

**CITOGENÉTICA DE ACESSOS DE PIMENTA-  
LONGA (*Piper spp.*)**

**JULIANE DORNELLAS NUNES**

**2004**

**JULIANE DORNELLAS NUNES**

**CITOGENÉTICA DE ACESSOS DE PIMENTA-  
LONGA (*Piper spp.*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof<sup>ª</sup>. Dra . Giovana Augusta Torres

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Nunes, Juliane Dornellas

Citogenética de acessos de pimenta longa (*Piper spp.*) / Juliane Dornellas Nunes. -- Lavras : UFLA, 2004.

30 p. : il.

Orientadora: Giovana Augusta Torres.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Cromossomos. 2. Piper. 3. Citogenética. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.84

**JULIANE DORNELLAS NUNES**

**CITOGENÉTICA DE ACESSOS DE PIMENTA-  
LONGA (*Piper spp.*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Lavras como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área  
de concentração em Genética e Melhoramento de  
Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 4 de março de 2004

Profa. Lisete Chamma Davide

Profa. Vânia Helena Techio

Dra. Hélia Alves Mendonça

Giovana Augusta Torres  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004

Aos meus pais, Elio e Francisca,  
e irmãos, Jaqueline e Alexandro,  
por serem o alicerce de minha vida,

**OFEREÇO.**

À querida Profa. Lisete,  
pela inspiração, incentivo e  
ensinamentos,

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva de uma vida com saúde, felicidades e realizações.

Ao meu pai, Elio Corrêa Nunes, pelo apoio, incentivo e exemplo de caráter, honestidade e humildade; à minha mãe, Francisca Dornellas Corrêa Nunes, meu maior exemplo de perseverança, determinação e fé, por todos esforços e amor.

À minha querida irmã Jaqueline e cunhado Rodrigo, pela amizade e carinho e aos meus sobrinhos Rodrigo e Ricardo, pelos momentos de muito amor e imensa alegria.

Ao meus queridos, irmão Alexandro e cunhada Fernanda, pelo apoio, amizade e carinho.

À Universidade Federal de Lavras por todas as oportunidades de aprendizado oferecidas, responsável por toda minha formação.

À FAPEMIG, pelo investimento por meio de concessão de bolsa de estudos.

À Professora Lisete Chamma Davide, uma segunda mãe, por todas as oportunidades concedidas, ensinamentos, orientação e carinho.

À Professora Giovana Augusta Torres, pela amizade, incentivo, ensinamentos e orientação.

À Dra. Hélia Alves Mendonça, pela disponibilização de sementes, por meio da Embrapa Acre e pelas contribuições.

Às queridas amigas: Samantha, Ênali, Paula, Cláudia, Adriene, Rose, Josiane, Flávia e Cristiane pela amizade, companheirismo e momentos de alegria.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética: Lívia, Rose, Cássia, Josiane, Sarah, Patrícia, Juscélio, Ana Hortência e Soraya, pelo ótimo convívio, colaborações para conclusão deste trabalho e amizade.

Ao amigo Sandro, pelas preciosas contribuições para este trabalho, por meio de discussões, conselhos, auxílio e, acima de tudo, pela amizade.

À amiga Vânia, pelos ensinamentos ainda na graduação, pelas contribuições para este trabalho e pela amizade.

Ao estagiário Caio, pela valiosa ajuda na avaliação dos experimentos e constante disposição para os trabalhos.

Aos professores Magno Antônio Patto Ramalho, César Augusto Brasil Pereira Pinto, João Bosco dos Santos, José Eduardo Brasil Pereira Pinto e Samuel Pereira de Carvalho, pelos valiosos momentos de aprendizagem durante o mestrado.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela convivência sempre amigável.

Aos laboratoristas Lamartine, Alzira, Evaldo e Soraya pelo auxílio na realização de etapas deste trabalho.

Ao doutorando Airton, pela importante ajuda na análise estatística dos dados.

Ao Professor César Brasil, pela confecção do abstract.

Aos amigos Wel, José Marcello e Osnil, pelo apoio, carinho e, sobretudo pela amizade.

Ao Gustavo, por seu companheirismo e incentivo.

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram, em especial minha querida Tia Belinha, pelas orações e carinho.

A secretária Elaine, por todos serviços prestados e ser sempre um anjinho da guarda.

A todos aqueles que, de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, concretização de um sonho e finalização de mais uma importante etapa da minha vida.

**MUITO OBRIGADA!!**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMO</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	4
2.1 Descrição botânica e ecológica .....	4
2.2 Importância econômica .....	6
2.3 Descrição citogenética .....	10
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
3.1 Material genético.....	13
3.2 Avaliação citogenética .....	13
3.2.1 Análise cariotípica .....	15
3.3 Avaliação do comprimento total do complemento cromossômico dos acessos ...	16
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	17
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	27



## LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Substâncias inibidoras do fuso mitótico e condições de uso para a obtenção de metáfases em células meristemáticas de radículas de <i>Piper</i> sp. UFLA, Lavras, MG, 2004.....	14
2	Valores médios e média geral, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), das variáveis cromossômicas dos acessos de pimenta-longa ( <i>Piper hispidinervum</i> C.D.C). UFLA. Lavras, MG, 2004.....	19
3	Valores médios e média geral, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), das variáveis cromossômicas dos acessos 203.8 e 207.9 de <i>P. aduncum</i> L. e acesso 5 de <i>P. hispidum</i> S.w. UFLA. Lavras, MG, 2004.....	22
4	Resumo da análise de variância para o comprimento total do lote haplóide (CTLH) entre espécies de <i>Piper</i> e entre acessos dentro de espécie. UFLA, Lavras, MG, 2004.....	23
5	Valores médios para o comprimento total do lote haplóide (CTLH), expresso em micrômetro ( $\mu\text{m}$ ), para os acessos de <i>P. hispidinervum</i> , <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidum</i> e classificação. UFLA, Lavras, MG, 2004.....	23

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Metáfases somáticas com $2n = 24$ cromossomos. A - <i>P. hispidinervum</i> , B - <i>Piper aduncum</i> , C - <i>Piper hispidum</i> . A barra representa $5\mu\text{m}$ .....	18
2	Idiogramas de pimenta longa, sendo A - <i>Piper hispidinervum</i> , B - <i>Piper aduncum</i> e C - <i>Piper hipidum</i> . A barra representa $5\mu\text{m}$ .....	24

## RESUMO

NUNES, Juliane Dornellas. **Citogenética de acessos de pimenta-longa (*Piper spp.*)** Lavras: UFLA, 2004 30p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)\*.

Estudos citogenéticos de espécies nativas, por meio de caracterização numérica e morfológica dos cromossomos, apresentam-se como importante ferramenta para a elucidação de fatos relacionados à classificação taxonômica, processo evolutivo e geração de subsídios para futuros programas de melhoramento genético. As espécies *Piper hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. hispidum*, da Amazônia brasileira, apresentam características, como teor de safrol e presença de substâncias fungicidas e bactericidas de interesse para a indústria química e farmacêutica. Este trabalho teve como objetivo descrever o cariótipo dessas espécies. Foram avaliados cinco acessos de *P. hispidinervum*, dois de *P. aduncum* e um de *P. hispidum*, pertencentes à Coleção de Trabalho da Embrapa Acre. As análises citogenéticas mitóticas foram realizadas por meio do método de esmagamento e coloração com Feulgen ou solução de Giemsa 5%. Obteve-se o número cromossômico  $2n = 24$  para os acessos das três espécies. Para cada um dos acessos foram apresentadas as descrições do complemento cromossômico e idiogramas. O tamanho dos cromossomos foi em torno de 0,98  $\mu\text{m}$  para o maior par e 0,42  $\mu\text{m}$  para o menor par. Por meio dos valores de relação de braços foi possível classificar os cariótipos das três espécies na categoria 4b, segundo a classificação de Stebbins (1958), com a presença de cromossomos metacêntricos. Houve diferença significativa entre o comprimento total do lote haplóide das espécies.

---

\*Comitê Orientador: Giovana Augusta Torres, Lisete Chamma Davide.

## ABSTRACT

NUNES, Juliane Dornellas. **Cytogenetics of long pepper (*Piper spp.*) accesses.** Lavras: UFLA, 2004, 30p. Dissertation (Genetics and Plant Breeding).

Karyotypic analysis of native species is an important tool to elucidate taxonomic classification, evolutionary process and also to contribute to future breeding programs. *Piper hispidinervum*, *Piper aduncum* and *Piper hispidum*, from Brazilian Amazon, present levels of safrole, and anti fungus substances that make them important for chemical and pharmaceutical industries. The purposes of this study were to obtain chromosome numbers of these species and to describe the morphology of their chromosomes. Five accesses of *Piper hispidinervum*, two of *Piper aduncum* and one of *Piper hispidum*, from Work Collection of Embrapa Acre, were evaluated. Mitotic analyses were performed through squashing technique with Feulgen or Giemsa 5% staining. All accesses presented  $2n = 24$  chromosomes. Idiograms and chromosomal descriptions for every access were obtained. Chromosome size was 0.98  $\mu\text{m}$  to the largest pair and 0.42  $\mu\text{m}$  to the shortest pair, all of them showed metacentric morphology. Through the arm length ratio it was possible to classify the karyotypes from all species as 4b category, according to Stebbins (1958). Significant differences for total chromosome length of the haploid set were observed for the three species.

---

\* Guidance Committee: Giovana Augusta Torres, Lisete Chamma Davide.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem regiões com enorme biodiversidade, dentre as quais se destaca a Amazônia brasileira, possuindo uma infinidade de espécies com propriedades medicinais e aromáticas. Dentre estas espécies, a pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) tem se destacado pelo seu potencial para a produção de safrol (fenil éter), presente no óleo essencial, cujo valor comercial no mercado externo oscila entre US\$ 5 a US\$ 8/kg (Wadt, 2001).

Existe uma grande demanda no mundo por heliotropina e por butóxido de piperonila, os dois principais subprodutos derivados do safrol (Rocha & Ming, 1999). Este composto é amplamente utilizado como aromatizante de cervejas e refrigerantes, como agente de fragrâncias em alguns produtos, incluindo ceras, sabões e desinfetantes e, ainda, como ingrediente de inseticidas biodegradáveis à base de piretrium.

Além de *P. hispidinervum* C. DC., a espécie *Piper aduncum* L., também conhecida como jaborandi falso, tem despertado interesse devido à potencialidade do óleo extraído de suas folhas no controle de fitomoléstias de etiologia fúngica (Bastos, 1997) e de doenças humanas causadas por bactérias e fungos (Torres Santos, 1999). *Piper hispidum* L. também possui compostos no extrato de suas folhas que apresentam ação antifúngica (Alecio, 1998). Estas três espécies apresentam grande semelhança morfológica, no entanto, apenas *P. hispidinervum* apresenta alto teor de safrol (87% a 97%), enquanto em *P. aduncum* e *P. hispidum* são encontrados teores de 0,1% a 3,24% e 0,5%, respectivamente (Silva & Oliveira, 2000).

Devido ao uso consagrado do safrol, a pimenta longa é uma espécie muito estudada. Já estão sendo conduzidas pesquisas, especialmente na Embrapa Acre, para a implementação de um sistema de produção sustentável de pimenta- longa, capaz de atender à demanda de mercados nacionais e

internacionais. Uma das ações prioritárias é a ampliação do banco de germoplasma, disponibilizando maior variabilidade genética dentro do gênero *Piper*, tanto para a conservação como para a implantação de programas de melhoramento genético. Para tanto, torna-se necessário um esforço intensivo de coleta e caracterização detalhada de acessos usando características morfológicas, bioquímicas, citológicas e genéticas.

Neste sentido, a análise citogenética tem-se mostrado muito útil para a distinção de espécies e identificação de interações entre genomas, importante para programas de hibridação interespecífica. Apesar de poucas espécies do gênero *Piper* terem sido avaliadas citogeneticamente, já é possível observar uma grande variação no número cromossômico. Esta variação ocorre tanto entre espécies, de  $2n = 24$  em *Piper betle* L. a  $2n = 128$  em *Piper nigrum* L., quanto dentro de algumas espécies, como em *Piper longun* L., em que foram identificados  $2n = 24, 48, 52$  e  $96$  e *Piper nigrum* L., com  $2n = 48, 52, 104$  e  $128$  (Fedorov, 1969).

Em algumas espécies, além do número cromossômico, foram feitas análises morfométricas dos cromossomos. Joseph et al. (1999) observaram a ocorrência de cariótipos simétricos em *Piper colubrinum* Link ( $2n=26$ ) e *Piper magnificum* Trelease ( $2n=26$ ), ocorrendo uma diminuição uniforme no tamanho dos cromossomos. As espécies de *Piper* L. diferem em pequenos detalhes no cariótipo, o que revela a importância de alterações estruturais na especiação.

Essas informações citogenéticas têm sido usadas para o estudo de relações sistemáticas e filogenéticas dentro da família *Piperaceae*. Mathew et al. (1999), em um estudo de 17 espécies de *Piper* ( $x=13$ ) e 8 espécies de *Peperomia* ( $x=11$ ), relataram que o gênero *Piper* se diversificou muito antes que *Peperomia*, durante um longo período evolucionário, no qual mudanças cromossômicas estruturais acarretaram uma marcante diminuição do tamanho de seus cromossomos.

A descrição botânica e citogenética detalhada de um maior número de espécies do gênero *Piper* constitui uma importante ferramenta para a elucidação

de fatos relacionados ao seu processo evolutivo e ainda fornece subsídios para programas de conservação e melhoramento genético. Assim, este trabalho visa à caracterização citogenética de acessos das três espécies, *Piper hispidinervum*, *Piper aduncum* e *Piper hispidum*, da Coleção de Trabalho da Embrapa Acre.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Descrição botânica e ecológica

O gênero *Piper* pertence à família Piperaceae, a qual foi descrita no século XVIII por Linnaeus (Yuncker, citado por Nascimento, 1997). Nesta estão incluídos cerca de doze gêneros, sendo *Piper* e *Peperomia* os principais da flora brasileira (Joly, 1993; Agarez et al., 1994). Embora o número de espécies descritas nessa família seja elevado, há uma variação muito grande na estimativa do número de espécies existentes, sendo estimado de 1.400 a mais de 2.000 espécies, e dentre essas a maior parte se encontra nos gêneros *Piper* e *Peperomia* (Cronquist, 1981).

A família Piperaceae, pelo novo sistema de classificação da APG, está inserida, juntamente com Aristolochiaceae (família do gênero *Aristolochia*, ou papo-de-peru), na ordem basal e primitiva denominada Piperales, não sendo classificada como monocotiledônea, nem como eudicotiledônea (Bremer et al., 1999). Morfoanatomicamente, as plantas destas famílias possuem os feixes de vasos condutores dispersos no caule (Waard, 1980) e é comum a presença de células contendo óleos etéreos (Bremer et al., 1999). As folhas são inteiras, predominando a disposição alterna, com estípulas (muitas vezes se apresentam soldadas simulando uma bainha). O caule é frequentemente articulado, a inflorescência em geral espiciforme (Joly, 1993). As flores são pequenas, sem perianto e ficam agrupadas em espigas densas. Os frutos produzidos são pequenas drupas ou bagas, dispersas frequentemente por morcegos (Bremer et al., 1999). A família Piperaceae é considerada um grupo taxonomicamente confuso devido às diferentes espécies apresentarem muitas características morfológicas similares (Burguer, 1972; Howard, 1973). A família é representada por plantas herbáceas, trepadeiras, arbustos e, raramente, árvores, cuja



distribuição geográfica ocorre entre os trópicos, com poucas espécies extratropicais (Barroso, 1978, citado por Santos et al., 1998).

A espécie *Piper hispidinervum* C.DC. é um arbusto ou arvoreta de 2 a 7m de altura com caule geniculado. Suas folhas são membranáceas ou cartáceas, elípticas, elíptico-ovadas ou elíptico-lanceoladas. As inflorescências são espigas alongadas, com flores minúsculas e frutos obpiramidais (Yunker, 1972).

*Piper hispidinervum* ocorre tipicamente em ambientes abertos com incidência direta de luz, apresentando sementes com baixa longevidade em condições de ambiente natural; em áreas de pastagem, apresenta banco de sementes restrito, com dispersão o ano todo, tendo picos de produção de sementes em janeiro/fevereiro e junho/julho (Almeida, 1999). Dessa forma, *P. hispidinervum* foi considerada uma espécie pioneira antrópica, por colonizar áreas abertas fora da floresta.

*P. hispidinervum* tem se mostrado uma espécie adaptada a locais quentes e úmidos, ocorrendo naturalmente em regiões com elevado índice pluviométrico e clima do tipo Ami e Awi. Em experimentos onde foi testada a exigência hídrica para germinação de sementes, verificou-se que a espécie germina tanto em condições hídricas padrões quanto em ambiente totalmente encharcado (Almeida, 1999).

Dentre as espécies identificadas, denominadas comumente de pimenta- longa, as que mais se assemelham botanicamente são a *P. hispidinervum* e a *Piper aduncum*, porém, apenas a primeira apresenta altos teores de safrol no óleo essencial. A *P. aduncum* é abundante em todo o estado do Acre, bem como pode ser encontrada em outros estados brasileiros.

A diferenciação morfológica entre *P. hispidinervum* e *P. aduncum* concentra-se nas características foliares, a segunda possui folhas elípticas ou lanceoladas com base redonda ou cardulata, ásperas na face adaxial e pubescentes nas faces abaxial e adaxial. As análises dos teores de safrol encontrados no óleo essencial dessas duas espécies de pimenta-longa são de 87% a 97% para *P. hispidinervum*, e

0,10% a 3,24% para *P. aduncum* (Wadt, 2001). Entre *P. hispidinervum* e *P. hispidum* também ocorrem diferenças morfológicas foliares; *P. hispidum* apresenta folhas ovadas, com ápice acuminado e base oblíqua, altamente pubescente na face dorsal (Sousa et al., 2001).

Burguer (1972) relata que a pimenta-longa está entre as espécies mais evoluídas do gênero *Piper*, em seu trabalho sobre as tendências evolutivas das espécies de *Piper* (Piperaceae) na América Central e México. Entre as 150 espécies estudadas, a *Piper sagittifolium* C.DC. foi considerada a representante mais primitiva, com base em alguns caracteres, tais como peças florais grandes, inflorescência em espiga com aproximadamente 1 cm de espessura, antera estreita e relativamente longa (1mm), com deiscência lateral, pólen grande (50-100 µm). Yunker (1972) relata que outras espécies semelhantes deste gênero representam um grupo mais avançado, como *Piper hispidum*, pois apresentam peças florais compactadas, antera com deiscência apical e pólen pequeno.

## **2.2 Importância econômica**

Maia et al. (1987), em um levantamento botânico e químico realizado na flora amazônica, descreveram a existência de mais de uma dezena de espécies de *Piper* fornecedoras de óleos essenciais. Estas substâncias de origem natural ou sintética, conhecidas como essência, óleo essencial ou etéreo, se destacam ao longo da história da humanidade, graças às suas nobres características e diversas aplicações na indústria (Cardoso et al., 2000). São produtos vegetais separáveis por arraste a vapor d'água e que existem nas plantas em estruturas especiais de secreção, tais como idioblastos, cavidades e canais esquizógenos ou lisígenos originados por separação ou lise de células, respectivamente e tricomas glandulares (Gottlieb & Salatino, 1987).

O safrol é um fenil éter encontrado como componente volátil em algumas espécies de plantas, que em sua forma mais pura, à temperatura ambiente, é um líquido viscoso de aroma canforáceo (Maia et al., 1987). Rosa et al. (2000) descreveram o safrol ou 4 -alil-1,2-metileno-dioxibenzeno, como um éter fenólico do grupo dos anilpropanóides, com fórmula molecular  $C_{10}H_{10}O_2$ , ponto de ebulição de  $232^{\circ}C - 235^{\circ}C$  e que solidifica a uma temperatura de  $11^{\circ}C$ , insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos como álcool, éter etílico e clorofórmio. É precursor de uma variedade de compostos de importância econômica, tais como bioinseticidas biodegradáveis, fixadores de aroma e, mais recentemente, de drogas antiinflamatórias, antitrombóticas e auxinas endólicas. Em sua forma natural foi largamente utilizado nos Estados Unidos para aromatizar cervejas (Anya, 1974) e como agente de fragrâncias em alguns produtos como ceras, sabões e desinfetantes (Anon, 1992). Atualmente, o safrol natural é utilizado na forma de heliotropina, como fixador de fragrâncias e, na forma de butóxido de piperonila, na composição de inseticidas (Castro & Poveda, 1983).

O butóxido de piperonila apresenta-se como principal agente sinérgico para o piretrium natural, o qual é base de inseticidas biodegradáveis e que, isolado, tem efeito reduzido. O piretrium natural associado ao butóxido de piperonila é a única formulação permitida para uso em armazenamento e processamento de alimentos em todos os países do primeiro mundo (Arctander, 1960). Segundo Maia et al. (1993), a demanda por butóxido de piperonila tende a crescer cada vez mais devido às suas características de baixa toxicidade e por ser biodegradável.

No Brasil, até poucos anos atrás, o safrol era extraído da canela de sassafrás (*Ocotea pretiosa*), uma Lauraceae nativa da Mata Atlântica, com alta densidade de indivíduos no Vale do Itajaí, SC. A descoberta do óleo de sassafrás extraído da canela se deu em 1939, quando foi evidenciado que, pela destilação da madeira dessa árvore, obtinha-se um óleo essencial contendo 84% de safrol (Rocha & Ming,

1999). Porém, com a exploração abusiva e desordenada, o risco de extinção da espécie era quase certo, visto que a mesma era cortada no tronco para a extração do óleo na casca (Silva, 1993). Diante do problema, o Governo Federal, por meio do Decreto n° 1557, publicado no Diário Oficial da União de 25 de setembro de 1991, proibiu o corte de *O. pretiosa*.

Atualmente, o óleo essencial de sassafrás, importado da China e do Vietnã, é obtido da mesma forma destrutiva ocorrida no Brasil e, com isso, as suas reservas correm sério risco de esgotamento a curto e médio prazos. Japão, Itália e Estados Unidos são os mercados mais importantes para óleo de sassafrás, sendo a demanda calculada ao redor de 2.000 toneladas/ano, com preço variando entre US\$ 4 a 6 por quilo de matéria bruta. O Brasil tem capacidade industrial para produzir heliotropina e piretróide (aproximadamente 500 toneladas/ano), embora a escassez em forma de produção doméstica, conduz a importações da República Federativa da China. A demanda é determinada pelo mercado para heliotropina e piretróide, ocasionando o aumento do consumo, particularmente na Europa Oriental, Ásia e alguns países em desenvolvimento (Rocha & Ming, 1999).

As folhas de *Piper hispidinervum* C.DC. possuem 3% a 4% de óleo volátil com rendimento de 81% a 88% de safrol quando em estado nativo, podendo apresentar rendimentos de 98,12% após cultivos e tratamentos culturais adequados (Maia et al., 1993). Possui ciclo vital curto de aproximadamente 8 meses, sendo que a época da primeira floração, ocorre quando a planta mede em torno de 2 metros de altura, momento propício para o corte da planta (Silva, 1993).

A descoberta da pimenta-longa (*Piper hispidinervum*) como uma espécie promissora para a obtenção de safrol ocorreu na década de 1970, por meio do programa de triagem de plantas aromáticas da Amazônia, coordenado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Porém, somente na década de 1990, após a proibição do corte da canela de sassafrás, a espécie começou a ser

mais estudada, despertando o interesse para sua exploração comercial (Wadt, 2001). Ao contrário do sistema de extração do óleo da canela, no qual havia destruição da fonte, o processo de obtenção do safrol a partir da pimenta-longa pode ser sustentável, pois o safrol é extraído de folhas e ramos finos sem a destruição da planta, possibilitando sua rebrota (Silva, 1993). O cultivo da pimenta-longa poderá ser uma nova alternativa de exploração utilizando áreas que foram desmatadas e ou degradadas. A simplicidade do sistema de produção, a rusticidade da espécie e a facilidade no manejo da cultura e na produção do óleo essencial possibilitam sua exploração comercial (Santiago, 1999) e, ainda, uma fonte de renda alternativa para pequenos produtores, associações e cooperativas da região amazônica.

A espécie *Piper aduncum* L. apresenta elevados teores de dilapiol em seu óleo essencial. Também conhecida como jaborandi falso, jaborandi-do-mato e pimenta-do-fruto-ganchoso, é uma planta medicinal largamente usada devido à sua ação estimulante da digestão, do fígado e cicatrização e ainda apresenta compostos com ação antimicrobiana (Maia et al., 1998). Nor Azah et al. (2000) demonstraram que o extrato de folhas de *Piper aduncum* L. possui ação contra diversos microrganismos como as bactérias *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas sp.* e contra o fungo *Candida sp.* Ibrahim et al. (1996) constataram que o óleo de *Piper aduncum* L. era altamente tóxico às larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Torres Santos et al. (1999) determinaram importante atividade do extrato de *P. aduncum* no controle de *Leishmania amazonensis* (LV79). O óleo de *Piper aduncum* L. também mostrou-se eficiente no controle da vassoura-de-bruxa do cacauero (Bastos, 1997).

A espécie *Piper hispidum* L. apresenta compostos como isobutil, pirrolidina e dihidropiridone, com ação antifúngica contra o *Cladosporium sphaerospermum*, causador da verrugose em algumas frutíferas (Alecio et al., 1999).

### 2.3 Descrição citogenética

Mathew (1958), em um estudo realizado com algumas espécies do gênero *Piper* do Sul da Índia, observou variação no número cromossômico ( $2n=26, 52, 78, 104$ ) e propôs o número básico  $x=13$  para o gênero. Posteriormente, esse número foi confirmado por Smith (1966), por Samuel & Bavapa (1981) e por Okada (1986).

O gênero *Piper* apresenta grandes variações quanto ao número cromossômico de algumas espécies. Johansen (1931) relatou, para a espécie *Piper subpeltatum*,  $2n = 24$  cromossomos. Sharma & Bhattacharyya (1959), estudando os cromossomos de espécies do gênero *Piper* observaram os seguintes números cromossômicos: *P. chaba*  $2n = 24$  e  $96$  cromossomos, *P. longum*  $2n = 148$ , *P. geniculatum*  $2n = 28$ , *P. unguiculatum* e *P. medium*  $2n = 32$ , *P. betle*  $2n = 64$ , *P. ornatum*  $2n = 80$  e *P. nigrum*  $2n = 48$  e  $128$ . Dasgupta & Datta (1976) observaram *P. betle* com  $2n = 64$  cromossomos, *P. cubeba* com  $2n = 24$ , *P. longum* com  $2n = 48$ , *P. magnificum* com  $2n = 24$ , *P. nigrum* L. Agartala com  $2n = 36$  e *P. nigrum* L. com  $2n = 60$ .

Além da variação no número de cromossomos entre as espécies do gênero *Piper*, foi observada também variação dentro de espécie. É o que pode-se observar para a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.), para a qual foram relatados  $2n = 128$  cromossomos (Sharma & Bhattacharyya, 1959),  $2n = 26, 52, 78$  e  $104$  (Mathew, 1958) e  $2n = 36$  e  $60$  (Dasgupta & Datta, 1976).

Das 2.000 espécies registradas, somente 64 têm número de cromossomos relatado na literatura, ocorrendo números múltiplos de 8, 11, 12, 13 e 14. Sharma & Bhattacharyya (1959) sugerem  $x = 12$  como o número básico para o gênero *Piper*. Mathew (1958) e Smith (1966), ao contrário, indicam  $x = 13$  como o número básico para o gênero. De acordo com Dasgupta & Datta (1976), aproximadamente 47,3% das espécies de *Piper* têm  $x = 12$  e somente 19,04% têm  $x = 13$ . Alterações no número de cromossomos ao longo do processo evolutivo parecem comuns no

gênero *Piper*, por ocorrência de biotipos cromossômicos em muitas espécies, originados a partir de células aneussomáticas ou aneuploidia meiótica ou partenogênese

Avaliando espécies do gênero *Piper* e *Peperomia*, Jose & Sharma (1985) constataram que todas as espécies do gênero *Piper* avaliadas apresentaram número cromossômico múltiplo de 13, exceto *P. cubeba*  $2n=24$ . O número básico  $x=13$  é bem característico do gênero *Piper* e vem sendo mantido pela seleção humana, levando a mudanças gênicas críticas e alterações cromossômicas estruturais. O número básico  $x=12$  apresentado por *P. cubeba* evidencia que esta pode ser uma espécie primitiva, da qual o número  $x=13$  evoluiu.

Samuel et al. (1981), em um estudo com *Piper nigrum*, *P. betle* e *P. longum*, procedentes de Kew e do Sri Lanka, observaram que as espécies de Kew eram diplóides com  $2n = 26$  cromossomos, com comprimento variando de 1,0 a 2,8  $\mu\text{m}$ , enquanto que as espécies do Sri Lanka eram tetraplóides ( $2n = 52$ ) com comprimento dos cromossomos variando de 0,6 a 1,2  $\mu\text{m}$ , ou seja, metade do tamanho encontrado nas espécies diplóides.

Em várias angiospermas ocorre aumento na quantidade de DNA nuclear em proporção direta ao aumento do nível de ploidia, como, por exemplo, em *Triticum*. Há casos, no entanto, em que o aumento da ploidia não implica em aumento na quantidade de DNA do genoma, como em *Festuca*. No caso do gênero *Piper*, ambos os fenômenos parecem acontecer. As espécies diplóides, procedentes de Kew, tiveram a quantidade de DNA nuclear significativamente mais alta que as espécies tetraplóides do Sri Lanka, o que sugere que algumas espécies poliplóides podem possuir menor quantidade de DNA no genoma básico, do que seus parentes diplóides (Samuel et al., 1981).

Joseph et al. (1999) constataram diferenças numéricas e estruturais entre os cromossomos das espécies *Piper magnificum* T. ( $2n = 26$ ), *P. colubrinum* L. ( $2n = 26$ ) e *P. nigrum* L. ( $2n = 52$ ). Foram encontrados cromossomos metacêntricos e submetacêntricos nas três espécies, com tamanho relativamente pequeno, variando de 0,32 a 2,46 $\mu$ m.

Jose & Sharma (1985) avaliaram oito espécies de *Piper* e nove espécies de *Peperomia*. Constataram variação no número cromossômico em *Piper* de  $2n = 24$  a 195 e em *Peperomia*  $2n = 22$  a 44. Exceto em *Piper cubeba* L. f. (3,33 a 1,40  $\mu$ m), a morfologia dos cromossomos em todas as espécies de *Piper* mostrou homogeneidade e tamanho extremamente pequeno (2,41 a 0,56  $\mu$ m). Os cromossomos diminuíram de tamanho progressivamente e eram metacêntricos e submetacêntricos, enquanto que em *Peperomia* os cromossomos eram maiores (6,67 a 1,30  $\mu$ m). Foram observadas constrições secundárias em espécies do gênero *Piper*, variando de 1 a 4 pares. Poliploidia ocasional e alterações estruturais envolvendo cromossomos com constrição secundária parecem ocorrer nesse gênero. Em um estudo de 17 espécies de *Piper* ( $x=13$ ) e 8 espécies de *Peperomia* ( $x=11$ ), Mathew et al. (1999) relataram que o gênero *Piper* se diversificou muito antes que *Peperomia*, durante um longo período evolucionário no qual mudanças cromossômicas estruturais acarretaram uma marcante diminuição do tamanho de seus cromossomos.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material genético

Foram caracterizados citogeneticamente cinco acessos da espécie *Piper hispidinervum* C.DC. (16.7, 19, 19.3, 22 e 26), dois acessos da espécie *Piper aduncum* L. (203.8 e 207.9) e um acesso da espécie *Piper hispidum* L.(5).

Sementes dos acessos das espécies *Piper hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. hispidum*, pertencentes à Coleção de Trabalho da Embrapa Acre, foram colocadas para germinar em meio de cultura, sob condições controladas de temperatura e luminosidade. O período de início da germinação variou entre as espécies, sendo em torno de 10 a 15 dias para *Piper hispidinervum* e de 20 a 30 dias para *P. aduncum* e *P. hispidum*. Dentre as três espécies, as sementes dos acessos de *P. hispidum* apresentaram o menor poder germinativo, o que dificultou a obtenção de radículas para avaliação citogenética dos mesmos.

#### 3.2 Avaliação citogenética

As análises citogenéticas foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

As radículas com cerca de 0,5 cm foram coletadas e pré-tratadas com antimitóticos, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, conforme a Tabela 1.

**TABELA 1.** Substâncias inibidoras do fuso mitótico e condições de uso para obtenção de metáfases em células meristemáticas de radículas de *Piper* sp.

Substância	Concentração	Condições
Colchicina	0,05%, 0,02% e 0,01%	3, 4 e 22h a 4°C
Hidroxiquinoleína	0,03%	18, 20, 22 e 28h a 4°C
Orizalina	5,0 µM	18, 20, 22 e 28h a 4°C
Trifluralina	1,0 e 3,0 µM	18, 20, 22 e 28h a 4°C

Após os pré-tratamentos, as raízes foram fixadas em solução gelada de metanol:ácido acético na proporção 3:1 e armazenadas na solução fixadora a -20°C até o momento do uso.

A preparação das lâminas foi realizada pelo método de esmagamento de células. Para degradar a parede celular e facilitar a retirada do meristema, possibilitando assim um melhor espalhamento do material sobre a lâmina, as raízes fixadas foram submetidas a maceração enzimática em solução de celulase 2%/pectinase 20%, por diferentes períodos de tempo, em câmara úmida, a 37°C. Posteriormente, foi realizada hidrólise em solução de HCl 1N, a 60°C, por 10-12 minutos.

Para coloração foi utilizado o reativo de Schiff durante 3 a 6 horas. Em alguns casos, após a coloração com o reativo de Schiff, foi utilizada a solução de Giemsa 5% (tampão fosfato pH 6,8), por 10 minutos, à temperatura ambiente.

Os meristemas corados foram isolados, na presença de ácido acético 45%, sob microscópio estereoscópio e esmagados sob lamínula, a qual foi removida com o uso de nitrogênio líquido.

### 3.2.1 Análise cariotípica

Para cada acesso estudado foram selecionadas cinco metáfases para a determinação do número cromossômico e para a realização da análise morfológica dos mesmos.

A observação e análise das lâminas foram feitas com uso de microscópio Olympus BX 60, equipado com microcâmera digital OPTRONICS® acoplada a microcomputador, para captura direta das figuras de interesse.

Para a descrição do cariótipo foram feitas a contagem do número cromossômico e a medição dos braços cromossômicos, por meio de software de análise de imagem SIGMA SCAN PRO v. 1.0.

Foram obtidos os seguintes valores médios: a) comprimento do braço longo: BL; b) comprimento do braço curto: BC; c) comprimento total do cromossomo  $i$ :  $Ct_i = BL + BC$ ; d) relação de braços:  $RB = BL/BC$ ; e) comprimento total do lote haplóide:  $CTLH = \sum Ct_i$ ; f) comprimento relativo:  $CR = (Ct_i/CTLH) \times 100$ .

Com esses dados foi realizada a identificação dos pares homólogos em cada célula dos acessos. Uma vez identificados, os cromossomos foram organizados e numerados em ordem decrescente de tamanho para as três espécies de *Piper* e representados na forma de idiograma.

A classificação morfológica dos cromossomos foi feita de acordo com a nomenclatura proposta por Levan et al. (1964), baseada na relação de braços.

### **3.2.2 Avaliação do comprimento total do complemento cromossômico dos acessos**

Os acessos foram comparados quanto ao comprimento total do lote haplóide (CTLH) entre acessos dentro de espécies, adotando delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições. O modelo estatístico adotado foi:

$Y_{ij} = m + t_i + e_{(ij)}$  , em que:

$Y_{ij}$  = é a observação do acesso  $i$ , na repetição  $j=1,2,\dots,5$ .

$m$  = é a média geral.

$t_i$  = é o efeito do acesso  $i$ , com  $i=1,2, \dots , n$ .

$e_{(ij)}$  = é o erro experimental.

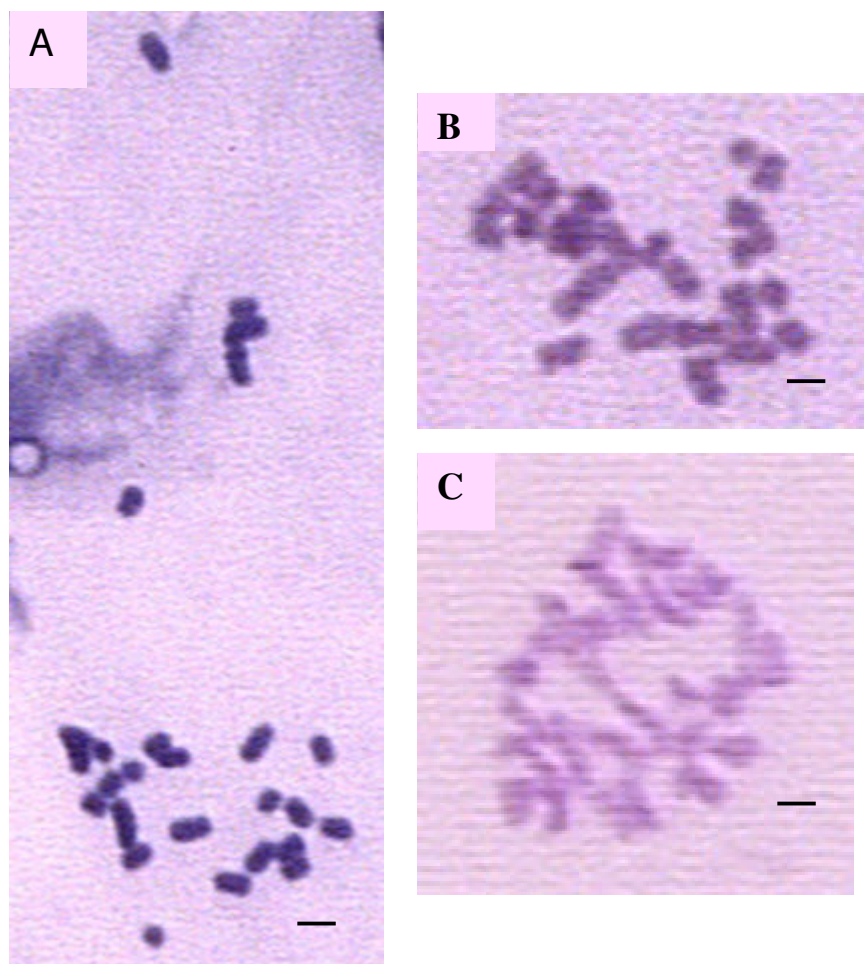
A comparação entre os acessos foi feita utilizando-se o Teste de Tukey (1949), adotando-se o nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando o software SAS<sup>®</sup> (SAS, 1993).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os pré-tratamentos com antimitóticos, os que apresentaram as melhores metáfases foram os que utilizaram colchicina, nas concentrações de 0,01% e 0,05%, com tempo de exposição de 3 e 4 horas, a 4<sup>0</sup>C. As lâminas preparadas com raízes pré-tratadas com orizalina, hidroxiquinoleína e trifuralina, em diferentes tempos de exposição, ou não apresentavam metáfases, ou estas se encontravam altamente condensadas, com os cromossomos agrupados, o que impossibilitava a contagem dos mesmos.

O tempo de maceração enzimática foi variável entre as espécies. Os acessos de *Piper hispidinervum* apresentaram raízes maceradas após períodos de tratamentos que variaram entre 45 minutos a 2 horas. Para os acessos de *Piper aduncum* e *Piper hispidum*, este tempo foi um pouco maior, chegando a 5 horas.

Em todos os pré-tratamentos, mesmo aqueles em que foi utilizada a colchicina, obteve-se um grande número de metáfases com cromossomos pegajosos em todos os acessos avaliados. Para as três espécies estudadas, *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. hispidum*, foi obtido o número cromossômico  $2n = 24$  (Figura 1). Esse número de cromossomos as inclui no grupo das espécies do gênero *Piper* com número básico  $x = 12$ , que corresponde a aproximadamente, 47,3%, enquanto que somente 19,04% das espécies do gênero têm  $x = 13$  (Dasgupta & Datta, 1976). Os acessos de *P. hispidinervum* apresentaram comprimento médio de 1,01  $\mu\text{m}$  para o primeiro par, representando, em média, 12,86% do complemento, sendo que para o décimo segundo par, esses valores foram 0,43  $\mu\text{m}$  e 5,42% (Tabela 2).



**Figura 1** . Metáfases somáticas com  $2n = 2x = 24$  cromossomos. A- Piper hispidinervum, B – Piper aduncum e C - P. hispidum . A barra representa 5  $\mu$ m.

TABELA 2. Valores médios e média geral, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), das variáveis cromossômicas dos acessos de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C.D.C). (C= cromossomo; Bl= braço maior; Bc= braço menor; Cti=comprimento total do cromossomo; Cr= comprimento relativo; Rb= relação de braços; Cl= classificação do cromossomo em relação à posição do centrômero, sendo m=metacêntrico). UFLA. Lavras, MG, 2004.

C	Acesso 16.7						Acesso 19						Acesso 19.3					
	Bl	Bc	Cti	Cr	Rb	Cl	Bl	Bc	Cti	Cr	Rb	Cl	Bl	Bc	Cti	Cr	Rb	Cl
I	0,53	0,47	1,00	13,19	1,15	m	0,54	0,47	1,02	13,22	1,15	m	0,56	0,52	1,08	12,94	1,09	m
II	0,48	0,37	0,85	11,27	1,30	m	0,44	0,39	0,84	10,86	1,12	m	0,48	0,42	0,90	10,74	1,14	m
III	0,43	0,32	0,75	9,85	1,34	m	0,40	0,37	0,76	9,90	1,08	m	0,45	0,41	0,85	10,25	1,10	m
IV	0,37	0,32	0,68	9,01	1,15	m	0,37	0,34	0,71	9,28	1,08	m	0,43	0,38	0,80	9,62	1,13	m
V	0,35	0,30	0,65	8,58	1,20	m	0,34	0,32	0,66	8,55	1,05	m	0,39	0,35	0,74	8,85	1,13	m
VI	0,34	0,29	0,63	8,26	1,15	m	0,33	0,29	0,62	8,12	1,12	m	0,38	0,32	0,70	8,45	1,17	m
VII	0,32	0,27	0,59	7,78	1,19	m	0,31	0,29	0,60	7,77	1,09	m	0,34	0,31	0,65	7,75	1,10	m
VIII	0,30	0,25	0,55	7,27	1,20	m	0,31	0,28	0,59	7,65	1,14	m	0,32	0,29	0,62	7,37	1,09	m
IX	0,29	0,23	0,52	6,83	1,26	m	0,28	0,26	0,54	6,96	1,06	m	0,30	0,28	0,58	6,95	1,08	m
X	0,28	0,21	0,49	6,41	1,30	m	0,27	0,24	0,50	6,55	1,11	m	0,27	0,25	0,52	6,21	1,09	m
XI	0,24	0,20	0,45	5,90	1,19	m	0,24	0,22	0,47	6,05	1,09	m	0,26	0,23	0,48	5,79	1,13	m
XII	0,22	0,21	0,43	5,69	1,05	m	0,21	0,19	0,39	5,07	1,11	m	0,22	0,20	0,42	5,05	1,08	m
<b>CTLH</b>			7,58						7,69						8,34			

“...continua...”

“ TABELA 2, cont.”

C	Acesso 22						Acesso 26					
	Bl	Bc	Cti	Cr	Rb	Cl	Bl	Bc	Cti	Cr	Rb	Cl
I	0,58	0,50	1,08	12,68	1,17	m	0,48	0,42	0,90	12,27	1,16	m
II	0,53	0,43	0,95	11,17	1,23	m	0,45	0,37	0,83	11,21	1,22	m
III	0,46	0,40	0,86	10,04	1,17	m	0,40	0,32	0,73	9,89	1,25	m
IV	0,43	0,36	0,79	9,27	1,18	m	0,37	0,30	0,67	9,16	1,25	m
V	0,39	0,36	0,75	8,80	1,10	m	0,37	0,27	0,64	8,65	1,39	m
VI	0,36	0,34	0,70	8,23	1,05	m	0,34	0,27	0,61	8,22	1,28	m
VII	0,35	0,30	0,65	7,66	1,17	m	0,32	0,24	0,56	7,62	1,31	m
VIII	0,33	0,29	0,61	7,18	1,15	m	0,32	0,24	0,56	7,54	1,33	m
IX	0,32	0,26	0,58	6,82	1,25	m	0,30	0,22	0,52	7,09	1,37	m
X	0,31	0,25	0,55	6,50	1,24	m	0,28	0,22	0,50	6,79	1,28	m
XI	0,28	0,24	0,52	6,09	1,20	m	0,21	0,21	0,42	5,75	1,00	m
XII	0,27	0,21	0,47	5,54	1,30	m	0,23	0,20	0,42	5,73	1,15	m
<b>CTLH</b>			8,53						7,36			



Os acessos de *Piper aduncum* apresentaram comprimento médio de 0,82  $\mu\text{m}$  e 0,35  $\mu\text{m}$ , para o primeiro e décimo segundo pares de cromossomos, respectivamente (Tabela 3). Ao visualizar os valores de comprimento relativo da Tabela 3, pode-se inferir que, em média, o maior par de cromossomos representou 12,3% do comprimento do lote haplóide, e o menor par de cromossomos representou 5,2%.

Em *Piper hispidum*, o comprimento total variou de 1,1  $\mu\text{m}$  a 0,5  $\mu\text{m}$ , para o maior e menor par de cromossomos, respectivamente. O maior par de cromossomos representa 12% do complemento total do lote haplóide (CTLH), enquanto que o menor representa apenas 5,4%.

Esses valores vão de acordo com os valores médios relatados para os cromossomos das espécies do gênero *Piper*, em geral muito pequenos. Joseph et al. (1999) observaram (0,32 a 2,46 $\mu\text{m}$ ) para as espécies *Piper magnificum* T. (2n=26), *P. colubrinum* L. (2n=26) e *P. nigrum* L. (2n=52).

Com relação à morfologia, os cariótipos das três espécies foram muito similares, apresentando somente cromossomos metacêntricos (Tabelas 2 e 3). O conhecimento das características dos cariótipos pode ser uma importante ferramenta para a compreensão de eventos de alterações cromossômicas estruturais envolvidas no processo evolutivo e de especiação.

Foram observadas diferenças entre o comprimento total do lote haplóide das espécies, como mostra o resumo da análise de variância entre e dentro de espécie na Tabela 4.

*Piper hispidum* apresentou o maior comprimento total do lote haplóide com 9,14  $\mu\text{m}$ , seguida pela *P. hispidinervum* com 7,79  $\mu\text{m}$  e pela *P. aduncum* com 6,72  $\mu\text{m}$  (Tabela 5).

**TABELA 3.** Valores médios e média geral, em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), das variáveis cromossômicas dos acessos 203.8 e 207.9 de *Piper aduncum* L. e acesso 5 de *Piper hispidum* S.w. (C= cromossomo; Bl= braço maior; Bc= braço menor; Cti=comprimento total do cromossomo; Cr= comprimento relativo; Rb= relação de braços; Cl= classificação do cromossomo em relação à posição do centrômero, sendo m=metacêntrico). UFLA. Lavras, MG, 2004.

C	Acesso 203.8						Acesso 207.9						Acesso 5					
	Bl	Bc	Cti	Cr	Rb	Cl	Bl	Bc	Cti	Cr	Rb	Cl	Bl	Bc	Cti	Cr	Rb	Cl
I	0,46	0,39	0,85	12,86	1,19	m	0,44	0,35	0,79	11,79	1,24	m	0,63	0,47	1,10	12,00	1,32	m
II	0,41	0,34	0,75	11,38	1,23	m	0,39	0,32	0,71	10,55	1,23	m	0,52	0,45	0,97	10,60	1,15	m
III	0,38	0,28	0,66	10,02	1,34	m	0,36	0,31	0,66	9,85	1,16	m	0,49	0,42	0,91	9,93	1,17	m
IV	0,34	0,27	0,61	9,21	1,23	m	0,35	0,27	0,62	9,23	1,32	m	0,48	0,37	0,85	9,28	1,30	m
V	0,33	0,26	0,59	8,91	1,30	m	0,33	0,28	0,60	9,00	1,20	m	0,46	0,36	0,82	8,92	1,29	m
VI	0,30	0,25	0,55	8,35	1,23	m	0,31	0,25	0,56	8,39	1,22	m	0,43	0,34	0,77	8,40	1,25	m
VII	0,25	0,23	0,48	7,27	1,11	m	0,32	0,22	0,53	7,96	1,47	m	0,44	0,30	0,73	8,01	1,45	m
VIII	0,28	0,23	0,52	7,80	1,22	m	0,28	0,25	0,53	7,90	1,13	m	0,38	0,31	0,69	7,48	1,21	m
IX	0,21	0,21	0,42	6,38	1,00	m	0,28	0,20	0,48	7,08	1,38	m	0,35	0,30	0,65	7,07	1,19	m
X	0,25	0,20	0,45	6,77	1,22	m	0,24	0,20	0,44	6,54	1,23	m	0,33	0,28	0,61	6,62	1,20	m
XI	0,23	0,17	0,40	6,03	1,40	m	0,24	0,18	0,42	6,27	1,30	m	0,34	0,23	0,57	6,23	1,47	m
XII	0,18	0,15	0,33	5,06	1,23	m	0,20	0,17	0,37	5,45	1,22	m	0,29	0,21	0,50	5,45	1,36	m
<b>CTLH</b>			6,60						6,71						9,16			

**TABELA 4.** Resumo da análise de variância para o comprimento total do lote haplóide (CTLH) entre espécies de *Piper* e entre acessos dentro de espécie. UFLA, Lavras-MG, 2004.

FV	GL	QM
Espécie	2	10,062**
Acesso/espécie	5	1,24
Erro	32	1,046
Total	39	

CV (%) = 13,32

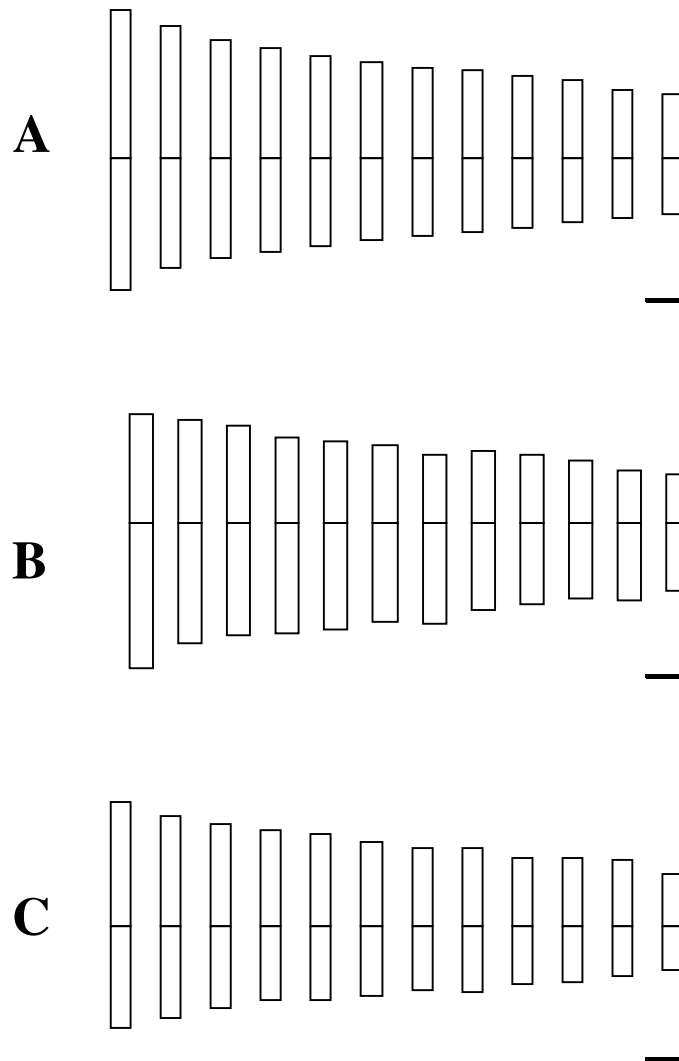
**TABELA 5.** Valores médios para o comprimento total do lote haplóide (CTLH), expresso em micrômetro ( $\mu\text{m}$ ), para os acessos de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. hispidum* e classificação. UFLA, Lavras, MG, 2004.

Espécie	CTLH
<i>P. hispidum</i>	9,14 a
<i>P. hispidinervium</i>	7,79 b
<i>P. aduncum</i>	6,72 c

\* Médias diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey, a 5% de significância.

As três espécies apresentaram cariótipos com características muito semelhantes. O primeiro par de cromossomos das três espécies apresentaram comprimento relativo médio de 12,4%. O décimo segundo par representou em média 5,3% do genoma (Tabelas 2 e 3).

A diferença entre o comprimento médio dos cromossomos I e II dos acessos de *P. hispidinervium* foi de 0,14  $\mu\text{m}$ . Essa mesma diferença entre os acessos de *P. aduncum* foi de 0,09  $\mu\text{m}$  e para *P. hispidum* foi de 0,13  $\mu\text{m}$ . Essa baixa diferença entre os cromossomos I e II dos cariótipos reforça a característica de simetria dos mesmos (Figura 2).



**FIGURA 2.** Idiogramas de pimenta-longa, sendo A – *Piper hispidinervum*, B – *Piper aduncum* e C – *Piper hispidum*. A barra representa 5  $\mu\text{m}$ .

Segundo a classificação de Stebbins (1958), os cariótipos das três espécies estão na categoria 4b, na qual a razão entre o maior e menor cromossomo está entre 2:1 – 4:1 e a proporção de cromossomos com relação de braços menor que 2:1 é de 100%.

## 5 CONCLUSÕES

Os complementos cromossômicos dos acessos de *P. hispidinervum*, *P. aduncum* e *P. hispidum* apresentam  $2n=24$  cromossomos, apresentando centrômero mediano. O tamanho dos cromossomos decrescem gradativamente, mostrando a característica de cariótipos simétricos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAREZ, F. V.; RIZZINI, C. M.; PEREIRA, C. **Botânica, taxonomia, morfologia e reprodução dos angiospermae: chaves para determinação das famílias.** Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1994. p. 198-199.

ALECIO, A. C.; SILVA, B. V. da; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Antifungal amide from leaves of *Piper hispidum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 61, n. 5, p. 637-639, May 1998.

ALMEIDA, M. C. **Banco de sementes e simulação de clareiras na germinação de Pimenta Longa (*Piper hispidinervium* C. DC.).** 1999. 60 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

ANON, A. **Marketing reports in tissues of the chemical marketing reporter.** New York: Schnell publishing, 1992.

ANYA, A. L. Study of the allelopathic activity in the essential oil of *Piper auritum*. In: CONGRESS OF ESSENTIAL OIL, 6., 1974, Oak Park. **Proceedings...** Oak Park: Alhured Published Corporation, 1974.

ARCTANDER, S. **Perfume and flavour materials of natural origen.** Elisabeth, New Jersey, 1960.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis perniciosa* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 441-443, set. 1997.

BREMER, K.; BREMER, B.; THULIN, M. **Introduction to phylogeny and systematics of flowering plants.** 5. ed. Uppsala: Uppsala University. 1999. 102 p.

BURGER, W. C. The evolutionary trends in Central American species of *Piper*. **Brittonia**, Bronx, v. 224, n. 4, p. 356-362, 1972.

CARDOSO, M. G.; GAVILANES, M. L.; SILVA, M. C.; SHAW, A. Y. K. V.; SANTOS, B. R.; OLIVEIRA, A. C. B.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, A. P. S. **Óleos essenciais.** Boletim de Extensão, Lavras, v. 9, n. 73, p. 1-42, 2000.

CASTRO, C.; POVEDA, L. *Piper auritum* H. B. K. Estudio preliminar de aceite essencial de sus hojas. **Instituto de Ciências Químicas de Produtos Naturais**, São Paulo, v. 7, n. 1/2, p. 24-25, 1983.

- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** New York: Columbia University Press, 1981. p. 86-89.
- DASGUPTA, A.; DATTA, P. C. Cytotaxonomy of Piperaceae. **Cytologia**, Tokyo, v. 41, n. 3-4, p. 697-706, 1976.
- FEDOROV, AN. A. (Ed.). **Chromosome numbers of plants.** Leningrad: Academy of Sciences of the URSS. Komarov Botanical Institute, 1969. 962 p.
- GOTTLIEB, O. R.; SALATINO, A. Função e evolução dos óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 39, n. 8, p. 707-716, ago. 1987.
- HOWARD, R. A. Notes of the Piperaceae of Lesser Antilles. **Journal of Arnold Arboretum**, Cambridge, v. 54, n. 3, p. 377-411, 1973.
- IBRAHIM, J.; ABU SAID, A.; ABDUL RASHID, A.; NOR AZAH, M. A.; ZARIDAH, M. Z.; AZIZOL, A. K. Essential oils of selected Malaysian plants and their potential uses. In: CONFERENCE ON FORESTRY AND FOREST PRODUCTS RESEARCH, 1996. p. 97-103.
- JOHANSEN, D. A. The chromosomes of *Piper subpeltatum*. **American Journal of Botanic**, Columbus, v. 18, n. 2, p. 134-135, Feb. 1931.
- JOLY, A. B. **Botânica:** introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Editora Nacional, 1993. 777 p.
- JOSE, J.; SHARMA, A. K. Structure and behavior of chromosomes in *Piper* and *Peperomia* (Family Piperaceae). **Cytologia**, Tokyo, v. 50, n. 2, p. 301-310, 1985.
- JOSEPH, A.; JOSEPH, R.; JOSE, J. Karyomorphometrical analysis in Piper species using image analysis system. **Cytobios**, Cambridge, v. 97, n. 384, p. 7-11, 1999.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SOUBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, Landskrona, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.
- MAIA, J. G. S.; SILVA, M. I. da; LUZ, A. I. R.; et al. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em safrol. **Química Nova**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 200-204, maio/jun. 1987.
- MAIA, J. G. S.; GREEN, C. L.; MILCHARD, M. J. New Sources of Natural Safrole. **Perfumer and Flavorist International**, Weaton, v. 18, n. 1, p. 19-22, 1993.



- MAIA, J. G. S.; ZOHHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L. da; LUZ, A. I. R.; BASTOS, C. N.; da SILVA, M. H. L. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. **Flavour and Fragrance Journal**, Sussex, v. 13, n. 4, p. 269-272, July/Aug. 1998.
- MATHEW, P. J.; MATHEW, P. M.; PUSHPANGANDAN, P. Cytology and its bearing on the systematics and phylogeny of piperaceae. **Cytologia**, Tokyo, v. 64, n. 3, p. 310-307, 1999.
- NOR AZAH, M. A.; VIMALA, S.; ONG, B. K.; MASTURA, M.; LING, S. K.; KHOZIRAH, S. Investigation into the chemical and biological properties of Malaysian Piper. CONFERENCE ON FORESTRY AND FOREST PRODUCTS RESEARCH, 2000. p. 436-444.
- MATHEW, P. M. Studies on Piperaceae. **Journal of Indian Botanical**, Madras, v. 37, n. 2, p. 165-171, 1958.
- OKADA, H. Karyomorphology and relationships in some genera of Saururaceae and Piperaceae. **Botanical Magazine**, Tokyo, v. 99, n. 1055, p. 289-299, Sept. 1986.
- ROCHA, S. F. R.; MING, L. C. *Piper hispidinervum*: a sustainable source of safrole. p. 479-481. In: JANICK, J. (Ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999.
- ROSA, F. AF.; NASCIMENTO, M. G.; REBELO, R. A.; PESCADOR, R. A. Avaliação da atividade regulatória de crescimento de compostos análogos ao ácido indolacético em sementes de alface. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas. **Livro de Resumos...** Poços de Caldas, 2000. v. 2, QB- 010.
- SAMUEL, M. R. A.; BAVAPPA, K. V. A. Chromosome numbers in the genus *Piper*. **Current Science**, Bangalore, v. 50, n. 4, p. 197-198, 1981.
- SANTIAGO, E. J. A. de. **Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) em condições “in vitro” e “in vivo”**. 1999. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SANTOS, A. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M das G. B. et al. Sesquiterpenes of amazonian *Piper* species. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 28, n. 2, p. 127-130, jun. 1998.
- SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT<sup>®</sup>: user's guide. v. 6. 4. Cary: SAS Institute Inc. 1993.

- SHARMA, A. K.; BHATTACHARYYA, N. K. Chromosome studies on two genera of the family Piperaceae. **Genetica**, Dordrecht, v. 29, p. 256-289, 1959.
- SILVA, A. C. P. R. da; OLIVEIRA, M. N. de. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero Piper no Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 13 p. (Embrapa Acre. Boletim de Pesquisa, 23).
- SILVA, M. H. L. da **Tecnologia de cultivo e produção racional de Pimenta Longa *Piper hispidinervum* C. DC.** 1993. 120 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- SMITH, J. B. Chromosome numbers in *Peperomia* Ruiz & Pav. (Piperaceae) and note on chromosome number of *Piper magnificum* Trelease. **Kew Bulletin**, London, v. 20, n. 3, p. 521-526, 1966.
- SOUZA, J. A. de; PEREIRA, M. G. V.; BERGTER, L.; GUIMARÃES, E. F.; de SOUZA, J. A. Sarisan from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C. DC. (long pepper). **Flavour and Fragrance Journal**, Sussex, v. 16, n. 2, p. 113-115, Mar./Apr. 2001.
- STEBBINS, G. L. Longevity, habitat and release of genetic variability in the higher plants. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, Plainview, v. 23, p. 365-378, 1958.
- TORRES SANTOS, E. C.; RODRIGUES, J. M.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; ROSSI BERGMANO, B. Activities of 2-6 dihydroxy-4-methoxychalcone by entrapment in poly D, L lactide nanoparticles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 7, p. 1776-1778, July 1999.
- TUKEY, J. W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, Raleigh, v. 5, p. 232-242, 1949.
- WAARD, P. W. F. The problem areas and prospects of production of pepper (*Piper nigrum* L.). An overview. **Amsterdam Royal Tropical Institute**, 1980. 29 p. (Bulletin, 308).
- WADT, L. H. O. de. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) visando seu uso e conservação**. 2001. 95 p. Dissertação (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil. **Hoehnea**, São Paulo, v. 2, p. 1-266, 1972.