & Pierik RLM (1998a) Agar as a gelling agent: differential biological effects *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 77: 109-116.
- Scholten HJ & Pierik RLM (1998b) Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. *Plant Cell Reports* 17: 230-235.
- Sciutti R & Morini S (1995) Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 70: 221-228.
- Soneji JR, Rao PS & Mhatre M (2002) Somaclonal variation in micropropagated dormant axillary buds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 77: 28-32.
- Thiem B, Sliwińska E (2003) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures. *Plant Science* 164: 129-134.
-

CAPÍTULO IV

Influência do tipo de vedação no ambiente interno de frascos na cultura *in vitro* de *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae)

RESUMO

O presente trabalho avaliou a influência do tipo de vedação na composição gasosa do ambiente interno de frascos utilizados na cultura *in vitro* de brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius e no desenvolvimento dessas brotações. Foram utilizadas brotações axilares, com aproximadamente 1,5 cm de altura, em frascos de vidro (200 ml de capacidade), contendo 45 ml de meio básico MS suplementado com 30 g l⁻¹ de sacarose, 100 mg l⁻¹ de inositol, complexo vitamínico e 5 g l⁻¹ de ágar (Merck), na ausência de reguladores de crescimento. Os frascos foram vedados com tampa rígida de polipropileno (T), tampa rígida de polipropileno com filtro (TF), uma e duas camada de filme do tipo policloreto de vinila (PVC1 e PVC2, respectivamente). O experimento foi mantido à temperatura de 26°C ± 1, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de 35 μmol m⁻² s⁻¹. Frascos contendo apenas o meio de cultura foram mantidos nas mesmas condições e utilizados como controle. Ao final de 60 dias avaliou-se: perda de água do sistema, concentração de O₂ (%) no ambiente interno dos frascos, altura das plantas (cm), massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular, número e comprimento das raízes (cm). Com auxílio de um analisador de gás infravermelho, em “sistema aberto”, determinou-se, também, as taxas respiratória e fotossintética de *H. salsaparilha* durante o desenvolvimento *in vitro* das brotações. Os processos de evaporação e evapotranspiração, nos frascos sem e com brotações, respectivamente, foram significativamente influenciados pelo tipo de vedação, sendo superiores nos frascos vedados com TF. A concentração de O₂ nos frascos com brotações, se comparada ao ambiente externo, permaneceu praticamente inalterada nos frascos sem brotações e nos frascos com brotações vedados com TF e T. Nos frascos com brotações vedados com PVC a concentração de O₂ aumentou significativamente ocasionando discreto estufamento do PVC. Apesar desse acúmulo de oxigênio, o desenvolvimento das brotações não foi prejudicado.

Palavras chave: *Herreria salsaparilha*, Herreriaceae, fotossíntese e respiração *in vitro*, cultura de tecidos, concentração de oxigênio, trocas gasosas.

INTRODUÇÃO

Os principais objetivos da propagação *in vitro* incluem a produção de grande número de plantas geneticamente idênticas, livres de patógenos, com características fisiológicas e anatômicas semelhantes à planta de origem, que podem ser aclimatadas em curto período de tempo e por baixo custo. O estabelecimento de protocolos apropriados assim como o controle do microambiente gerado durante o processo de cultura de tecidos *in vitro* é essencial para alcançar esses objetivos (Aitken-Christie et al., 1995).

O ambiente *in vitro* é caracterizado pela elevada umidade relativa, temperatura constante, baixa densidade de fótons fotossinteticamente ativos, grande flutuação na concentração de CO₂, alta concentração de açúcar, sais e reguladores de crescimento no meio e ausência de microrganismos (Aitken-Christie et al., 1995). Essas condições particulares conduzem, geralmente, à baixa taxa de transpiração e fotossíntese, dificuldade de absorção de água e nutrientes, elevada taxa de respiração no período escuro e, conseqüentemente, baixa taxa de crescimento dos explantes (Kozai et al., 1997a). O controle do microambiente pode, entretanto, promover o crescimento e desenvolvimento, reduzir desordens morfológicas e fisiológicas, melhorar o processo de aclimação das plantas (Jeong et al., 1995) e reduzir os custos do processo (Kozai et al., 1997a).

Os recipientes utilizados na cultura de tecidos delimitam o ambiente *in vitro* do ambiente *ex vitro*. Entretanto, o tipo de vedação pode, através das trocas gasosas, permitir que o ambiente aéreo dos recipientes seja influenciado pelo ambiente externo, através das trocas gasosas. Desta maneira, o controle do ambiente externo pode controlar indiretamente o interno (Jeong et al., 1995).

Vários são os tipos de vedação utilizados no fechamento dos recipientes na cultura de tecidos: filmes de poliuretano (Cournac et al., 1991), tampas de silicone, chumaços de algodão e filmes de polipropileno (Zobayed, 2000; Zobayed et al., 2000b) e tampas de metal (Infante et al., 1989). Os filmes permeáveis a gases como o poliuretano e o polipropileno têm se mostrado bastante vantajosos, favorecendo o processo fotossintético das plantas *in vitro* e, muitas vezes, facilitando o processo de aclimação (Cournac et al., 1991; Zobayed, 2000).

Apesar de ainda não relatada na literatura, a propagação *in vitro* de *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) via proliferação axilar tem sido realizada (Capítulo III). Tendo em vista a facilidade de sua multiplicação e de seu desenvolvimento *in vitro*, aliado ao interesse de contribuir nos estudos relativos a dinâmica dos sistemas utilizados na cultura de tecidos vegetais, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do tipo de vedação na composição gasosa do ambiente interno de frascos utilizados na fase de alongamento e enraizamento *in vitro* de brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius e o desenvolvimento dessas brotações nas mesmas condições.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Brotações axilares, com aproximadamente 1,5 cm de altura, foram obtidas do 6º subcultivo da cultura estoque *Herreria salsaparilha* Martius após 75 dias no meio utilizado no estágio de proliferação e desenvolvimento das gemas axilares: meio básico MS (Murashige e Skoog, 1962) semi-sólido suplementado com 30 g l⁻¹ de sacarose, 100 mg l⁻¹ de inositol, complexo vitamínico (0,2 g l⁻¹ de glicina, 0,05 g l⁻¹ de ácido nicotínico, 0,05 g l⁻¹ de piridoxina clorídrica e 0,01 g l⁻¹ de tiamina clorídrica) e 5 g l⁻¹ de ágar (Merck) como agente gelificante e com 1 mg l⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina).

A cultura estoque permaneceu sob irradiância de 35 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 h (duas lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osran, Brasil) e temperatura de 26 ± 2° C.

Tipos de vedação, composição gasosa e desenvolvimento das brotações

As brotações axilares (três/frasco) foram transferidas para frascos de vidro (200 ml de capacidade) contendo 45 ml de meio básico MS semi-sólido suplementado com 30 g l⁻¹ de sacarose, 100 mg l⁻¹ de inositol, complexo vitamínico (0,2 g l⁻¹ de glicina, 0,05 g l⁻¹ de ácido nicotínico, 0,05 g l⁻¹ de piridoxina clorídrica e 0,01 g l⁻¹ de tiamina clorídrica) e 5 g l⁻¹ de ágar (Merck). O pH do meio foi ajustado em 5,7 ± 0,1.

Os frascos foram vedados com tampa rígida de polipropileno (T), tampa rígida de polipropileno com filtro (TF), uma e duas camada de filme de policloreto de vinila, PVC1 e PVC2 respectivamente (Figura 1A). As culturas foram mantidas sob irradiância de 35 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 h (duas lâmpadas fluorescentes, Luz do Dia Especial, 20 W, Osran, Brasil) e temperatura de 26 ± 2° C. Frascos contendo apenas o meio de cultura foram mantidos nas mesmas condições e utilizados como controle.

Ao final de 60 dias foram realizadas as seguintes avaliações: perda de água do sistema, concentração de O₂ (%) no ambiente interno dos frascos, altura das plantas (cm), massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular, número e comprimento (cm) das raízes. Nos frascos com brotações a perda de água foi também avaliada semanalmente.

A perda de água (em porcentagem) foi determinada considerando o processo de evapotranspiração ou somente o de evaporação dos sistemas, nos frascos com e sem brotações, respectivamente. Foram realizadas pesagens em balança analítica e, posteriormente, a massa do frasco e da vedação foram desconsideradas. Os frascos com brotações foram avaliados semanalmente e os frascos sem brotações somente ao final de sessenta dias.

A concentração de oxigênio (%) no interior dos frascos foi determinada, pelo analisador de oxigênio modelo HS 750 (MOCON), com auxílio de uma seringa e de septos de silicone adaptados em todos os tipos de vedação. As medições foram realizadas utilizando amostras de 5 ml do ambiente interno dos frascos e do ar ambiente como controle.

O delineamento experimental foi o Inteiramente Casualizado (DIC) com dez repetições por tratamento e, quando pertinente, foi analisado em esquema de parcela subdividida, tendo como parcela a presença e a ausência de brotações e na subparcela os tipos de vedação.

Taxas respiratória e fotossintética

No intuito de auxiliar o entendimento dos resultados, a taxa respiratória (R_t) e a taxa fotossintética (A) de *H. salsaparilha*, durante a fase de alongamento e enraizamento *in vitro*, foram determinadas utilizando o sistema ilustrado na Figura 1B. Neste sistema, seis placas de Petri, sem as tampas, contendo 25-30 ml de meio e quinze brotações/placa foram mantidas em uma caixa de vidro com 30 cm de comprimento, 20 cm de largura e 10 cm de altura acoplada a um analisador de gás infravermelho (IRGA, modelo LCA 2), em “sistema aberto”. O ar atmosférico era bombeado para o interior da caixa passando por um orifício localizado em uma de suas extremidades e saía em direção ao IRGA através de dois outros, localizados na outra extremidade. As placas foram organizadas dentro da caixa sobre uma malha de metal e abaixo desta malha foi acoplado um pequeno ventilador. O sistema foi mantido a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$, sob fotoperíodo de 16 h e irradiância de $35\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O fluxo de ar utilizado foi de 250 ml por minuto. As leituras (em μmol de CO_2 mol de ar) foram realizadas semanalmente durante 63 dias. O balanço de CO_2 foi estimado pela diferença entre R_t no período escuro de 8 h e A no fotoperíodo de 16 h.

Paralelamente, o ganho de massa fresca das brotações foi acompanhado em tubos de ensaio contendo 15 ml do mesmo meio de cultura.

Utilizou-se o delineamento experimental Inteiramente Casualizado e os dados foram analisados por regressão linear utilizando-se o programa Statistica 5.1.

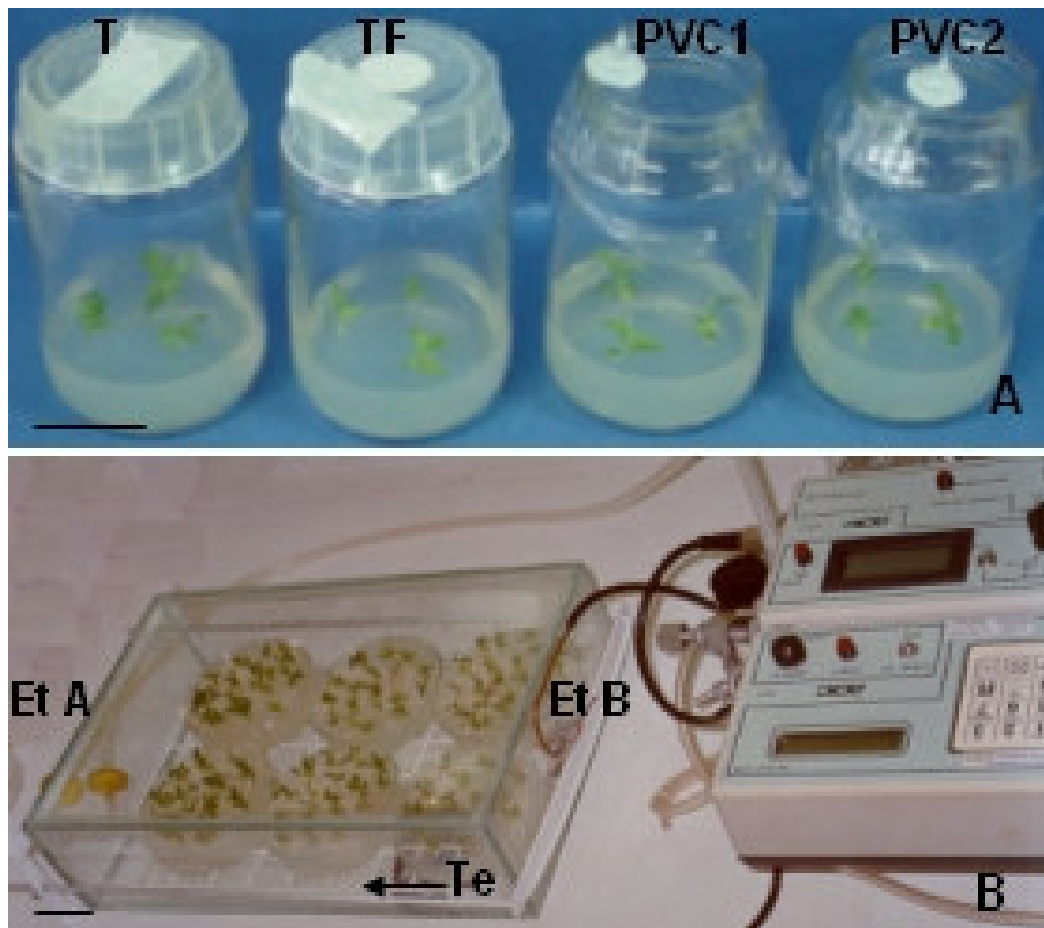


Figura 1. (A) Aspecto das brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius em frascos vedados com tampa rígida de poliestireno (T), tampa rígida de polipropileno com filtro (TF), uma e duas camada de filme do tipo policloreto de vinila (PVC1 e PVC2, respectivamente), no início do experimento. (B) Sistema utilizado na determinação das taxas respiratória e fotossintética. Et A=extremidade de entrada do ar atmosférico. Et B=extremidade de saída do ar em direção ao IRGA. Te=tela de metal de apoio das placas de Petri. Barras=3 cm.

RESULTADOS

Tipos de vedação, composição gasosa e desenvolvimento das brotações

Considerando apenas os frascos com brotações, observou-se progressiva perda de água do sistema (evapotranspiração) em todos os tipos de vedação utilizados. Entretanto, nos frascos vedados com TF a perda de água foi maior, chegando a aproximadamente 65% no final de sessenta dias (Figura 2). Com a vedação do tipo PVC1 a perda de água atingiu 18% e nos demais tipos de vedação, tampa de poliestireno (T) e PVC duas camadas (PVC2), atingiu valores próximos a 15% (Figura 2).

A perda de água entre os frascos com e sem brotações utilizando vedações do tipo TF e T, não diferiu significativamente ao final de 60 dias. Entretanto, nos sistemas vedados com PVC1 e PVC2 a perda de água foi significativamente maior na presença de brotações (Figura 3).

A concentração de oxigênio (%) no ambiente interno dos frascos sem brotações e nos frascos com brotações vedados com T e TF não diferiu significativamente da concentração encontrada no ambiente externo (21%) (Figura 4). Entretanto, a presença de brotações nos frascos vedados com PVC1 e PVC2 elevou a concentração de oxigênio para 22,5 e 23,8%, respectivamente (Figura 4). Ao final de 60 dias observou-se discreto estufamento do filme de PVC. O aspecto das brotações, do meio de cultura e do filme de PVC ao final de 60 dias é mostrado na Figura 5.

A altura das plantas e a produção de massa seca da parte aérea e das raízes não diferiram significativamente entre os tipos de vedação (Tabelas 1 e 2). O número médio de raízes adventícias, surgidas na base das brotações, foi maior nas plantas cultivadas em frascos vedados com TF (Tabela 2). Entretanto, a massa fresca da parte aérea, a taxa de crescimento, o tamanho médio e o tamanho total de raízes foram significativamente menores nesse mesmo tratamento (Tabelas 1 e 2). O tamanho total e a matéria fresca das raízes foram menores nas plantas cultivadas em frascos vedados com TF e T (Tabela 2).

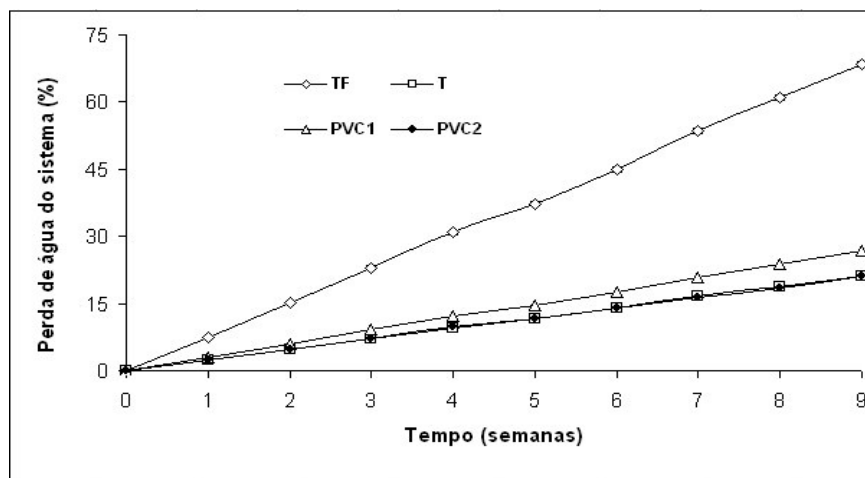


Figura 2. Influência do tipo de vedação na evapotranspiração do sistema durante o estágio de alongamento e enraizamento *in vitro* das brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius, durante 60 dias de cultivo. (TF) tampa rígida de polipropileno com filtro, (T) tampa rígida de polipropileno, (PVC1 e PVC2) uma e duas camada de filme de policloreto de vinila, respectivamente.

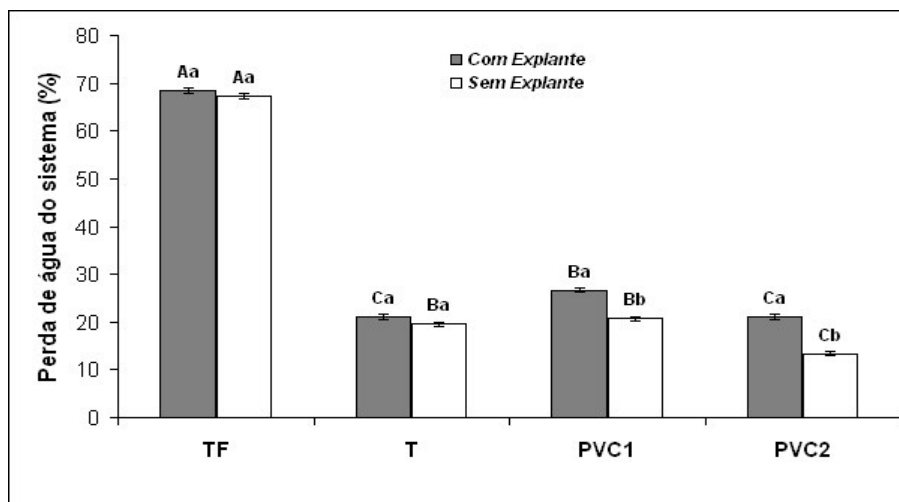


Figura 3. Influência do tipo de vedação na evaporação (frascos sem brotações) e na evapotranspiração (frascos com brotações) dos sistemas após 60 dias de cultivo *in vitro* de *Herreria salsaparilha* Martius em meio de enraizamento e alongamento. (TF) tampa rígida de polipropileno com filtro, (T) tampa rígida de polipropileno, (PVC1 e PVC2) uma e duas camada de filme de policloreto de vinila, respectivamente. As letras maiúsculas e minúsculas estão comparando as médias entre os frascos com e sem explantes, respectivamente. Médias acompanhadas de mesma letra não diferiram a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

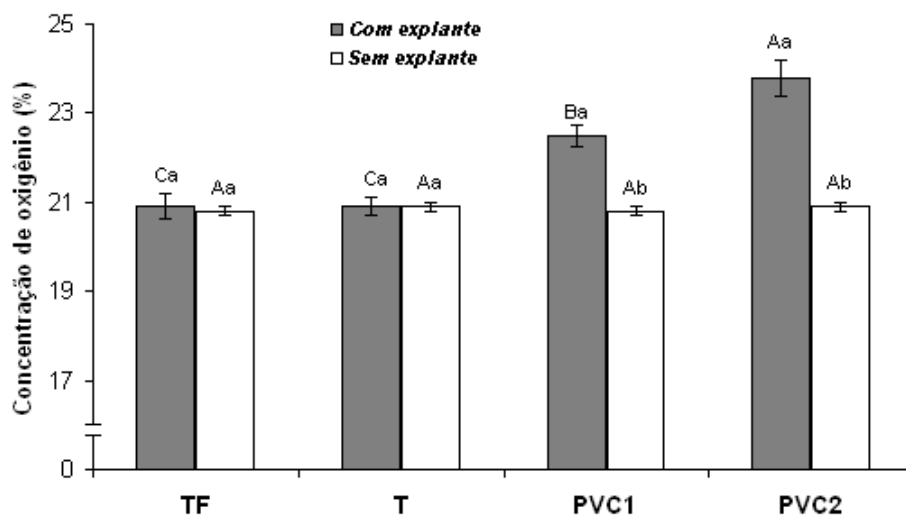


Figura 4. Influência do tipo de vedação na concentração de oxigênio dentro dos frascos com e sem brotações durante o processo de alongamento e enraizamento *in vitro* das brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius, no final de 63 dias de cultivo no sistema caixa de vidro/IRGA. (TF) tampa rígida de polipropileno com filtro, (T) tampa rígida de polipropileno, (PVC1 e PVC2) uma e duas camada de filme de policloreto de vinila, respectivamente. As letras maiúsculas e minúsculas estão comparando as médias entre os frascos com e sem explantes, respectivamente. Médias acompanhadas de mesma letra não diferiram a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

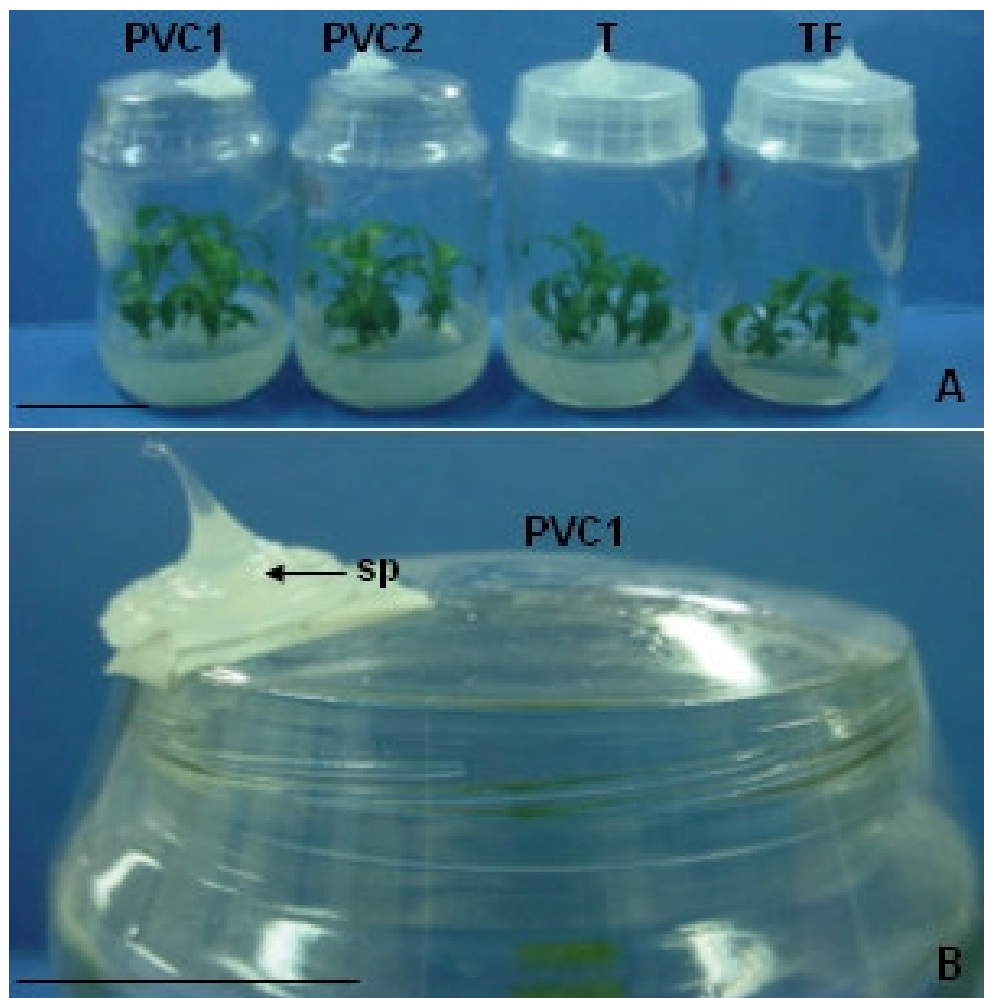


Figura 5. (A) Aspecto das brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius em frascos vedados com uma e duas camadas de filme do tipo policloreto de vinila (PVC1 e PVC2, respectivamente), tampa rígida de poliestireno (T) e tampa rígida de polipropileno com filtro (TF), ao final dos 60 dias do experimento. (B) Detalhe do estufamento ocasionado no filme PVC pelo acúmulo de oxigênio no interior dos frascos vedados com esse tipo de material. sp=septo de silicone. Barras=4 cm.

Tabela 1. Influência do tipo de vedação no desenvolvimento da parte aérea das brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius, após 60 dias de cultivo.

	Altura da planta (cm)	Massa fresca da parte aérea(g)	Taxa de Crescimento (%)	Massa seca da parte aérea (g)
TF	3,77 ± 0,18 a	0,1248 ± 0,0069 a	2,97 ± 0,25 a	0,0831 ± 0,0151 a
T	4,44 ± 0,22 a	0,2079 ± 0,0195 b	4,66 ± 0,39 b	0,0804 ± 0,0109 a
PVC1	3,94 ± 0,19 a	0,1867 ± 0,0169 b	4,34 ± 0,49 b	0,0717 ± 0,0071 a
PVC2	3,93 ± 0,19 a	0,1917 ± 0,0097 b	4,47 ± 0,41 b	0,0740 ± 0,0032 a

± Erro padrão da média.

Médias acompanhadas de mesma letra dentro de uma mesma coluna não diferiram significativamente a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

(TF) tampa rígida de polipropileno com filtro, (T) tampa rígida de polipropileno e uma (PVC1) e duas (PVC2) camadas de filme de policloreto de vinila.

Tabela 2. Influência do tipo de vedação no desenvolvimento da região radicular das brotações axilares *Herreria salsaparilha* Martius. Avaliação realizada após 60 dias de cultivo.

	Número de raízes	Tamanho das raízes (cm)		Sistema radicular	
		Médio	Total	Massa fresca	Massa seca
TF	4,94 ± 0,21 a	2,14 ± 0,12 a	10,71 ± 1,02 a	0,0334 ± 0,0040 a	0,0161 ± 0,0029 a
T	4,08 ± 0,35 b	2,93 ± 0,22 b	11,75 ± 1,19 a	0,0362 ± 0,0055 a	0,0105 ± 0,0014 a
PVC1	4,58 ± 0,38 b	3,48 ± 0,20 b	15,88 ± 1,47 b	0,0611 ± 0,0074 b	0,0146 ± 0,0015 a
PVC2	4,38 ± 0,31 b	3,39 ± 0,43 b	18,43 ± 2,12 b	0,0595 ± 0,0072 b	0,0155 ± 0,0018 a

± Erro padrão da média.

Médias acompanhadas de mesma letra dentro de uma mesma coluna não diferiram significativamente ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

(TF) tampa rígida de polipropileno com filtro, (T) tampa rígida de polipropileno e uma (PVC1) e duas (PVC2) camadas de filme de policloreto de vinila.

Taxas respiratória e fotossintética

A taxa respiratória (R_t) por kg de massa fresca ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ kg}^{-1}\text{s}^{-1}$), nos primeiros dias do experimento, foi muito maior que a taxa fotossintética (A) e se manteve relativamente constante durante os sessenta dias do experimento. Entretanto, A aumentou com o tempo, atingindo valores mais elevados a partir da sexta semana (Figura 6).

Considerando três explantes por frasco ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ 3Exp. s}^{-1}$), R_t também foi mais alta que A nos primeiros dias do experimento (Figura 7). Contudo, com o desenvolvimento das brotações, R_t e A aumentaram rapidamente e, da mesma maneira, A atingiu valores maiores que R_t a partir da sexta semana. (Figura 7).

O balanço de CO_2 no início do experimento foi positivo (Figura 8), indicando que o processo fotossintético estava ocorrendo, ainda que precariamente, e a quantidade de CO_2 produzida no processo respiratório foi muito maior que a quantidade gasta no processo fotossintético. A partir do sétimo dia esse comportamento modificou-se e, como a produção de CO_2 pelo processo respiratório foi menor que o consumo, o balanço atinge valores negativos (Figura 8).

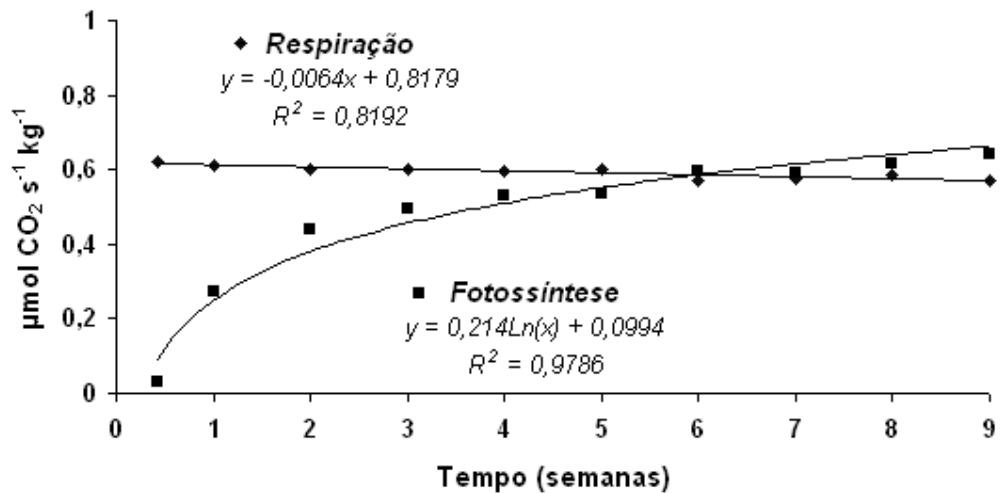


Figura 6. Taxa respiratória e taxa fotossintética por kg de massa fresca ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ kg}^{-1}$) durante o desenvolvimento das brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius, determinadas no escuro e sob irradiância de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de fótons, respectivamente.

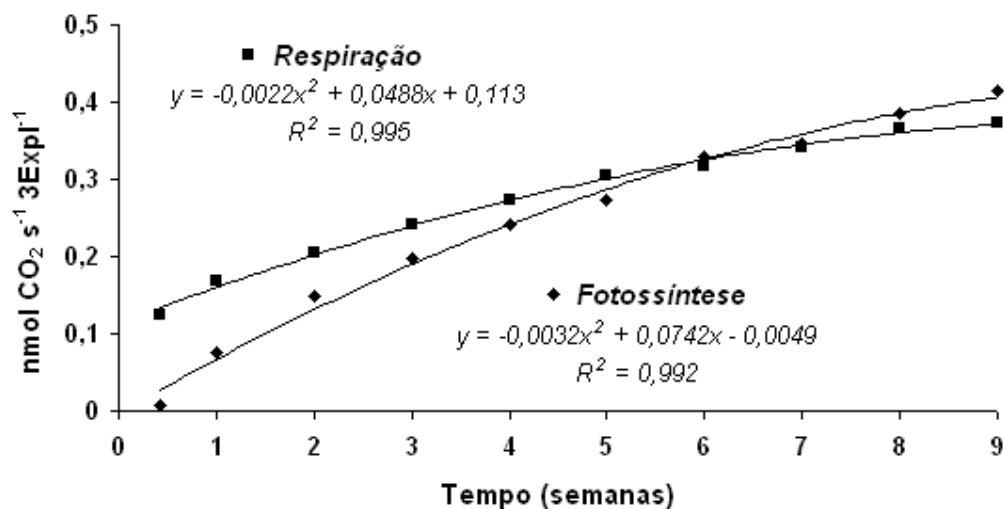


Figura 7. Taxa respiratória e taxa fotossintética por explante ($\text{nmol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ 3Expl}^{-1}$), durante o desenvolvimento das brotações axilares de *Herreria salsaparilha* Martius, determinada no escuro e sob irradiância de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de fótons, respectivamente.

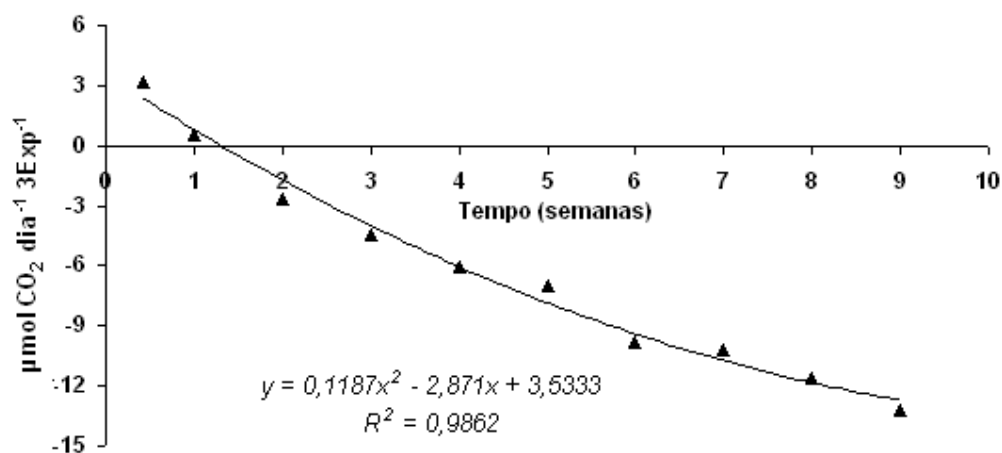


Figura 8. Balanço de CO_2 , obtido a partir do diferencial entre a produção e o consumo de CO_2 ($\mu\text{mol dia}^{-1} \text{ 3Exp}^{-1}$) de culturas in vitro de *Herreria salsaparilha* Martius, no período de 24 h.

DISCUSSÃO

Os processos de evaporação e evapotranspiração, nos frascos sem e com brotações, respectivamente, foram significativamente influenciados pelo tipo de vedação. Resultados semelhantes foram observados por Picoli et al. (2003) utilizando os mesmos tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Eucalyptus* sp.

Nos frascos vedados com TF a perda de água foi muito maior que nos demais tratamentos e, conseqüentemente, modificou a concentração pré-estabelecida de todos os compostos presentes no meio. Tendo em vista que a sacarose e os macronutrientes determinam o potencial osmótico do meio (George, 1993); esse diminuiu no sistema vedado com TF, comprometendo, provavelmente, a absorção de água pela planta.

A umidade relativa do ambiente interno dos frascos não foi efetivamente avaliada. Entretanto, é possível supor que nos frascos vedados com TF, cuja perda de água ocorreu facilmente, a umidade relativa tenha sido menor que nos demais tratamentos. Um indício que suporta essa hipótese foi o fato de que, nos frascos vedados com TF, não houve condensação de água na parede interna dos frascos, o que foi observado nos demais tratamentos. A umidade relativa do ambiente interno dos frascos pode influenciar características anatômicas (Sciutti e Morini, 1995), fisiológicas e morfológicas (Kozai et al., 1997b) do explante. A massa fresca da parte aérea, a taxa de crescimento, o tamanho médio e o tamanho total das raízes das brotações de *H. salsaparilha* que se desenvolveram nos frascos vedados com TF foram menores que nos demais tratamentos. Kozai et al. (1993), cultivando batata *in vitro* por 22 dias sob diferentes umidades relativas, observou que o decréscimo da umidade relativa promoveu diminuição na área foliar, apesar de não influenciar a produção de massa seca. Segundo Jeong et al. (1995), brotações ou plantas cultivadas sob baixas umidades relativas podem desenvolver cutícula e podem não precisar de longo tempo de aclimação *ex vitro*. Segundo os mesmos autores, elevada umidade relativa na atmosfera dos frascos pode reduzir a transpiração e, conseqüentemente, reduz a absorção de alguns nutrientes (Ca e B).

A concentração de O₂ no ambiente interno dos frascos, se comparada ao ambiente externo, permaneceu praticamente inalterada nos frascos vedados com TF e T. Esses resultados se devem, provavelmente, à presença dos frisos, na face interna das tampas, que facilitaram as trocas gasosas. Nos frascos vedados com PVC, entretanto, a

concentração de O₂ aumentou discretamente ocasionando discreto estufamento do filme de PVC. Se considerarmos as taxas respiratória e fotossintética de *H. salsaparilha in vitro*, o balanço de CO₂ e a permeabilidade do PVC ao O₂, se comparada a do CO₂ (80.250 e 15.680 cm³m⁻²dia⁻¹, respectivamente), é possível entender esse resultado. A hipótese mais provável é a de que, após as duas primeiras semanas, a quantidade de O₂ produzido no processo fotossintético não tenha sido totalmente consumida no processo respiratório e, tendo em vista menor permeabilidade do PVC a esse gás, o mesmo foi sendo gradativamente acumulado no interior dos frascos. Esse acúmulo aumentou o volume ocupado por gases no ambiente interno dos frascos promovendo o estufamento do filme. Apesar desse leve acréscimo de oxigênio as brotações de *H. salsaparilha* se desenvolveram normalmente nessa condição.

Picoli et al. (2003) observaram que para a propagação *in vitro* de *Eucalyptus*, semelhante a *H. salsaparilha*, a concentração de oxigênio nos frascos vedados com TF e T praticamente não diferiu da concentração encontrada no ambiente externo. Entretanto, um grande decréscimo ocorreu nos frascos vedados com PVC, ocasionando uma depressão do filme. Segundo esses autores, praticamente todos os explantes estavam contaminados por bactérias e a elevada taxa respiratória ocasionada pelas mesmas promoveu essa queda na concentração de oxigênio. Tendo em vista a permeabilidade do PVC ao O₂, apenas nos sistemas vedados com PVC a concentração desse gás diminuiu.

Alterações na concentração de oxigênio podem influenciar o crescimento das plantas. A redução da concentração para valores muito abaixo de 21% pode aumentar o crescimento da planta *in vivo* (Ku et al., 1977) e *in vitro* (McHale et al., 1987) sem ocorrer inibição do processo respiratório, uma vez que o ponto de saturação pode ser muito baixo para algumas espécies. Segundo Trippi et al. (1988), o ponto de saturação de O₂ da respiração ocorre entre 4-10% de O₂. Por outro lado, o excesso de O₂ pode causar danos.

Estudos têm sugerido que a condição fotoautotrófica *in vitro* é limitada muitas vezes pela baixa concentração de CO₂ nos recipientes durante o fotoperíodo. A estimulação da habilidade fotossintética mediante enriquecimento de CO₂ é utilizada no sentido de suprir essa deficiência (Kozai et al., 1997a; Kubota et al., 1997; Zobayed et al., 2000a; Nguyen et al., 2001). Entretanto, a produção de O₂ em sistemas fechados enriquecidos de CO₂ pode aumentar muito, excedendo a capacidade de consumo pela respiração e isso pode causar sérias alterações no metabolismo da planta, diminuindo a eficiência fotossintética (Righetti et al., 1993).

Em culturas fotossinteticamente ativas crescendo fotomixotroficamente sob regime de luz/escuro em recipientes fechados, ocorre a acumulação de CO₂ no período escuro e este, por sua vez, é consumido durante o fotoperíodo. Entretanto, quando a taxa fotossintética líquida é baixa, pode ocorrer, em longo prazo, acúmulo de CO₂ e diminuição de O₂. (Infante et al., 1989). Por outro lado, se a taxa fotossintética for alta, a concentração de CO₂ pode diminuir abaixo do ponto de compensação no fotoperíodo. Neste caso, o ganho de carbono pela fixação de CO₂ é limitado (Infante et al., 1989; Kozai et al., 1997b).

Considerando que balanço de CO₂ no cultivo *in vitro* de *H. salsaparilha* atingiu valores negativos a partir do sétimo dia é possível sugerir que, se o PVC não permitisse a troca de gases entre o ambiente externo e o interno, a concentração de CO₂ chegaria a 0%, impedindo assim o processo fotossintético. Entretanto, o acúmulo de O₂ no ambiente interno dos frascos vedados com PVC indica que o processo fotossintético não foi anulado. A taxa de permeabilidade do PVC ao CO₂ permitiu o suprimento desse gás, independente do CO₂ produzido no processo respiratório da planta.

O uso de filmes permeáveis a gases para o fechamento de recipientes permite, em alguns casos, aumento da taxa de crescimento de plantas cultivadas *in vitro*, quando comparados a sistemas totalmente fechados. Os sistemas de fechamento dos recipientes utilizados na cultura *in vitro* de *Lagerstroemia speciosa* (totalmente selado com tampa de silicone, fechado com filme de polipropileno, fechado com algodão e com ventilação forçada), influenciaram a concentração de CO₂ no espaço livre do recipiente (durante o fotoperíodo e o período escuro), a umidade relativa e, conseqüentemente, o percentual de sobrevivência das plantas durante o processo de aclimação (Zobayed, 2000). Segundo o mesmo autor, a concentração de CO₂ em recipientes fechados com tampa de silicone ficou, durante o fotoperíodo, muito abaixo se comparada à concentração que atmosférica, o que provavelmente limitou o processo fotossintético. Nos recipientes fechados com filme de polipropileno e com algodão essa diminuição foi menos drástica. A umidade foi de 97%, 98% e 100% nos recipientes fechados com filme de polipropileno, algodão e silicone, respectivamente. O autor atribui as maiores taxas de sobrevivência das plantas cultivadas em recipientes fechados com filme e com algodão a essa diferença de umidade relativa.

Em plantas de *Solanum tuberosum* cultivadas *in vitro* o crescimento foi maior em recipientes vedados com filme de poliuretano se comparado a recipientes vedados, nas mesmas condições, com tampas impermeáveis a gases (Cournac et al., 1991).

No cultivo *in vitro* de *H. salsaparilha*, a vedação com TF facilitou a perda de água do sistema e permitiu que a concentração de oxigênio no ambiente interno dos frascos fosse igual à encontrada no ambiente externo. Utilizando esse tipo de vedação, as condições de cultivo se mantiveram mais semelhantes às condições do ambiente externo, se comparadas aos outros tratamentos.

A utilização de uma camada do filme de PVC permitiu acúmulo de O₂ no interior dos frascos. Esse acúmulo não foi prejudicial ao no estágio de alongamento e enraizamento *in vitro* das brotações axilares e, além disso, indica que as trocas gasosas entre o ambiente interno e o externo foram suficientes para não anular o processo fotossintético das brotações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken-Christie J, Kozai T & Lila-Smith M (Eds.). Automation and environmental control in plant tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. 500p.
- Cournac L, Dimon B, Carrier P, Lohou A & Chagvardieff P (1991) Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply, and CO₂ enrichment. *Plant Physiology* 97: 112-117.
- George EF (1993) Plant Propagation by Tissue Culture. Part. 1 The Technology, 2. ed. Exegetics Ltd., Edington.
- Infante R, Magnanini E & Righetti B (1989) The role light and CO₂ in optimizing the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa in vitro*. *Physiologia Plantarum* 77: 191-195.
- Jeong BR, Fujiwara K & Kozai T (1995) Environmental control and photoautotrophic micropropagation. *Horticultural Review* 17: 123-170.
- Kozai T, Tanaka K, Jeong BR & Fujiwara K (1993) Effect of relative humidity in the culture vessel on the growth and shoot elongation of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro*. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 62(2): 413-417.
- Kozai T, Kubota C & Jeong BR (1997a). Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 51: 49-56.
- Kozai T, Quynh NT & Kubota C (1997b) Environmental control and its effects in transplant production under artificial light. *Journal Korean Society Horticultural Science* 38(2): 194-199.

- Ku SB, Edwards GE & Tanner CB (1977) Effects of light, carbon dioxide, and temperature on photosynthesis, oxygen inhibition of photosynthesis, and transpiration in *Solanum tuberosum*. *Plant Physiology* 59: 868-872.
- Kubota C, Fujiwara K & Kozai T (1997) Recent advances in environment control in micropropagation. In: Kozai T; Kubota C; Chun C (Eds.). *Environmental effects and their control in plant propagation and transplant production*, v. 1 (1996-1999). Japan: Q.T.Nguyen. p. 278-294.
- McHale NA, Zelitch I & Peterson RB (1987) Effects of CO₂ and O₂ on photosynthesis and growth of autotrophic tobacco callus. *Plant Physiology* 84: 1055-1058.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nguyen QT, Kozai T, Heo J & Thai DX (2001) Photoautotrophic growth response of in vitro cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 217-225.
- Picoli EAT, Alfenas AC, Otoni WC, Geraldine RM, Gonçalves LA, Dias LC, Neves DA & Oda S (2003) Alterações do ambiente interno de frascos de cultura *in vitro* de *Eucalyptus*: associações com o tipo de vedação e com as respostas dos explantes. (Submetido)
- Righetti B, Magnanini E & Rossi F (1993) Photosynthetic carbon dioxide uptake and oxygen accumulation during *in vitro* culture of *Actinidia deliciosa* cv *tomuri*. *Environmental and Experimental Botany* 33(4): 523-528.
- Sciutti R & Morini S (1995) Water loss and photosynthesis of plum plantlets is influenced by relative humidity during rooting *in vitro*. *Journal of Horticultural Science* 70(2): 221-228.

Trippi VS, Paulin A & Pradet A (1988) Effect of oxygen concentration on the senescence and energy metabolism of cut carnation flowers. *Physiologia Plantarum* 73: 374-379.

Zobayed SMA (2000) *In vitro* propagation of *Lagerstroemia* spp. from nodal explants and gaseous composition in the culture headspace. *Environmental Control in Biology* 38(1): 1-11.

Zobayed SMA, Afreen-Zobayed F, Kubota C & Kozai T (2000a) Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. *Annals of Botany* 85: 587-592.

Zobayed SMA, Afreen F, Kubota C & Kozai T (2000b). Evolution of culture vessel for micropropagation: from test tube to culture room. In: Kubota C, Chun C (Eds.). *Transplant production in the 21st century*. Kluwer: Netherlands, p. 231-232.

CONCLUSÕES GERAIS

Herreria salsaparilha Martius possui a estrutura anatômica semelhante a maioria das monocotiledôneas e o caráter que talvez possa contribuir na taxonomia do grupo seja a presença e os tipos de cristais.

A caracterização do cariótipo e a quantificação do DNA nuclear de *H. salsaparilha* geraram informações iniciais sobre o gênero e podem também contribuir na taxonomia do grupo.

A propagação *in vitro* de *H. salsaparilha* via proliferação de gemas axilares promovendo rápida multiplicação da espécie com elevado número de brotações axilares e facilidade de aclimação.

O tipo de vedação influencia o ambiente interno de frascos na cultura *in vitro*. Em *H. salsaparilha*, uma camada do filme de PVC permitiu acúmulo de O₂ no interior dos frascos, indicando que as trocas gasosas entre o ambiente interno e o externo foram suficientes para não anular o processo fotossintético das brotações que se desenvolveram normalmente.