



JEANNE DE CÁSSIA GOULART

**ASPECTOS CITOGENÉTICOS,
MORFOPOLÍNICOS E ANATÔMICOS DE
ESPÉCIES DE *Piper* L. NATIVAS DA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

LAVRAS – MG

2011

JEANNE DE CÁSSIA GOULART

**ASPECTOS CITOGENÉTICOS, MORFOPOLÍNICOS E ANATÔMICOS
DE ESPÉCIES DE *Piper* L. NATIVAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

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

Orientadora

Dra. Giovana Augusta Torres

LAVRAS – MG

2011

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

Goulart, Jeanne de Cássia.

Aspectos citogenéticos, morfopolínicos e anatômicos de espécies
de *Piper* L. nativas da Amazônia brasileira / Jeanne de Cássia
Goulart. – Lavras : UFLA, 2011.

127 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Giovana Augusto Torres.

Bibliografia.

1. Piperaceae. 2. Melhoramento genético. 3. Anatomia foliar. 4.
Grãos de Pólen. 5. Cariótipo. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 583.9250487322

JEANNE DE CÁSSIA GOULART

**ASPECTOS CITOGENÉTICOS, MORFOPOLÍNICOS E ANATÔMICOS
DE ESPÉCIES DE *Piper* L. NATIVAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

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

APROVADA em 28 de julho de 2011.

Dra. Lisete Chamma Davide	UFLA
Dra. Vânia Helena Techio	UFLA
Dra. Adriana Tiemi Nakamura	UFLA
Dr. Sandro Barbosa	UNIFAL

Dra. Giovana Augusta Torres
Orientadora

LAVRAS – MG

2011

*À minha mãe, Tânia, à minha tia Márcia, à minha avó Marieta e aos meus
irmãos Rodolfo e Hebert: meus maiores incentivadores!*

DEDICO

Ao meu esposo e grande companheiro Fabrício

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma oportunidade de aprendizagem e pela presença constante em minha vida.

À professora Giovana pela orientação. Agradeço a boa convivência, conselhos e sinceridade.

À professora Lisete que sempre esteve presente na minha vida acadêmica. Agradeço a disponibilidade, por me adotar em Lavras e por ser meu exemplo de profissional.

Ao professor Sandro, meu primeiro orientador, quem me ajudou a trilhar o caminho da pós-graduação. Sandro, obrigada pela amizade e carinho sempre dedicado a mim. Se hoje sou uma citogeneticista apaixonada pela profissão foi porque você me ensinou.

À professora Vânia e Adriana pela inestimável colaboração durante todo o decorrer do trabalho e pela gentileza de sempre.

Ao pesquisador Jacson, que cedeu o material, pela disponibilidade e sugestões.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À minha mãe Tânia que lutou, sorriu, chorou, mas não deixou a saudade tomar conta de seu coração. Que me ensinou a ser mulher, mas continuar com meus sonhos de menina. Minha amiga e companheira das horas tristes e alegres, nas conquistas e na luta. Agradeço à senhora, mamãe, pelo amor e apoio incondicional. Amo muito a senhora.

À minha tia Márcia, minha “mãe de mentira” por sempre cuidar de mim com amor e carinho de mãe. Por apoiar minha mãe e cuidar de meus irmãos enquanto estou longe. Obrigada mãe de mentira pelo apoio sempre.

À minha avó Marieta sempre presente em minha vida, pelo amor e pelas palavras sábias. Por me apoiar nas decisões mesmo sabendo que a distância

traria saudades. Obrigada pelo carinho e saiba que mesmo longe a senhora estará sempre em meu coração e pensamentos.

Aos meus irmãos, Rodolfo e Hebert, que além de irmãos são meus amigos, sempre me apoiando nos estudos. Obrigada por entenderem minha ausência e cuidarem das nossas mães e da vovó. Amo vocês.

Ao meu esposo, Fabrício pelo amor, companheirismo e por me ajudar a conquistar o sonho do doutorado. Obrigada por me esperar e me ajudar a ser forte para suportar a distância. Te amo muito.

À Ludmila, por ter me ensinado a ser uma pessoa melhor, por ter me adotado como mamis e por me deixar fazer parte da sua família. Lud, obrigada pela amizade, pela sinceridade em cada palavra, pelo carinho em cada sorriso e pela compreensão nos momentos difíceis. Você foi um ombro quando precisei e teve paciência para me ouvir e me aconselhar. Obrigada principalmente pelas comidas. Sinto saudades de tudo, mas sei que nossa amizade é sincera e a distância não a apagará.

À Thaís, pela amizade sincera, pelo carinho demonstrado nos pequenos gestos e por me fazer refletir muito com seus questionamentos: “mas como assim? Por quê?” Thatá obrigada pela constante companhia, pela compreensão, pelas risadas. Você soube entender meus momentos de silêncio e de alegria sendo generosa nos conselhos o que traça o perfil de uma amizade verdadeira. Saiba que a vida longe dos seus questionamentos não tem tanta graça.

Às filhas do meu coração: Beleza, pelo bom humor, carinho e companheirismo; Flávia pelas risadas, amizade e disponibilidade; Laiane pelo desespero de sempre, pelo bom humor e amizade.

A Natália, por me acompanhar durante o doutorado, por estar presente nos experimentos e me ajudar a conquistar os resultados que geraram a tese. Obrigada Nat pelos bons momentos que passamos, pelo empenho e saiba que

muito dessa tese eu devo a você, principalmente a parte de anatomia que você conduziu juntamente com a Adriana.

Aos amigos que entraram comigo no mestrado e me acompanharam no doutorado: Letícia, Rafa, Raoni e Ju.

Aos amigos de Lavras: Paulo e Renata, Pedro e Rafa, Cristovam e Jaque e Jerônimo e Fran. Obrigada amigos pelos momentos de descontração. Sinto falta das nossas reuniões.

Aos amigos do laboratório de Citogenética, pelo convívio harmonioso, pela colaboração sempre que solicitada e pelo companheirismo. Um obrigada especial à Kátia pela companhia nas disciplinas e pela ajuda na parte experimental, à Rose pela excelente convivência, pelas conversas e boas risadas e à Fer pela sinceridade, bom humor e ajuda nos experimentos

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia pela boa convivência e pelos ensinamentos.

Aos amigos e colegas do GEN.

Aos novos amigos, mas que me acompanharam na reta final do doutorado Fábio, Gal e Ellis. Obrigada Gal pelo apoio fundamental nessa nova etapa da minha vida.

“Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso
porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte mais feliz quem sabe só levo a certeza
de que muito pouco eu sei, ou nada sei
Penso que cumprir a vida seja simplesmente compreender a marcha
e ir tocando em frente
Cada um de nós compõe a sua história e cada ser em si
carrega o dom de ser capaz
e ser feliz.”

(Almir Sater e Renato Teixeira)

RESUMO

As espécies de *Piper* da Amazônia Brasileira têm despertado grande interesse por causa dos componentes de seus óleos essenciais, os quais têm amplo uso na indústria química e farmacêutica. Dentre elas se destaca a pimenta longa (*P. hispidinervum*), rica em safrol. O melhoramento genético dessa espécie, desenvolvido pela Embrapa Acre, pode ser facilitado por informações relativas ao genoma, às características do grão de pólen e da anatomia foliar das espécies envolvidas. O objetivo deste trabalho foi descrever e comparar características citogenéticas, palinológicas e de anatomia foliar de espécies *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*, pertencentes ao Banco de Germoplasma da Embrapa Acre. As informações geradas devem ter aplicação direta na manipulação do germoplasma dessas espécies, podendo auxiliar na elucidação das questões taxonômicas que as envolve. *P. aduncum* e *P. hispidinervum* apresentaram $2n=26$ cromossomos, porém, apresentaram variações no cariótipo e na quantidade de DNA. *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* apresentam algumas anormalidades meióticas que levaram a um índice meiótico (cerca de 75%) desfavorável para o melhoramento. As espécies diferiram quanto à viabilidade polínica, sendo que *P. affinis hispidinervum* apresentou o menor valor (9,1%). Os grãos de pólen apresentaram certa homogeneidade, porém características da ornamentação da exina e de abertura permitiram a diferenciação das espécies, mostrando que *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum* são mais próximas. Um dendograma baseado em Distância Euclidiana com todas as características anatômicas das folhas de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* analisadas revelou maior proximidade de *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum*, conforme observado também para as características polínicas. Os dados em conjunto corroboram as hipóteses de que *P. aduncum* e *P. hispidinervum* são espécies distintas e que *P. affinis hispidinervum* é um híbrido entre as duas.

Palavras-chave: Cariótipo. Grãos de pólen. Anatomia foliar. Melhoramento genético. Piperaceae

ABSTRACT

The *Piper* species of Brazilian Amazonia have been calling attention because of the composition of their essential oils, which have many applications in chemical and pharmaceutical industry. One of the most important is *Piper hispidinervum*, known as “pimenta longa”, because of the high content of safrol in its oil. The breeding program of this species, developed by Embrapa Acre, can be assisted by information on the genome, the characteristics of pollen grain and leaf anatomy of the species involved. The objective of this study was to describe and compare cytogenetic characteristics, pollen and leaf anatomy of *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*, belonging to the Germplasm Bank of Embrapa Acre. The information generated should directly assist the breeding program and help to solve the taxonomic controversies involving these species. Both *P. aduncum* and *P. hispidinervum* showed $2n = 26$ chromosomes, but were different for chromosome morphology and nuclear DNA amount. *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* and *P. hispidinervum* showed some abnormalities that can lead to a meiotic index (about 75%) not so favorable for breeding purposes. Pollen grain viability was different among species and *P. affinis hispidinervum* had the lowest index (9.1%). Pollen grains morphology was mainly similar, but exin ornamentation and characteristics of aperture allowed to differentiating among the species, revealing that *P. aduncum* and *P. affinis hispidinervum* are closer. A dendrogram based on Euclidean Distance with all the leaf anatomical characteristics analysed showed that *P. aduncum* and *P. affinis hispidinervum affinis* are closer. The data corroborates the hypothesis of taxonomic distinction between *P. aduncum* and *P. hispidinervum* and of the hybrid nature of *P. affinis hispidinervum*, having the other two species as parental genotypes.

Keywords: Piperaceae. Karyotype. Pollen grain. Leaf anatomy. Plant Breeding

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Espécies de <i>Piper</i> como fonte alternativa de safrol e outros princípios ativos	15
2.2	Caracterização citogenética e conteúdo de DNA do gênero <i>Piper</i>	17
2.3	Tratos palinológicos na caracterização vegetal	23
2.4	Características anatômicas do gênero <i>Piper</i>	25
	REFERÊNCIAS	29
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	37
	ARTIGO 1 Cariótipo e quantidade de DNA nuclear de <i>Piper aduncum</i> L. e <i>Piper hispidinervum</i> C.DC	37
	ARTIGO 2 Meiose e palinologia de três espécies do gênero <i>Piper</i> L.	63
	ARTIGO 3 Anatomia foliar, padrão de venação e histoquímica de três espécies do gênero <i>Piper</i> L. (Piperaceae)	94

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A flora brasileira é uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas (OLIVEIRA et al., 2006). Entre essas substâncias com maior potencialidade econômica destacam-se os óleos essenciais, os corantes naturais, os fitoterápicos, as resinas e as fibras (FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006). Portanto, a bioprospecção é uma iniciativa de grande importância para a exploração sustentável da ampla diversidade de plantas ainda pouco conhecida.

Na década de 70, um programa de bioprospecção de plantas aromáticas da Amazônia, realizado pela Embrapa Acre e coordenado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), identificou a pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.), Piperaceae, que despertou o interesse dos pesquisadores pelo alto teor de safrol em seu óleo essencial. Essa substância tem elevado valor comercial, pois é muito demandado pelas indústrias químicas para utilização em fragrância e bioinseticidas. A extração do safrol era realizada apenas pelo corte da canela de sassafrás (*Ocotea pretiosa*), Lauracea, o que levava à morte da planta. O abate extensivo levou o IBAMA a proibir, no início da década de 90, o corte e extração do óleo na espécie devido ao risco de extinção (SILVA; OLIVEIRA, 2000).

A Embrapa Acre criou um banco de germoplasma e implementou um programa de melhoramento de *P. hispidinervum*. No entanto, algumas plantas morfológicamente semelhantes a esta espécie foram coletadas durante a bioprospecção. A identificação dessas plantas realizada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro constatou que se tratavam das espécies: *Piper aduncum* L. e *Piper affinis hispidinervum* C.DC.. Como o interesse era em espécies com potencial para produção do safrol realizou-se a triagem dessas espécies com

relação à composição do óleo essencial. Essas análises mostraram que *P. aduncum* apresenta teor de safrol entre 0,10 e 3,24% e *P. affinis hispidinervum* 18,4 % e *P. hispidinervum*, de 87 a 97% do óleo essencial (SILVA; OLIVEIRA, 2000; BIZZO et al., 2001).

Um problema enfrentado na manipulação do Banco de Germoplasma é a controvérsia taxonômica entre essas três espécies, as quais diferem basicamente pela composição do óleo essencial. Existe a hipótese de que *P. hispidinervum* seja, na realidade, uma variedade de *P. aduncum*. Essa hipótese se baseia na elevada similaridade morfológica entre as duas espécies e no fato de *P. aduncum* ter uma ampla distribuição no Brasil enquanto *P. hispidinervum* está restrita ao estado do Acre (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004). *P. affinis hispidinervum* foi assim classificada por se assemelhar muito a *P. hispidinervum* o que dificultou a correta identificação dessas plantas.

Nesse sentido, a análise citogenética pode subsidiar o programa de melhoramento da Embrapa Acre, auxiliando na elucidação das questões taxonômicas envolvendo as espécies de *Piper* existentes no Banco de Germoplasma. Os estudos citogenéticos em *Piper* revelam uma ampla variação de número cromossômico entre e dentro das espécies, o que gera controvérsias a respeito do número básico do gênero (DASGRUPTA; DATTA, 1976, JOSEPH; JOSEPH; JOSE, 1999; JOSE; SHARMMA, 1985; NUNES et al., 2007; SAMUEL; BAVAPPA, 1981; SAMUEL; MORAWETZ, 1989). As estimativas de quantidade de DNA das espécies do gênero confirmam essa variação no tamanho genômico (SAMUEL et al., 1986).

Outra informação citogenética importante para o melhoramento genético é o conhecimento da estabilidade meiótica, pois permite a escolha de genótipos com melhor potencial para produção de pólen viáveis. Esse potencial de escolha pode ser melhor previsto por meio do estudo da viabilidade polínica. O estudo da morfologia do pólen também pode ser útil para contribuir no

entendimento da relação taxonômica entre *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*.

Outra abordagem para melhor distinção entre essas espécies é a caracterização anatômica das folhas. Algumas espécies do gênero já tiveram a anatomia foliar descrita (ALBIERO et al., 2005a, 2005b, 2006; NASCIMENTO; VILHENA-POTIGUARA, 1999; SOUZA; MOSCHETA; OLIVEIRA, 2004; VIANNA; AKISUE, 1997), as quais aliadas à descrição morfológica contribuem para a diferenciação dessas espécies como é o caso de *P. hispidum* e *Piper crassinervium* (ALBIERO et al., 2005a, 2005b, 2006).

Portanto, o objetivo desse trabalho foi descrever e comparar as espécies *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* com relação às características do complemento cromossômico, à estabilidade do comportamento meiótico e produção de pólenes viáveis, às características morfo-polinicas e à anatomia foliar.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécies de *Piper* como fonte alternativa de safrol e outros princípios ativos

O Brasil é o país com a maior diversidade biológica do mundo. A proporção estimada de espécies brasileiras é de 9,5% do total mundial, com uma biota conhecida entre 170 e 210 mil espécies. A estimativa é que o país abrigue 1,8 milhões de espécies (LEWINSOHN; PRADO, 2005). Toda essa biodiversidade estimada tem um importante potencial de desenvolvimento sócio-econômico para o país, como fonte de corantes, óleos vegetais, gorduras, fitoterápicos, antioxidantes e óleos essenciais para o setor produtivo. Industrialmente os óleos essenciais e/ou produtos derivados são empregados como matérias-primas para as indústrias de higiene e limpeza, alimentos e bebidas, farmacêutica e cosmética (FERRO, 2006; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDUSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS, 2011).

Dentre as diferentes substâncias reveladas por pesquisas de bioprospecção vegetal em biomas brasileiros, podemos destacar o safrol. Essa substância é um fenil éter muito requisitado pela indústria química devido a dois derivados: a heliotropina, amplamente utilizada como fragrância; e o butóxido de piperonila (PBO), um ingrediente essencial para inseticidas biodegradáveis à base de piretrum (ROCHA; MING, 1999).

No Brasil, o óleo essencial contendo safrol foi extensivamente extraído da canela sassafrás (*Ocotea pretiosa*), a partir de 1939, por meio da destilação da madeira, com produção de óleo contendo até 84% de safrol (ROCHA; MING, 1999). De 1940 a 1960 o país foi o maior exportador mundial de óleo de sassafrás, porém a exploração indiscriminada de canela levou a um declínio na

produção, fazendo com que no final dos anos 80 os níveis de exportação brasileira caíssem consideravelmente (WADT, 2001).

Em 1991, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) proibiu o corte de *O. pretiosa* em florestas primárias da Mata Atlântica devido ao risco iminente de extinção dessa espécie. Essa situação, aliada às restrições do governo chinês à exploração do safrol, ocasionou uma queda na oferta mundial desta substância, elevando o preço do quilo de óleo essencial que a contém de US\$ 4,00 em 1990 para US\$ 13,00 em 91, e US\$ 20,00 em 1992 (GRAN PAGE, 1992). No fim da década de 90, já havia a preocupação do setor industrial com a oferta mundial de safrol, pois, assim como o Brasil, os outros exportadores (China e Vietnã) também enfrentavam o risco de esgotamento a curto e médio prazos, em função do método destrutivo de obtenção (ROCHA; MING, 1999).

A descoberta da pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) como uma espécie promissora para a obtenção de safrol se deu na década de 70, por meio do programa de triagem de plantas aromáticas da Amazônia, coordenado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (WADT EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004).

Ao contrário do sistema de extração dos óleos essenciais da canela sassafrás (Lauraceae), nos quais sempre havia destruição da fonte, o processo de obtenção de safrol a partir da pimenta longa é sustentável, pois a extração do óleo se dá usando folhas e ramos finos sem a destruição da planta, possibilitando sua rebrota (SILVA, 1993). Outro fator que torna *P. hispidinervum* interessante é o fato de o rendimento de óleo ser em média 3 a 4% contra 1% em *O. pretiosa* (WADT, 2001).

Outra espécie que também foi descoberta por meio do programa de triagem de plantas aromáticas da Amazônia é *Piper aduncum* L., popularmente conhecida como pimenta de macaco. Muito semelhante à *P. hispidinervum* esta

espécie possui um alto teor de óleo essencial (2,5 a 4%), rico em dilapiol (SILVA; OLIVEIRA 2000). Este componente do óleo é um éter fenílico que vem sendo testado com êxito como fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida, larvicida e inseticida com a vantagem de ser um produto biodegradável (ESTRELA et al., 2006; LOBATO et al., 2007; SILVA, 1993).

No entanto, alguns taxa coletados no programa de triagem não puderam ser identificados corretamente, pois se assemelham muito a *P. hispidinervum* e *P. aduncum*. A identificação das exsicatas desses taxa foi realizada no Jardim Botânico que os classificou como *P. affinis hispidinervum* C. DC (WADT, 2001). Bizzo et al. (2001) analisaram o óleo essencial obtido das folhas de *P. affinis hispidinervum* e identificaram dezesseis substâncias, correspondendo a 98,9% do óleo. O principal componente (74,3%) foi o sarisan, seguido pelo safrol (18,4%).

No Brasil, existem cerca de 76 espécies descritas de *Piper*, sendo que a região norte apresenta o maior número de espécies, havendo uma grande diversidade do gênero no estado do Acre (EHRINGHAUS, 1997). No entanto, o número de espécies brasileiras do gênero é contraditório para muitos pesquisadores, havendo grande dificuldade na delimitação de alguns taxa que se mostram muito semelhantes, como é o caso de *P. hispidinervum* e *P. aduncum*. Para Youncker (1972), *P. hispidinervum* é uma espécie distinta de *P. aduncum*, enquanto Silva (1993) sugere que *P. hispidinervum* é um quimiotipo de *P. aduncum*, visto que ambas as espécies se diferem principalmente na concentração dos componentes de seus óleos essenciais.

2.2 Caracterização citogenética e conteúdo de DNA do gênero *Piper*

O número de cromossomos é uma ferramenta útil na sistemática e evolução das plantas, complementando dados morfológicos e moleculares, por

detectar variações de ploidia e outras alterações importantes no genoma que nem sempre são visíveis por outras abordagens. A contagem cromossômica é uma tarefa relativamente fácil e que produz dados confiáveis (GUERRA, 2008).

Há muita controvérsia sobre o número cromossômico básico do gênero *Piper*. Segundo Dasgupta e Datta (1976), das 15 espécies de *Piper* até então estudadas, 47,3% apresentam $x=12$ e 19,04% $x=13$ cromossomos. Entre as espécies com $x=12$ cromossomos estão *P. longum*, *P. cubeba* e *P. subpelatum*. *P. nigrum* apresentou variação no número cromossômico básico, uma vez que foram encontrados $2n=26$, 52 e 104 cromossomos, valores que apontam o número básico de $x=13$ e $2n=36$ e 48 e 60 cromossomos, indicando número básico $x=12$. Ainda os mesmos autores, estudando sete espécies do gênero *Piper* observaram que seus cromossomos são muito pequenos, na maioria delas múltiplos de $x=12$, embora múltiplo de $x=8$ tenha sido encontrado em *P. betle* ($2n=64$). Para *P. nigrum* foram relatados $2n=36$ e $2n=60$, confirmando trabalhos anteriores onde $x=12$ parece ser o número básico da espécie.

Jose e Sharmma (1985) estudaram 53 taxa de Piperaceae, incluindo oito espécies de *Piper*. Os autores verificaram variação no número somático de $2n=24$ a $2n=195$ cromossomos. Com exceção de *P. cubeba*, que apresentou $2n=24$, todas as outras foram derivadas de $x=13$. As variedades de *P. betle* ($2n=42$, 52 , 58 , 78 , 195) avaliadas exibiram uma série poliplóide sendo que a maioria apresentou $2n=78$, embora uma variação numérica dentro do mesmo indivíduo tenha sido observada em muitas variedades.

Um estudo da evolução cromossômica de três gêneros de Piperaceae (*Piper*, *Peperomia* e *Potomorphe*) foi realizado por Samuel e Morawetz (1989). Dos gêneros avaliados, *Piper* apresentou os menores cromossomos, número básico $x=13$ e núcleo interfásico procromossomal. As espécies do gênero exibiram uma série poliplóide com números cromossômicos variando de $2n=26$, $2n=52$ e $2n=65$. Com o número básico $x=11$, *Peperomia* apresentou maiores

cromossomos que *Piper* e *Potomorphe*, sendo que neste último gênero o número básico encontrado foi $x=13$ cromossomos. Portanto, segundo os autores, a evolução cromossômica em *Piper* e *Peperomia* se dá dos cromossomos médios para os menores e os gêneros apresentam diferenças cariotípicas e de núcleos interfásicos que os distinguem, indicando que os dados citogenéticos são importantes complementos para a taxonomia dos gêneros de Piperaceae.

Embora a maioria das espécies de *Piper* apresente um número básico $x = 13$, trabalhos indicam que algumas espécies apresentam $x = 12$. Não há, portanto, um consenso a respeito do número básico do gênero, visto que um número pequeno de espécies foi estudado citogeneticamente até o momento (DASGRUPTA; DATTA,1976; SAMUEL; BAVAPPA, 1981; JOSE; SHARMMA,1985; SAMUEL; MORAWETZ,1989, JOSEPH et al. 1999, NUNES et al. 2007). Outro fato interessante que vem sendo estudado é a presença de citotipos e de indivíduos que apresentam mixoploidia. Nair (2007) observou variação no número cromossômico de *P. magnificum* em suas preparações citológicas. O autor observou que as metáfases numa mesma lâmina variavam de $2n = 22-28$, sendo que o número cromossômico mais frequente observado foi $2n = 26$, número este relatado para a espécie em trabalhos anteriores.

Além da descrição do número somático, alguns autores apresentam outras características cariológicas para espécies do gênero (DASGRUPTA; DATTA,1976; JOSEPH; JOSEPH; JOSE, 1999; JOSE; SHARMMA, 1985; NUNES et al., 2007; SAMUEL; MORAWETZ,1989; SHARMA; BHATTACHARYYA, 1959). Joseph, Joseph e Jose (1999) caracterizaram os cromossomos de três espécies de *Piper* (*P. colubrinum*, *P. magnificum* e *P. nigrum*) como relativamente pequenos, (de 0,32 a 2,46 μm), metacêntricos ou submetacêntricos, sendo seus cariótipos considerados simétricos. Os autores relatam que as espécies diferem nos cariótipos, o que sugere que as alterações

estruturais muito pequenas que afetam seus cromossomos foram importantes para a evolução.

Resultados semelhantes foram obtidos por Jose e Sharmma (1985) ao estudarem oito espécies de *Piper*, as quais, com exceção de *P. cubeba*, apresentaram uniformidade cariotípica onde os cromossomos diminuíram de tamanho progressivamente e eram metacêntricos ou submetacêntricos. Variações cariotípicas inter e intraespecífica com relação ao número de pares cromossômicos com constrição secundária também foram observadas. A variação intraespecífica ocorreu em *P. betle* na qual as variedades analisadas apresentaram de 1 a 4 pares. Em *Piper attenuatum* ($2n=52$) três pares foram relatados enquanto que em *P. nigrum* ($2n=104$ com variação de $2n=17, 26, 33, 44$), *P. longum* ($2n=52$ com variação de $2n=26$), *P. chaba* ($2n=104$ com variação $2n=26, 52, 64, 76$) dois pares de cromossomos apresentaram constrição secundária.

Samuel e Morawetz (1989) estudaram o padrão de distribuição da heterocromatina através do bandeamento C de três gêneros de Piperaceae: *Piper*, *Peperomia*, e *Pothomorphe*. *Piper* e *Peperomia* apresentaram variação cromossômica entre as espécies estudadas. Em *Pothomorphe* apenas uma espécie foi investigada a qual apresentou $2n=26$ cromossomos. *Piper* apresentou pelo menos uma banda heterocromática proximal em cada cromossomo. O tamanho dessas bandas dentro de um cariótipo variou desde muito pequeno (dificilmente definidos) até grandes blocos ocupando mais de 30% de um único cromossomo. Esse padrão difere do encontrado para *Pothomorphe*, que exhibe dois cromossomos com grandes blocos heterocromáticos, similares aos maiores blocos em *Piper*. Os demais cromossomos de *Pothomorphe* apresentaram quantidades insignificantes de heterocromatina. Já *Peperomia* apresentou grandes blocos de heterocromatina em quatro cromossomos, similares em tamanho aos de *Piper*, porém a posição dessas bandas é terminal em contraste

com *Piper* onde estas são proximais. Oito cromossomos exibiram bandas proximais e os 10 cromossomos restantes não tiveram quantidades significativas de heterocromatina.

No Brasil, apenas duas espécies de *Piper* (*P. hispidinervum* e *P. aduncum*) foram caracterizadas citogeneticamente, as quais apresentaram $2n=24$ e morfologia muito similar (NUNES et al., 2007). Essa similaridade cariotípica, apesar de não ser conclusiva, pode contribuir com a hipótese que trata *P. hispidinervum* como uma variedade de *P. aduncum*, com distribuição geográfica restrita.

Para ajudar a esclarecer o número cromossômico básico do gênero, o estudo da meiose apresenta-se como ferramenta útil além da compreensão do comportamento dos cromossomos durante a divisão meiótica. Todo o processo de meiose está sob controle genético e as anormalidades durante as fases deste processo podem resultar em grãos de pólen inviáveis (ANDRADA; LOZZIA; CRISTOBAL, 2009; DAMASCENO JUNIOR et al., 2010; MARTINS et al., 2010, SINGH, 2003). Andrada, Lozzia e Cristobal (2009), ao estudarem o comportamento meiótico de *Piper tucumanum* e *Piper hieronymi*, observaram irregularidades cromossômicas como anáfase I com ponte, telófase I com três núcleos, sendo um menor que os demais, além de cromossomos com posicionamento incorreto em anáfase II. Essas irregularidades levaram à formação de díades, tríades e pântades. A viabilidade dos grãos de pólen em *P. hieronymi* foi afetada sendo de 77,8%.

A determinação da viabilidade do pólen é uma excelente ferramenta no estudo das plantas, pois além de evidenciar a potencialidade reprodutora masculina, contribui em estudos ecológicos, fornecendo informações básicas para a conservação genética, bem como o melhoramento ou cultivo das espécies (BRUCKNER et al., 2000; EINHARDT; CORREA; RASEIRA, 2006, FRITSCHÉ NETO et al., 2008; SILVA; LEITE; BRAZ, 2000).

Em um programa de melhoramento, os principais fatores para o sucesso são a seleção e o intercruzamento dos genótipos superiores. A eficiência dos cruzamentos depende da estabilidade meiótica e da viabilidade do pólen (TECHIO et al., 2006). O estudo do comportamento meiótico e da viabilidade gamética pode identificar os acessos e progênies estáveis e possíveis genitores que tenham a capacidade de produzir grande quantidade de sementes viáveis (KANESHIMA et al., 2007).

Compreender a variação do conteúdo de DNA nuclear entre espécies de plantas é um passo essencial em direção a um melhor conhecimento da sua evolução e diversificação (GARCIA et al., 2010). Nas angiospermas, os valores C variam até 600 vezes, de menos de 0,2 pg em *Arabidopsis thaliana* a 127,4 pg em *Fritillaria assyriaca* (BENNET; LIETCH, 1997). Dentro de gênero, a variação no valor C muitas vezes está relacionada com diferença no nível de ploidia, sendo também observada entre espécies de mesmo nível de ploidia, devido a alterações estruturais do genoma. Em *Eucomis L'Her* (Hyacinthaceae), no grupo de sete espécies diplóides o valor 2C variou de 21 a 31 pg nas espécies diplóides, ou seja, 50% de incremento, enquanto a diferença entre o menor genoma diplóide e o maior tetraplóide foi de 40pg, aproximadamente 10^{10} pares de bases (ZONNEVELD; DUNCAN, 2010).

Segundo Dolezel (1997) a quantificação do conteúdo de DNA via citometria de fluxo pode ser uma ferramenta útil para o melhoramento de plantas uma vez que permite monitorar a estabilidade do nível de ploidia, identificar haplóides e duplohaplóides, além de identificar novos níveis de ploidia como resultados de cruzamento.

Vários são os trabalhos onde a citometria de fluxo é empregada para determinar a quantidade de DNA nuclear (ADOUKONOU-SAGBADJA et al., 2007; CAMPOS et al., 2011; KOUTOLIS et al., 2005; MIYABAYASHI et al., 2007; SCHMIDT-LEBUHN et al., 2011). Samuel, Smith e Bennett (1986)

determinou a quantidade de DNA em nove espécies de *Piper* do Novo e do Velho Mundo, cultivadas e selvagens. A quantificação foi realizada por densitometria por Feulgen e a análise dos núcleos foi em G2 (4C). A variação foi de 2,73 pg nos tetraplóide a 9,86 pg nos octaplóides. A variação nas diplóides silvestres foi de 4,86 a 8,44 pg.

2.3 Tratos palinológicos na caracterização vegetal

Assim como a citogenética, a palinologia tem sido extensivamente utilizada para a caracterização da biodiversidade vegetal (LISBOA, 2009). O valor dos caracteres morfológicos do pólen no entendimento da filogenia de plantas tem sido reconhecido e o padrão evolutivo de configurações de abertura, em particular, é altamente congruente com as filogenias moleculares recentes (FURNESS; RUDALL; SAMPSON, 2002; BLACKMORE et al., 2007).

Na taxonomia vegetal, a palinologia tem contribuído imensamente na delimitação de taxa. Exemplo são os estudos de *Passiflora* L. ocorrentes no Brasil. Milward-de-Azevedo et al. (2010) ao estudarem 21 taxa de *Passiflora* L. subg. *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) observaram variação no tamanho e na classificação do pólen, além da exina de um dos taxa se diferenciar das demais. Assim, segundo os autores, diversas características polínicas têm se mostrado de valor diagnóstico específico para a taxonomia do subgênero *Decaloba*, como número de colpos, mesocolpos, presença ou ausência de endoabertura, retículos com muros sinuosos ou retos e comprimento dos colpos.

Com o desenvolvimento da microscopia eletrônica de varredura, transmissão e a melhoria dos microscópios de luz, inúmeros detalhes das mais diversas características polínicas têm sido obtidos em diferentes grupos de plantas. Alguns destes trabalhos têm indicado que vários tratos palinológicos podem apresentar correlação com a ploidia, morfologia dos cromossomos e

tamanho do genoma das espécies (FERREIRA et al., 2010; MEDINA et al., 1958; RAMSEY; SCHEMSKE, 1998).

Os grãos de pólen das angiospermas exibem uma vasta gama de variação em todos os caracteres morfológicos (WALKER; DOYLE, 1975) e o número de aberturas exemplifica bem essa variação. A ontogênese do padrão de abertura é correlacionada com as citocineses que ocorrem durante a divisão meiótica e que produzem os micrósporos (KUPRIANOVA, 1967). Cada tipo de citocinese (simultânea ou sucessiva) determinará o número de aberturas. A determinação do local da abertura se dá nas áreas onde a citocinese é concluída (área de convergência) (RESSAYRE et al., 2002).

Nas angiospermas basais a relação entre padrões de citocinese e abertura é altamente lábil. Várias angiospermas basais tem aparentemente padrões de desenvolvimento intermediários e, portanto, não se encaixam facilmente em qualquer uma das categorias simultâneas ou sucessivas (FURNESS; RUDALL; SAMPSON, 2002). Nessas angiospermas o pólen é predominantemente monosulcado ou derivado de monosulcado (por exemplo, com o sulco reduzido a um dos poros), com a abertura geralmente situada no pólo distal. A falta de uma abertura bem definida (inaperturado) também é comum (FURNESS; RUDALL, 2004).

Com relação à palinologia do gênero *Piper*, poucos são os trabalhos existentes na literatura. Segundo Lei e Liang (1998), o grão de pólen da maioria das espécies de *Piper* encontradas na Ásia, principalmente na Índia e China, apresentam tamanho pequeno, com uma ornamentação variando de verrucada a semiverrucada. Segundo os autores, tais características são muito semelhantes à morfologia polínica de dois outros gêneros de Piperaceae: *Peperomia* e *Pothomorphe*. No entanto, características obtidas com microscopia eletrônica puderam separar bem os três gêneros, principalmente devido à diferença na ultraestrutura da parede polínica (exina) nestes três grupos.

Bauermann, Evaldt e Castelo Branco (2009) realizaram um levantamento da flora da região do Vale do Rio Caí (Brasil) e elaboraram um atlas da diversidade polínica com material polínifero extraído de plantas nativas férteis daquela coleção. Entre as espécies estudadas encontrou-se *P. gaudichaudianum*, *P. miquelianum* e *P. xylosteoides* que apresentaram grãos de pólen pequenos, com tamanho variando de 8 a 16 μm , todos monocolpados e com exina escabrada.

Essa descrição para o gênero é semelhante à apresentada no trabalho de Barth e Barbosa (1975), que caracterizaram a morfologia polínica de Piperaceae. Segundo os autores, *P. gaudichaudianum*, *P. lindbergii*, *P. richardiaefolium* apresentam grãos de pólen muito semelhantes entre si. Os grãos de pólen de *P. gaudichaudianum* são heteropolares e de superfície ondulada. A abertura única corresponde a uma área apertural larga e alongada, em geral em forma de um colpóide coberto por numerosas granulações de ectoexina. A ectoexina é representada por uma formação semelhante a um teto bastante ondulado, onde os báculos são indistintos e as depressões correspondem a pequenos pontos. A espessura da exina nas três espécies varia de 0,9 - 1,4 μm e os diâmetros polares e equatorial variam de 10 a 19,5 e 7 a 16,5 μm , respectivamente.

2.4 Características anatômicas do gênero *Piper*

A morfologia das folhas sempre desempenhou papel importante na sistemática vegetal como um todo, particularmente para caracterizar e identificar *taxa* onde a variação nas estruturas florais não é informativa (STACE, 1989). Alves et al. (2002) apresentaram características da anatomia foliar com maior relevância taxonômica para 10 espécies do gênero *Hypolytrum*. Entre essas características destacam-se o formato da folha em secção transversal, presença de grânulos em células epidérmicas, aspectos da cutícula, da hipoderme e do

parênquima lacunoso; número de camadas e origem (hipodérmica e epidérmica) das células buliformes. Os estudos de anatomia foliar mostraram-se relevantes na delimitação do gênero e das espécies porém não apoiam as secções taxonômicas estabelecidas.

Aliada a outras características anatômicas e morfológicas, a compreensão da arquitetura das folhas, através da diafanização, pode fornecer importantes subsídios taxonômicos. Fonseca, Proença e Gonçalves (2006) ao testar a técnica de diafanização como ferramenta taxonômica no gênero *Spathicarpa* observaram que das quatro espécies estudadas, somente *Spathicarpa lanceolata* Engl. apresenta características vegetativas diagnósticas, não sendo possível diferenciar, com base somente na arquitetura foliar, as demais espécies.

Na ordem Piperales o hábito de crescimento é predominantemente herbáceo (BARROSO, 1986). Incluída nesta ordem encontra-se Piperaceae, ervas eretas ou escandentes, subarbustos, arbustos ou pequenas árvores, terrestres ou epífitas. As folhas dessa família são estipuladas, alternas, opostas ou verticiladas, sésseis ou pecioladas, inteiras, de consistência e formas as mais diversas. Os tricomas são muito variados, geralmente dotados de células secretoras translúcidas (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004).

Características anatômicas de espécies de *Piper* tem sido descritas por diversos autores (ALBIERO et al., 2005a, 2005b, 2006; NASCIMENTO; VILHENA-POTIGUARA, 1999; SOUZA; MOSCHETA; OLIVEIRA, 2004; VIANNA; AKISUE, 1997). Albiero et al. (2005a) descreveram anatomicamente *P. gaudichaudianum* que apresenta folhas simples, alternas, pecioladas e estipuladas. O limbo tem formato ovado-elíptico, de base oblíqua e de ápice cuspidado. Os autores também relatam folha hipoestomática, sendo a epiderme unisseriada, com tricomas tectores e glandulares os quais têm ocorrência mais abundante na região que recobre as nervuras. Na face abaxial do limbo e no

bordo ocorrem uma ou duas camadas subepidérmicas de natureza parenquimática, onde pode ocorrer, inclusive, idioblastos oleíferos. Essa camada subepidérmica também ocorre na face adaxial, nas proximidades da região do bordo.

Albiero et al. (2006) ao estudarem a morfoanatomia de *P. hispidum* relatam folhas alternas, simples, curtamente pecioladas, inteiras, de formato ovado, apresentando limbo assimétrico com 15,0-17,0 cm de comprimento e 10,0-12,0 cm de largura. A coloração é verde-escura na face adaxial e verde-clara abaxialmente. A folha foi classificada como hipoestomática, com presença de estômatos tetracíticos e raros anisocíticos. Três tipos de tricomas tectores são observados: curto unicelular, curto pluricelular e longo pluricelular. Apenas um tipo de tricoma glandular ocorre, apresentando pedúnculo unicelular e célula secretora de formato ovóide inclinada sobre a epiderme.

P. aduncum é um arbusto com ramos pubescentes com pecíolo de 0,2 a 0,4 cm de comprimento, sem bainha; folhas elípticas ou lanceoladas, com aproximadamente 20 cm de comprimento e 7 cm de largura; ápice acuminado e base redonda ou cordada; áspera nas faces dorsal e ventral (SILVA; OLIVEIRA 2000).

Segundo Vianna e Akisue (1997), esta espécie possui folhas com filotaxia alterna e formato oval-lanceoladas, agudas, inteiras, apresentando limbo com 10 a 15 cm de comprimento por 6 a 7,5 cm de largura. Na superfície adaxial, o limbo é verde escuro e com depressões nas regiões das nervuras, enquanto na superfície abaxial é verde mais claro, com aspecto faveolado devido às nervuras serem proeminentes. Ambas as superfícies são pubescentes com consistência membranácea e flexível.

As superfícies adaxial e abaxial das folhas de *P. aduncum* possuem células epidérmicas de formato bastante variado como poligonal, cúbicas e retangulares, alongadas, com contorno liso e recoberta por cutícula delgada

(DOUSSEAU, 2009). A autora observou também presença de estômatos apenas na superfície abaxial, sendo a folha classificada como hipoestomática, com seus complexos estomáticos do tipo tetracítico. Vianna e Akisue (1997) encontraram estômatos anomocíticos além dos tetracíticos. Dousseau (2009) também observou tricomas tectores e glandulares distribuídos em ambas as superfícies do limbo.

Silva e Oliveira (2000) descrevem esta espécie como arbustiva, com ramos não-pubescentes, com pecíolo variando de 0,1 a 0,2 cm de comprimento, de folhas oblongo-lanceoladas ou oblongoelípticas, variando de 14,5 a 22 cm de comprimento e de 4 a 4 cm de largura; ápice acuminado a levemente cuspidado; base oblíqua a inequilátera; folhas levemente ásperas na face ventral.

Nascimento e Vilhena-Potiguara (1999) classificam a folha dessa espécie como anfiestomática, pois verificaram a presença de estômatos na face abaxial e, embora rara, na face adaxial. Na face adaxial observa-se que as células epidérmicas possuem paredes retas ou ligeiramente curvas, são de diferentes tamanhos e em sua maioria, poliédrica. Os estômatos são raros nesta epiderme e entre as células epidérmicas encontra-se tricomas secretores e tectores. Na superfície abaxial os estômatos são mais abundantes em relação aos tricomas secretores, tectores e de células oleíferas. Eles variam quanto à forma em ciclocíticos, anisocíticos e tetracíticos, predominando este último. Na região mediana da nervura central a epiderme da face adaxial apresenta células irregulares, maiores que as da face abaxial. Subjacente a esta ocorre uma hipoderme formada de duas a três camadas de sem conteúdo, seguindo-se o parênquima paliçádico que é bisseriado, conectando-se com o parênquima lacunoso.

REFERÊNCIAS

- ADOUKONOU-SAGBADJA, H. et al. Flow cytometric analysis reveals different nuclear DNA contents in cultivated fonio (*Digitaria* spp.) and some wild relatives. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 267, n. 1/4, p. 163–176, Sept. 2007.
- ALBIERO, A. L. M. et al. Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 24, n. 4, p. 550-554, jul. 2005a.
- ALBIERO A. L. M. et al. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H.B.&K. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 19, n. 2, p. 305-312, jun. 2005b.
- ALBIERO, A. L. M. et al. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 379-391, jul./set. 2006.
- ALVES, M. V. et al. Aplicações taxonômicas da anatomia foliar das espécies brasileiras de *Hypolytrum* Rich. (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 1-9, mar. 2002.
- ANDRADA, A. R.; LOZZIA, M. E.; CRISTOBAL, M. E. Cytological studies in *Piper tucumanum* C. DC. and *Piper hieronymi* C. DC. **Lilloa: revista de botânica**, v. 46, n. 1/2, p. 3-9, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.abihpec.org.br/areatecnica_regbrasil.php>. Acessado em: 11 ago. 2011.
- BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa, MG: UFV, 1986. v. 3.
- BARTH, O. M.; BARBOSA, A. F. Catálogo sistemático dos pólenes das plantas arbóreas do Brasil Meridional: XX - Chloranthaceae e Piperaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1/2, p. 101-108, 1975.

BAUERMANN, S. G.; EVALDT, A. C. P.; CASTELO BRANCO, S. Atlas de pólen e esporos do vale do Rio Caí, RS, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 5, p. 895-905, set./out. 2009.

BENNET, M. D.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: 583 new estimates. **Annals of Botany**, London, v. 80, n. 2, p. 169-196, 1997.

BIZZO, H. R. et al. Sarisan from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C. DC (Long pepper). **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 16, n. 2, p. 113-115, Feb. 2001.

BLACKMORE, S. et al. Pollen wall development in flowering plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 174, n. 3, p. 483-498, Apr. 2007.

BRUCKNER, C. H. et al. Viabilidade do pólen de maracujazeiro sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 47, n. 273, p. 523-531, 2000.

CAMPOS, J. M. S. de. et al. Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 291, n. 1/2, p. 133-140, Mar. 2011.

DAMASCENO JUNIOR, P. C. et al. Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. **Caryologia**, Firenze, v. 63, n. 3, p. 229-236, 2010.

DASGRUPTA, A.; DATTA, P. C. Cytotaxonomy of Piperaceae. **Cytologia**, Firenze, v. 41, p. 697-706, 1976.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznań, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

DOUSSEAU, S. **Propagação, características fotossintéticas, estruturais, fitoquímicas e crescimento inicial de *Piper aduncum* L. (Piperaceae)**. 2009. 129 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

EHRINGHAUS, C. ***Piper* spp. (Piperaceae) Use in an indigenous Kaxinawá community in Acre, Brazil: Ethnobotany, ecology, phytochemistry and biological activity**. 1997. Thesis (M.S.) - Florida International University, Gainesville, 1997.

EINHARDT, P. M.; CORREA, E. R.; RASEIRA, M. do C. B. Comparação entre métodos para testar a viabilidade de pólen de pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 5-7, abr. 2006.

ESTRELA, J. L. V. et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 217-222, fev. 2006.

FERREIRA, K. et al. Karyotype, meiotic behavior and pollen features of *Senna occidentalis*. **Biologia**, Bratislava, v. 65, n. 5, p. 789-795, Oct. 2010.

FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M.; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégicas concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, São Carlos, v. 13, n. 3, p. 489- 501, set./dez. 2006.

FONSÊCA, L. C. M.; PROENÇA, C. E. B.; GONÇALVES, E. G. Descrição do padrão de venação foliar em *Spathicarpa* Hook. (Araceae). **Acta Botanica Brasílica**, Porto Alegre, v. 21, n. 1, p. 213-221, Mar. 2006.

FRITSCH NETO, R. et al. Métodos de avaliação de pólen e influência do ácido giberélico em cruzamentos de batata. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 469-473, mar./abr. 2008.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Pollen aperture evolution – a crucial factor for eudicot success? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 1360–1385, Mar. 2004.

FURNESS, C. A.; RUDALL P. J.; SAMPSON, F. B. Evolution of microsporogenesis in Angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 163, n. 2, p. 235-260, Mar. 2002.

GARCIA, S. et al. First genome size estimations for some eudicot families and genera. **Collectanea Botánica**, Barcelona, v. 29, p. 7-16, Nov. 2010.

GRAND PAGE. **List of price of essencial oil in international market**. London: London, 1992.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 120, n. 3/4, p. 339–350, May 2008.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. **Como observar cromossomos** : um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: Funpec, 2002. p. 131.

GUIMARÃES, E.F., GIORDANO, L.C.S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. *Rodriguésia*, 55(84): 21-46, 2004.

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.

JOSE, J.; SHARMMA, A. K. Structure and behaviour of chromosome in piper and Peperomia (family Piperaceae). *Cytologia*, Tokyo, v. 50, n. 2, p. 301 – 310, 1985.

KANESHIMA, A.M. de S. et al. Comportamento meiótico em híbridos pré-selecionados de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick (Poaceae). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MELHORAMENTO DE FORRAGEIRAS, 2007, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Embrapa, 2007. 1 CD-ROM.

KOUTOLIS, A. et al. DNA ploidy level of colchicines-treated hops (*Humulus lupulus* L.). *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 263-268, June 2005.

KUPRIANOVNA, L. A. Apertures of pollen grains and their evolution in Angiosperms. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsterdam, v. 3, n. 1/4, p. 73–80, Aug. 1967.

LEI, L. G.; LIANG, H. X. Pollen morphology and its taxonomic significance in Piperaceae. **Acta Botanica Yunnanica**, Kunming, v. 20, n. 4, p. 429–433, Aug. 1998.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 36-42, jul. 2005.

LISBOA, P. L. B. (Org.). **Caxiuanã**: desafios para a conservação de uma floresta nacional na Amazônia. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2009. 672 p.

LOBATO, A. K. da S. et al. Ação do Óleo Essencial de Piper aduncum L. Utilizado como Fungicida Natural no tratamento de Sementes de Vigna unguiculata (L.) Walp. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 915-917, jul. 2007.

MARQUES, M. O. M. **Bioprospecção do potencial aromático de espécies nativas do bioma Mata Atlântica no estado de São Paulo: ocorrência, taxonomia, caracterização química, genética e fisiológica de populações**. Campinas: IAC/FAPESP. 2005.

MARTINS, K. C. et al. Meiose e viabilidade polínica em acessos de Capsicum annuum e Capsicum baccatum. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 8, p. 1-6, ago, 2010.

MEDINA, D. M. et al. A Poliploidia artificial na obtenção de melancia sem sementes. **Bragantia**, Campinas, v. 17, n. 5, p. 81-103, nov. 1958.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A. et al. Palinotaxonomia de Passiflora L. subg. Decaloba (DC.) Rchb. (Passifloraceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 24, n. 1, p. 133-145, jan./mar. 2010.

MIYABAYASHI, T. et al. Genome size of twenty wild species of Oryza determined by flow cytometric and chromosome analyses. **Breeding Science**, Tokyo, v. 57, n. 1, p. 73-78, Mar. 2007.

NAIR, R. R. Aneuploid variation of chromosome number in the somatic cells of Piper magnificum Trel. **Cytologia**, Tokyo, v. 72, n. 2, p. 239-242, June 2007.

NASCIMENTO, M. E.; VILHENA-POTIGUARA, C. R. Aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de Piper hispidinervium C. DC. (Piperaceae) e suas estruturas secretoras. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Série Botânica**, Belém, v. 15, p. 39-104, 1999.

NUNES, J. D. et al. Citogenética de Piper hispidinervium e Piper aduncum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 1049-1052, July 2007.

OLIVEIRA, D. A. de et al. Potencial da biodiversidade vegetal da Região Norte do Estado de Minas Gerais. **Unimontes Científica**, Montes Claros, v. 8, n. 1, p. 23-33, jan./jun. 2006.

PIKAARD, C. S. The epigenetics of nucleolar dominance. **Trends in Genetics**, London, v. 16 , n. 11, p. 495-500, Nov. 2000.

PIMENTEL, F. A.; PEREIRA, J. B. M.; OLIVEIRA, M. N. de. **Zoneamento e caracterização de habitats naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) no Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 1998. 17 p. (Boletim de Pesquisa, 20).

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 467-501, Nov. 1998.

RESSAYRE, A. et al. Aperture pattern ontogeny in angiosperms. **The Journal of experimental zoology**, New York, v. 294, n. 2, p.122–135, Aug. 2002.

ROCHA, S. F. R.; MING, L. C. *Piper hispidinervum*: a sustainable source of saffrole. In: JANICK, J. (Ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS,1999. p. 479-481.

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.

SAMUEL, R.; MORAWETZ, W. Chromosome evolution within Piperaceae. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 166, n. 1/2, p. 105-117, Mar. 1989.

SAMUEL, R.; SMITH, J. B.; BENNETT, M. D. Nuclear DNA variation in *Piper* (Piperaceae). **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 28, n. 6, p. 1041 – 1043, Dec. 1986.

SCHMIDT-LEBUHN, A. N. et al. An Andean radiation: polyploidy in the tree genus *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae). **Plant Science**, Limerick, v. 12, n. 6, p. 917–926, Nov. 2011.

SHARMA, A. K., BHATTACHARYYA, K. Chromosome studies on two genera of the family Piperaceae. **Genética**, Dordrecht, v. 29, n. 1, p. 256 – 289, Dec. 1959.

SILVA, M. H. L. da **Tecnologia de cultivo e produção racional da Pimenta Longa *Piper hispidinervum* C. DC.** 1993. 120 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1993.

SILVA, A. C. T. F.; LEITE, I. C.; BRAZ, L. T. Avaliação da viabilidade do pólen como possível indicativo de tolerância a altas temperaturas em genótipos de tomateiro. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 12, n. 2, p. 156-165, 2000.

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. (Boletim de Pesquisa, 23).

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. Londres: CRC, 2003. 391 p.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; OLIVEIRA, J. H. G. Comparative morphology and anatomy of the leaf and stem of *Peperomia dahlstedtii*, *Ottonia martiana* and *Piper diospyrifolium* (Piperaceae). **Gayana Botanica**, Concepcion, v. 61, n. 1, p. 6-17, 2004.

STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st century. **Taxon**, Utrecht, v. 49, n. 3, p. 451–477, Agu. 2000.

STACE, C.A. **Plant taxonomy and biosystematics**. 2th ed. Cambridge: Cambridge University, 1989.

SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Pandora, 1991. 434 p.

SUMNER, A.T. **Chromosomes: organization and function**. United Kingdom: W. Blacwell, 2003. 287 p.

TECHIO, V.H. et al. Viabilidade dos grãos de pólen de acessos de capim-elefante, milheto e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milheto). **Revista Acta Scientia Biologica**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 7-12, jan./mar. 2006.

VIANNA, W.O.; AKISUE, G. Caracterização morfológica de *Piper aduncum* L. **Lecta: revista de farmácia e biologia da Universidade São Francisco**, Bragança Paulista, v. 15, n. 1/2, p. 11-62, jan./dez. 1997.

WADT, L. H. O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) visando seu uso e conservação**. 2001. 95 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2001.

WADT, L. H. O.; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of "Pimenta Longa" genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 74-82, 2004.

WALKER, J. W.; DOYLE, J. A. The bases of angiosperm phylogeny, palynology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 62, n. 3, p. 664-723, 1975.

YUNCKER, T. G. **The Piperaceae of Brazil**. São Paulo: Hoehnea, 1972. v. 2.

ZONNEVELD, B. J. M.; DUNCAN, G. D. Genome sizes of *Eucomis* L'Her. (Hyacinthaceae) and a description of the new species *Eucomis grimshawii*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 284, n. 1/2, p. 99–109, Jan. 2010.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Cariótipo e quantidade de DNA nuclear de *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* C.DC

RESUMO

Piper é um gênero que se destaca pelas espécies medicinais e aromáticas de importância econômica. Das espécies nativas do Brasil, *Piper hispidinervum*, a pimenta-longa, e *Piper aduncum* se destacam em função da composição do óleo essencial. No entanto, são morfologicamente muito semelhantes, o que dificulta a distinção entre as mesmas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi comparar as espécies *P. aduncum* e *P. hispidinervum* com relação ao cariótipo, tipo de núcleo interfásico e quantidade de DNA nuclear. As metáfases mitóticas e os núcleos interfásicos foram obtidos pela técnica de secagem à chama e a coloração foi feita com Giemsa 5%. A determinação da quantidade de DNA foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o tampão LB01 e como padrão interno de comparação *Vicia faba*. As duas espécies apresentaram $2n=26$ cromossomos, corroborando $x = 13$ como número básico para o gênero. *P. aduncum* e *P. hispidinervum* apresentaram diferenças quanto às fórmulas cariotípicas, porém foram homogêneas quanto aos núcleos interfásicos, classificados como arreticulados. A quantidade de DNA nuclear foi significativamente maior em *P. hispidinervum*, sugerindo perda de sequências em *P. aduncum* ou amplificação genômica em *P. hispidinervum*. Apesar de apresentarem o mesmo número cromossômico, a morfologia cromossômica é diferenciada entre *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, bem como o tamanho do genoma. Essas diferenças devem ser resultados de alterações estruturais que contribuíram para a evolução cariotípica das mesmas.

Palavras-chave: *Piper*. Cromossomo. Núcleo interfásico. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

Piper is a genus that stands out by aromatic and medicinal species of economic importance. *Piper hispidinervum* (“pimenta-longa”) and *P. aduncum* (“pimenta de macaco”) are Brazilian species that produce a valuable essential oil. However, they show high morphological similarity that makes distinction between them very difficult. So, the objective of this paper was to compare *P. aduncum* and *P. hispidinervum* regarding the karyotype, interphasic nucleus type and nuclear DNA amount. The mitotic metaphases and interphase nuclei were obtained by flame-drying technique and staining with 5 % Giemsa. The determination of DNA content was performed by flow cytometry using the LB01 buffer. *Vicia faba* was used as internal standard for DNA estimation. Both species showed $2n = 26$ chromosomes, suggesting $x = 13$ as the basic number for the genus. *P. aduncum* and *P. hispidinervum* showed karyotypic differences in the formulas but were homogeneous in the nuclei interphasic type, classified as arreticulated. The amount of nuclear DNA was significantly higher in *P. hispidinervum*, suggesting either loss of sequences in *P. aduncum* or DNA amplification in *P. hispidinervum*. Despite of having the same chromosome number, the species can be differentiated by chromosome morphology and genome size. These differences can be attributed to structural changes that contributed to the karyotype evolution in the genus.

Keywords: *Piper*. Chromosome. Interphasic nucleus. Flow cytometry.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Piper* L. inclui grande número de espécies que se caracterizam pelo uso na medicina popular e pela importância econômica, devido à produção de óleos essenciais utilizados na indústria de condimentos, farmacêutica e também de inseticidas (SILVA; MACHADO, 1999). Dentre as espécies brasileiras com potencial para produção de óleos essenciais destacam-se *P. aduncum* e *P. hispidinervum*.

Na década de 90, a Embrapa Acre através de um programa de biosproteção criou o Banco de Germoplasma para subsidiar um programa de melhoramento com espécies de *Piper* produtoras de safrol. Um problema enfrentado na manipulação desse germoplasma é a controvérsia taxonômica relacionada a *P. hispidinervum* no que diz respeito ao seu *status* de espécie, existindo a hipótese de que seja, na realidade, uma variedade de *P. aduncum*. Essa hipótese se baseia na elevada similaridade morfológica entre as duas espécies e na distribuição geográfica das mesmas, sendo *P. aduncum* de ampla distribuição em todo o Brasil, enquanto populações de *P. hispidinervum* são encontradas apenas no Acre e diferem da primeira basicamente pelo teor de safrol (SILVA; OLIVEIRA, 2000; PIMENTEL et al., 1998).

Um estudo de diversidade genética da coleção de germoplasma da Embrapa Acre, usando marcador molecular do tipo RAPD, mostrou que se tratam de dois grupos distintos, possivelmente de duas espécies. No entanto, os autores ressaltam que a determinação conclusiva sobre a relação genética entre essas duas espécies prescinde de uma melhor amostragem para estudos adicionais de diversidade, bem como de uma melhor caracterização biológica do germoplasma (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004).

A maioria dos estudos para delimitação taxonômica no grupo vem sendo baseada na análise fitoquímica, uma vez que este gênero é composto de plantas aromáticas e se caracterizam pela produção de óleos essenciais (SILVA;

OLIVEIRA, 2000; BIZZO et al., 2001). No entanto, muitos outros ramos da pesquisa vegetal podem ser utilizados para a complementação dos estudos fitoquímicos e com isso permitir um maior entendimento das relações filogenéticas e sistemáticas do grupo, principalmente nas espécies brasileiras que não possuem nenhum estudo detalhado nesse âmbito.

Nesse sentido, a análise citogenética tem-se mostrado muito útil para a distinção de espécies. Apesar de poucas espécies de *Piper* terem sido avaliadas citogeneticamente, é possível observar ampla variação no número cromossômico. Essa variação ocorre tanto entre espécies como em *P. chaba* L. ($2n=104$) e em *P. longum* L. ($2n=52$), quanto dentro de algumas espécies, como em *P. betle* L. em que foram identificadas variedades com $2n=24, 42, 52, 48$ e 195 (JOSE; SAHARMA, 1985). A caracterização morfométrica dos cromossomos também foi realizada por Joseph, Joseph e Jose (1999) que 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.

Estudo preliminar das espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum* revelou que elas apresentam mesmo número cromossômico ($2n=24$) e cromossomos com morfologia similar. No entanto, devido ao uso de apenas dois acessos e a escassez de informação sobre a morfologia cromossômica, ficou evidente a necessidade de uma amostragem maior de populações e a geração de mais detalhes sobre o cariótipo para confirmar a hipótese de mesma posição taxonômica das duas espécies (NUNES et al., 2007).

Aliada às técnicas citogenéticas clássicas, a citometria de fluxo também pode auxiliar na elucidação da relação entre os genomas das espécies de *Piper*. Samuel, Smith e Bennett (1986) determinaram a quantidade de DNA em nove espécies de *Piper* do Novo e do Velho Mundo, cultivadas e selvagens. A quantificação realizada por densitometria por Feulgen revelou variação de

conteúdo de DNA (4C) entre 2,73 pg nas espécies tetraplóides e 9,86 pg nos octaplóides.

Portanto, diante da escassez e variabilidade dos dados existentes a proposição deste trabalho foi comparar as espécies *P. aduncum* e *P. hispidinervum* com relação ao cariótipo, tipo de núcleo interfásico e quantidade de DNA nuclear.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

As sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* utilizadas no trabalho foram cedidas pelo Banco de Germoplasma da Embrapa Acre.

2.2 Análise cariotípica

Pontas de raiz foram obtidas de plantas cultivadas em vasos. Essas raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 3 horas em temperatura ambiente e fixadas e armazenadas em carnoy (3metanol: 1 ácido acético) a -20°C. A digestão da parede celular foi obtida com pectinase/celulase (100/200u), a 37°C, por 1:30 h. As lâminas foram preparadas pela secagem à chama e coradas com Giemsa 10% para análise das metáfases e núcleos interfásicos mitóticos.

Para a análise cariotípica das duas espécies, cinco metáfases foram analisadas. As imagens foram capturadas em microscópio de campo claro (Leica DMLS), equipado com microcâmera (Nikon Digital Sight DS-Fi1). Os cromossomos foram medidos por meio do programa Image Tool 3.00 da UTHSCA (The University of Texas Health Science Center in San Antonio). Para a análise morfométrica dos cromossomos foram obtidos comprimento do braço curto (BC) e do braço longo (BL) de cada par homólogo, medido em quatro metáfases em *P. aduncum* e uma em *P. hispidinervum*. Foram calculados o comprimento total do cromossomo ($C_{ti} = BC + BL$), o comprimento total do lote haplóide ($CTLH = \sum C_{ti}$), o índice centromérico ($IC = [BC / (BC + BL)] \times 100$) e o comprimento relativo de cada cromossomo ($CR = C_{ti} / CTLH$). Os cromossomos foram classificados de acordo com a posição do centrômero segundo Guerra (1986).

A assimetria cariotípica foi calculada de acordo com os métodos propostos por Stebbins (1958) e Zarco (1986), sendo este último estimado pelo

índice de assimetria intracromossômica (A_1) e intercromossômica (A_2), por meio das equações:

$$A_1 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n \frac{b_i}{B_i}}{n} \quad A_2 = \frac{s}{\bar{x}}$$

onde: A_1 = Índice de Assimetria intracromossômica, variando entre 0 e 1; n = número de pares de cromossomos homólogos, b_i = comprimento médio dos braços curtos em cada par de cromossomos homólogos; B_i = comprimento médio dos braços longos em cada par de cromossomos homólogos; A_2 = Índice de Assimetria intercromossômica; s = desvio padrão do comprimento dos pares cromossômicos e \bar{x} = média do comprimento dos pares de cromossomos.

Para a classificação dos núcleos interfásicos, foram avaliados 100 núcleos por espécie, utilizando a nomenclatura proposta por Guerra (1985).

Para a obtenção das diacineses as inflorescências nos estágios iniciais foram coletadas, imediatamente fixadas em carnoy (3 etanol: 1 ácido propiônico) e armazenadas a -20°C . As lâminas foram preparadas por esmagamento em orceína acética 1%. As imagens foram capturadas em microscópio de campo claro (Leica DMLS), equipado com microcâmera (Nikon Digital Sight DS-Fi1).

2.3 Determinação da quantidade de DNA

A estimativa da quantidade de DNA por citometria de fluxo foi obtida a partir de tecido foliar de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*. Para cada amostra utilizou-se aproximadamente 20-30 mg de folhas jovens e o padrão interno de referência foi obtido por meio de folhas jovens de *Vicia faba*. As amostras foram trituradas em uma placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado para a

obtenção da suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997). O tecido triturado foi aspirado por meio de duas camadas de gaze e a suspensão nuclear filtrada em uma malha fina. À suspensão nuclear foram adicionados 25 μ L de iodeto de propídeo. Para cada amostra foram analisados pelo menos 10.000 núcleos. Os histogramas foram obtidos no citômetro FacsCalibur (Becton Dickinson) com o programa Cell Quest (Becton, Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados no software WinMDI 2.8.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade no programa SISVAR.

3 RESULTADOS

3.1 Análise cariotípica

P. aduncum e *P. hispidinervum* apresentaram $2n=26$ cromossomos nas metáfases mitóticas, número que foi confirmado pela presença de 13 bivalentes na diacinese (Figura 1 A - D).

Os cromossomos de ambas as espécies são pequenos, com comprimento variando de 1,12 a 3,71 μm em *P. aduncum* e de 0,89 a 4,73 μm em *P. hispidinervum*, sendo o comprimento médio dos cromossomos 1,94 μm e 1,74 μm para *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, respectivamente. O comprimento relativo revela uma maior contribuição ao genoma do primeiro par cromossômico de *P. hispidinervum*, quando comparado com o mesmo par de *P. aduncum*, enquanto que em relação ao último par, a contribuição em *P. aduncum* é maior. A determinação do número e a localização das constrições secundárias foram dificultadas pelo tamanho reduzido dos cromossomos e a falta de distensão das regiões organizadoras do nucléolo. Mesmo assim, foi possível observar no par cinco de *P. aduncum* uma constrição secundária na região intersticial do braço longo (Figura 2).

As fórmulas cariotípicas diferem nas duas espécies: *P. aduncum*: $1m + 12sm$ e *P. hispidinervum*: $4m + 9sm$. É possível observar que as espécies se diferenciam em três pares (oito, nove e dez), os quais são metacêntricos em *P. hispidinervum* e submetacêntricos em *P. aduncum* (Figura 2, tabela 1).

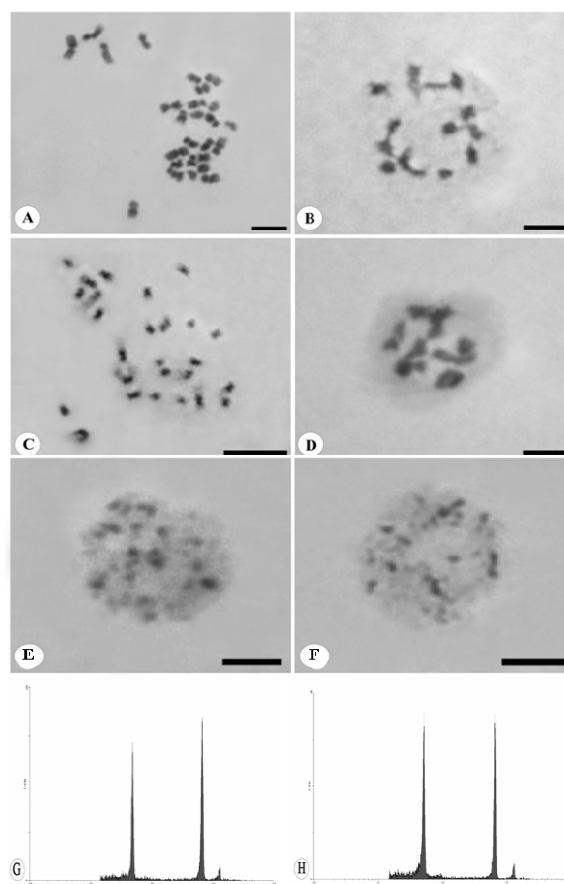


Figura 1 Metáfases mitóticas, diacineses, núcleo interfásico e histograma de citometria de fluxo de *Piper*. A e C – Metáfases com $2n=26$ cromossomos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, respectivamente. B e D – diacineses com $n=13$ bivalentes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*. E e F - Núcleos interfásicos arreticulados de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, respectivamente. (B). Barra $5=\mu\text{m}$. G e H - Histograma de citometria de fluxo em núcleos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, respectivamente. O primeiro e o segundo pico em cada histograma referem-se ao pico G1 dos núcleos de cada uma das espécies de *Piper* e da amostra de referência (*Vicia faba*), respectivamente. O terceiro é o pico G2 da amostra de referência. O eixo horizontal do gráfico os canais onde as leituras das quantidades de DNA de cada núcleo se posicionaram e o eixo vertical do o número de núcleos que foi lido pelo aparelho com uma determinada quantidade de DNA

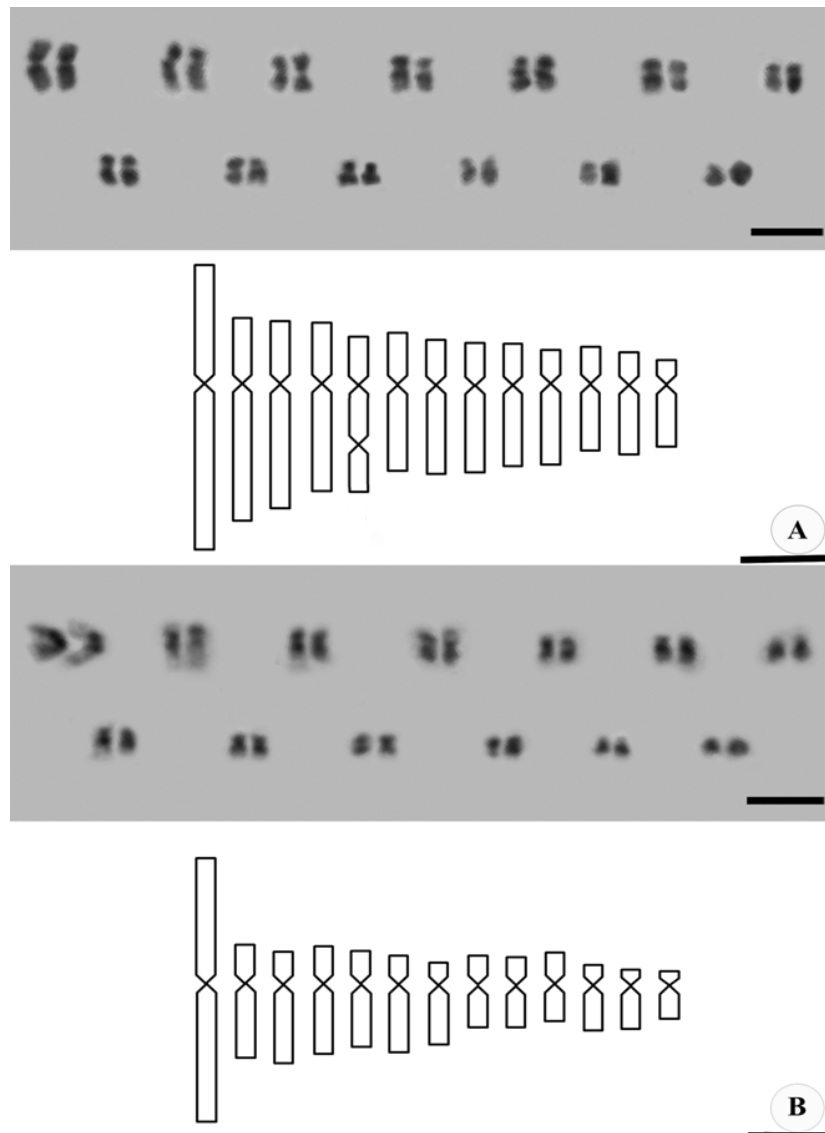


Figura 2 Cariograma e idiograma para *P. aduncum* (A) e *P. hispidinervum* (B).
Barra de 5 μm para os cariogramas e de 1 μm para os idiogramas

Tabela 1 Comprimento relativo, Índice centromérico e classificação dos pares cromossômicos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Par cromossômico	Comprimento relativo		Índice centromérico	
	<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>
1	14.66	20.84	42.24 (m)	48.41 (m)
2	10.53	8.987	33.35 (sm)	36.76 (sm)
3	9.68	8.74	34.59 (sm)	30.23 (sm)
4	8.68	8.59	37.39 (sm)	37.18 (sm)
5	7.98	7.73	31.37 (sm*)	36.18 (sm)
6	7.22	7.69	39.08 (sm)	30.66 (sm)
7	6.94	6.54	33.95 (sm)	27.61 (sm)
8	6.79	5.79	33.31 (sm)	42.20 (m)
9	6.35	5.66	34.14 (sm)	41.24 (m)
10	5.95	5.53	31.64 (sm)	49.00 (m)
11	5.36	5.18	36.92 (sm)	31.06 (sm)
12	5.40	4.78	34.15 (sm)	28.11 (sm)
13	4.45	3.94	30.22 (sm)	32.96 (sm)

m – metacêntrico; sm – submetacêntrico; * par cromossômico com constrição secundária

Os valores para o índice intracromossômico (A1) foram de 0,46 e 0,41 para *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, respectivamente, mostrando que ambas as espécies são intermediárias com relação à assimetria na posição dos centrômeros, com uma leve tendência à simetria. Já com relação ao tamanho dos cromossomos, o índice A2 foi de 0,36 para *P. aduncum* e 0,56 para *P. hispidinervum*, revelando que *P. hispidinervum* tem maior assimetria.

Pela classificação de Stebbins (1958), *P. aduncum* e *P. hispidinervum* foram classificadas como 3b e 3c, respectivamente. Essa classificação coincide com o índice de Zarco (1986) uma vez que significa que ambas apresentam de 51% a 99% de cromossomos com razão de braços (BL/BC) menor que dois, enquanto a diferença entre o maior e o menor cromossomo está entre 2:1 e 4:1 em *P. aduncum* e é maior que 4:1 em *P. hispidinervum*.

3.2 Núcleo interfásico e determinação da quantidade de DNA

Conforme classificação proposta por Guerra (1985), os núcleos interfásicos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* são arreticulados, caracterizados por não apresentarem eucromatina condensada, ficando os cromocentros bem distintos (Figura 1 E e F). Com a maioria dos corantes convencionais a cromatina difusa dos núcleos interfásicos é geralmente imperceptível, entretanto o corante Giemsa evidenciou a cromatina difusa, o que pode ser observado pela fraca coloração dos núcleos.

Quanto ao conteúdo de DNA, *P. aduncum* e *P. hispidinervum* se diferenciaram pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com 1,88 e 2,10 pg de DNA, respectivamente (Tabela 2 e Figura 1 G e H).

Os coeficientes de variação (CV) médios no presente trabalho (Tabela 2) estão abaixo de 1% o que demonstra uma boa precisão dos resultados e uma confiabilidade nas estimativas da quantidade de DNA uma vez que Marie e Brow (1993) consideram valores de CV entre 1% e 2% como de alta qualidade.

Tabela 2 Médias da quantidade 2C de DNA obtida por citometria de fluxo e coeficiente de variação para *P.aduncum* e *P. hispidinervum*

Espécie	Quantidade de DNA (pg)	CV médio (%)
<i>P. aduncum</i>	1,88 a	0.55
<i>P. hispidinervum</i>	2,10 b	0.61

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CV – coeficiente de variação

4 DISCUSSÃO

Há muita controvérsia sobre o número cromossômico básico do gênero *Piper*. Vários trabalhos relatam tanto números cromossômicos múltiplos de $x=12$ como de $x=13$ (DASGRUPTA; DATTA, 1976; JOSEPH; JOSEPH; JOSE, 1999; JOSE; SHARMMA, 1985; NAIR, 2007; NUNES et al, 2007; SAMUEL; BAVAPPA, 1981; SAMUEL; MORAWETZ, 1989).

Dasgupta e Datta (1976) estudaram sete espécies de *Piper* e compararam seus resultados de número cromossômico com os já relatados na literatura. Das 15 espécies de *Piper* até então estudadas, 47,3% apresentavam $x=12$ e 19,04% $x=13$ cromossomos. Entre as espécies com $x=12$ cromossomos estão *P. longum*, *P. cubeba* e *P. subpelatum*. A espécie *P. nigrum* apresentou variação no número cromossômico básico, uma vez que foram encontrados múltiplos de 13 ($2n=26, 52$ e 104 cromossomos) e de 12 ($2n=36, 48$ e 60 cromossomos).

Jose e Sharmma (1985) estudaram 53 taxa de Piperaceae, incluindo oito espécies de *Piper*. Os autores verificaram variação no número somático de $2n=24$ a $2n=195$ cromossomos. Com exceção de *P. cubeba*, que apresentou $2n=24$, todas as outras foram derivadas de $x=13$. As variedades de *P. betle* avaliadas exibiram uma série poliplóide e houve uma constância no número cromossômico entre as variedades desta espécie, que apresentaram em sua maioria $2n=78$, embora uma certa variação numérica dentro do mesmo indivíduo tenha sido observada.

Variação no número cromossômico também foi observada em *P. magnificum* por Nair (2007). Das metáfases somáticas avaliadas pelo autor, 62% apresentavam número cromossômico $2n=26$. O restante (38%) apresentou variação de $2n=22, 24, 25, 27$ e 28 cromossomos, sendo $2n=24$ o número mais frequente.

Os números cromossômicos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* já haviam sido relatados por Nunes et al (2007) como $2n=24$ para as duas espécies. A determinação de $2n=26$ nesse trabalho, corroborado pela observação de 13 bivalentes na diacinese, indica que pode haver variabilidade numérica entre acessos. Dessa forma, é importante ampliar o número de acessos estudados e verificar se existe variabilidade para número cromossômico.

O comprimento médio dos cromossomos de *P. aduncum* (1,94 μm) e de *P. hispidinervum* (1,74 μm) foi maior que os encontrados para essas espécies por Nunes et al., (2007) (*P. aduncum*: 1,32 μm e *P. hispidinervum*:1,38 μm). Essa diferença pode ser explicada pelo padrão de condensação das metáfases utilizadas para as mensurações. Outros trabalhos também descreveram o tamanho dos cromossomos (DASGRUPTA; DATTA,1976; JOSEPH; JOSEPH; JOSE, 1999; JOSE; SHARMMA, 1985; NUNES et al., 2007; SAMUEL; MORAWETZ,1989; SHARMA; BHATTACHARYYA, 1959) e, assim como neste trabalho, todos relatam a ocorrência de cromossomos pequenos apesar de haver variação nos tamanhos médios destes entre as espécies de *Piper* estudadas.

Uma diferença acentuada entre os comprimentos relativos do primeiro e o último par cromossômico em *Piper* é relatado pela primeira vez na literatura. Essa diferença é mais marcante em *P. hispidinervum*, cuja espécie possui um primeiro par cromossômico aproximadamente cinco vezes maior que o último (Tabela 1). Samuel e Morawetz (1989) relatam o tamanho do maior e do menor cromossomo e o comprimento total do lote diplóide de quatro espécies de *Piper*, entre elas *P. apiculatum* ($2x=26$). De posse desses dados, foi possível calcular o comprimento relativo dessa espécie que é de 2,33% para o menor cromossomo e de 5,23% para o maior. José e Sharma (1985) também relatam os tamanhos dos menores e dos maiores cromossomos de oito espécies de *Piper* através dos quais foi possível calcular o comprimento relativo dos cromossomos dessas espécies.

Entre as espécies estudadas, destacamos *P. cubeba* ($2x=24$) que apresenta comprimento relativo variando de 2,81% a 6,33%.

A observação de uma constrição secundária no braço longo do par cromossômico cinco é uma característica marcante de *P. aduncum*. Outras espécies de *Piper* que tiveram suas constrições secundárias descritas as possuem nos primeiros pares: *P. cubeba*, *P. magnificum*, *P. nigrum* (var. Argatala) e *P. betle* (var. mitha pan) possuem a constrição secundária nos três primeiros pares; *P. betle* (var. jhal pan) apresenta constrição secundária nos dois primeiros pares do cariótipo, enquanto *P. nigrum* (var (South Indian) nos quatro primeiros (DASGRUPTA; DATA, 1976).

A maioria dos trabalhos não traz informações detalhadas a respeito da localização dessas constrições e citam somente o número encontrado. Esses números são variáveis no gênero, o qual apresenta de um a quatro pares (DASGRUPTA e DATA, 1976; JOSEPH; JOSEPH; JOSE, 1999; JOSE; SHARMA, 1985). A confirmação da presença das constrições secundárias nas espécies de *Piper* pode ser realizada pelo bandeamento NOR (coloração com prata) que destaca as regiões cromossômicas que apresentam produtos da transcrição do rRNA e poderia determinar com maior precisão o número de constrições ativas. Outra técnica que pode ser empregada é a hibridização *in situ* fluorescente com sondas de DNA ribossomal 45S que identifica de forma precisa as regiões organizadoras do nucléolo. Ainda é possível, através da análise meiótica, verificar o número de cromossomos associados ao nucléolo para a inferência do número de cromossomos que apresentam constrição secundária.

As fórmulas cariotípicas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* se diferenciaram em três cromossomos. No entanto, Nunes et al. (2007) descreveram a fórmula cariotípica 12M, tanto para *P. aduncum* quanto para *P. hispidinervum*. Samuel e Morawetz (1989) identificaram, nas nove espécies de

Piper estudadas, cromossomos metacêntricos e submetacêntricos mas sem fornecer informações mais detalhadas do kariograma. Resultados semelhantes foram descritos para *P. colubrinum* ($2n=13$), *P. magnificum* ($2n=26$) e *P. nigrum* ($2n=52$) que apresentaram cromossomos metacêntricos a submetacêntricos (JOSEPH; JOSEPH; JOSE, 1999).

As diferenças encontradas nas fórmulas kariótípicas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* podem ser devido a inversões pericêntricas nos pares 8, 9 e 10 de *P. aduncum*, o que pode ter provocado mudança na posição do centrômero. De acordo com Stebbins (1958), rearranjos como inversões pericêntricas e translocações desiguais contribuem para a assimetria kariotípica entre as espécies, pois causam mudanças na posição dos centrômeros. Fissões e fusões também podem causar uma alteração na posição centromérica e também são responsáveis pela mudança no tamanho dos cromossomos, mas implicam em alteração no número. Entretanto, rearranjos como inversões paracêntricas apesar de não influenciarem na posição dos centrômeros, são importantes e podem explicar as diferenças kariológicas observadas nos padrões de bandas observadas por outros autores.

De acordo com Zarco (1986), quanto maiores os valores de A1 (assimetria intracromossômica) e de A2 (assimetria intercromossômica) mais assimétrico é o kariótipo. Portanto, os kariótipos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* são semelhantes no que diz respeito à posição do centrômero, tendendo à simetria. Essa tendência já foi observada em outras espécies do gênero (JOSEPH; JOSEPH; JOSE, 1999; JOSE; SHARMMA, 1985).

O maior valor de A2 em *P. hispidinervum* está relacionado com o tamanho discrepante dos primeiros pares cromossômicos em relação aos demais (Tabela 1 e figura 2), o que pode ser explicado pela condensação proximal dos cromossomos nas prófases e metáfases avaliadas. Nesse tipo de condensação as regiões centroméricas se condensam primeiro, enquanto nas regiões teloméricas

a condensação se dá mais tardiamente. Esta característica foi observada nos cromossomos de ambas as espécies, sendo, no entanto, mais visível em *P. hispidinervum*, mesmo em metáfases mais condensadas. Esse padrão de condensação também é relatado por Samuel e Morawets (1989) para o gênero *Piper*.

Stebbins (1958) também propõe categorias para a assimetria cromossômica baseadas nos tamanhos e na relação de braços dos cromossomos. De acordo com esta classificação, *P. aduncum* e *P. hispidinervum* não se diferenciam quanto a proporção de cromossomos com razão de braços menor que dois entre 51% e 99%. Entretanto, *P. aduncum* apresentou menor assimetria em relação ao tamanho dos cromossomos quando comparada a *P. hispidinervum*.

Alguns autores (PASZKO, 2006; ZARCO, 1986) criticam as classes propostas por Stebbins (1958), pois consideram que são muito amplas e muitas vezes não detectam pequenas diferenças entre os cariótipos estudados. No entanto, neste estudo a classificação de Stebbins (1958) para *P. aduncum* e *P. hispidinervum* coincide com a proposta por Zarco (1986).

De acordo Stebbins (1958), espécies mais primitivas tendem a apresentar um cariótipo simétrico, com cromossomos possuindo centrômeros medianos e muito semelhantes em tamanho. Os cariótipos de *Piper*, inclusive os das espécies aqui avaliadas, podem ser considerados mais primitivos e essa condição pode ser comprovada pelas características intermediárias da família entre as monocotiledôneas e as eudicotiledôneas sendo, por isso, classificada como angiosperma basal. No entanto, é possível observar uma evolução nesses cariótipos uma vez que rearranjos podem ter contribuído para a presença de cromossomos submetacêntricos e, como consequência, uma menor simetria.

O conhecimento da organização do núcleo interfásico, associado aos dados de morfometria cromossômica pode constituir ferramentas úteis para a

taxonomia vegetal. A classificação dos núcleos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* está de acordo com Guerra (2000) quando cita que cromossomos pequenos, com comprimento inferior a 3 μm apresentam geralmente núcleos arreticulados, com presença de cromocentros distintos.

Um estudo da evolução cromossômica de três gêneros de Piperaceae (*Piper*, *Peperomia* e *Photomorphe*) foi realizado por Samuel e Morawetz (1989). De acordo com os autores os núcleos em interfase de *Piper* são classificados como procromossomal enquanto em *Peperomia* o tipo descrito foi eucromático-reticulado. *Photomorphe* apresentou núcleos intermediários entre os dois gêneros descritos anteriormente. Essa informação, associada com os dados cariotípicos, leva a inferir que a evolução na família se dá de núcleos interfásicos procromossomais para eucromáticos-reticulados.

Além das informações cariotípicas e de núcleos interfásicos a determinação da quantidade de DNA é uma ferramenta importante na detecção de diferenças que não alteram a estrutura dos cromossomos e podem, por isso, não ser detectáveis pelas técnicas citogenéticas.

A quantificação de DNA para espécies de *Piper* já havia sido realizada por Samuel, Smith e Bennett (1986). Os autores analisaram cinco espécies de *Piper* do velho mundo (duas variedades de *P. nigrum*: 4x, 8x; *P. longum*: 4x; *P. betle*: 4x; *P. silvestre*: 4x; *P. argyrophyllum*: 4x) e quatro do novo mundo (*P. apiculatum*: 2x; *P. cernum*: 2x; *P. arboreum*: 2x; *P. ornatum*: 4x) incluindo entre elas espécies cultivadas e silvestres. A quantificação foi realizada por densitometria de Feulgen e a análise dos núcleos foi em G2 (4C). Os autores verificaram uma variação no valor C de DNA nas espécies diplóides de 2,43 a 4,22 pg de DNA. A variação nas espécies tetraplóides foi de 0,68 a 1,03 pg de DNA. A variedade octaplóide de *P. nigrum* apresentou 1,20 pg de DNA. Os autores relatam que a quantidade de DNA nas espécies analisadas nem sempre acompanha a ploidia. Espécies silvestres diplóides apresentam maior quantidade

de DNA que as espécies tetraplóides cultivadas. De acordo com os autores, as espécies silvestres tendem a ter maior quantidade de DNA que as espécies cultivadas. A determinação da quantidade de DNA em *P. aduncum* (1,88 pg) e *P. hispidinervum* (2,10 pg) foi através da citometria de fluxo e em núcleos em G1, no entanto, esses valores estão próximos a quantidade de DNA de *P. apiculatum* (2,43), espécie diplóide estudada pelos autores.

Segundo Dolezel et al. (2003) citado por Dolezel e Bartos (2005), 1 pg de DNA equivale a $0,978 \times 10^9$ (considerando a razão entre pares de base AT:CG de 1:1 e ignorando a presença de nucleotídeos modificados). Portanto, o genoma de *P. aduncum* é constituído de 919 Mb/C, enquanto *P. hispidinervum* 1027 Mb/C, uma diferença de 108 Mb a mais em *P. hispidinervum*. Essa diferença pode estar relacionada à perda de sequências de DNA em *P. aduncum* ou, mais provavelmente à amplificação de DNA repetitivo em *P. hispidinervum*.

Os resultados de número cromossômico e núcleo interfásico não permitiram separar as espécies. Os cariótipos apresentaram diferenças o que indica a importância de se gerar informações detalhadas sobre os cromossomos dessas espécies. A característica marcadamente distinta foi a quantidade de DNA nuclear, evidenciando a distinção dos dois taxa. Assim, para a elucidação dos mecanismos envolvidos na diferenciação e evolução cariotípica sugere-se a aplicação de bandeamento cromossômico C e hibridização molecular (FISH). Com a aplicação dessas técnicas é possível obter maior detalhamento dos cariótipos. Para os programas de melhoramento a diferenciação entre as espécies trarão subsídios para futuros programas de hibridação interespecífica.

5 CONCLUSÕES

Os genomas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* não podem ser diferenciadas pelo número cromossômico $2n=26$, mas são distintos quanto à morfologia cromossômica e quantidade de DNA nuclear.

REFERÊNCIAS

- BIZZO, H. R. et al. Sarisan from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C. DC (Long pepper). **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 16, n. 2, p. 113-115, Feb. 2001.
- DASGRUPTA, A.; DATTA, P. C. Cytotaxonomy of Piperaceae. **Cytologia**, Firenze, v. 41, p. 697-706, 1976.
- DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, Poznán, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, London, v. 95, n. 1, p. 99-110, Jan. 2005.
- DOLEZEL, J. et al. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry**, New York, v. 51, n. 2, p. 127-128, Feb. 2003.
- GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 120, n. 3/4, p. 339-350, May 2008.
- GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, Dec. 2000.
- GUERRA, M. S. Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. In: COLÓQUIO SOBRE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, 1., 1995, Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: SBG, 1985. p. 137-153.
- GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 140 p.
- 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.
- JOSE, J.; SHARMMA, A. K. Structure and behaviour of chromosome in piper and Peperomia (family Piperaceae). **Cytologia**, Tokyo, v. 50, n. 2, p. 301-310, 1985.

LEVITSKY, G. The karyotype in systematics. *Bull. Appl. Botany Genet. Plant Breeding* v. 27, p. 220-240, 1931.

MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, Paris, v. 78, n. 1/2, p. 41-51, 1993.

MATHEW, P. J. Studies on Piperaceae. *Journal of the Indian Botanical Society*, Madras, v. 37, p.153-171, 1958.

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. 301-307, 1999.

NAIR, R. R. Aneuploid variation of chromosome number in the somatic cells of *Piper magnificum* Trel. *Cytologia*, Tokyo, v. 72, n. 2, p. 239-242, June 2007.

NUNES, J. D. et al. Citogenética de *Piper hipidinerium* e *Piper aduncum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 42, n. 7, p. 1049-1052, July 2007.

PASZKO, B. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution*, New York, v. 258, n. 1/2, p. 39-48, Apr. 2006.

SAMUEL, R. Chromosome numbers in *Piper*. *Kew Bulletin*, London, v. 42, n. 2, p. 465-470, 1987.

SAMUEL, R.; SMITH, J. B.; BENNETT, M. D. Nuclear DNA variation in *Piper* (Piperaceae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, Ottawa, v. 28, n. 6, p. 1041 – 1043, Dec. 1986.

SAMUEL, R.; MORAWETZ, W. Chromosome evolution within Piperaceae. *Plant Systematics and Evolution*, New York, v. 166, n. 1/2, p. 105-117, Mar. 1989.

SHARMA, A. K., BHATTACHARYYA, K. Chromosome studies on two genera of the family Piperaceae. *Genética*, Dordrecht, v. 29, n. 1, p. 256 – 289, Dec. 1959.

SILVA, E. M.; MACHADO, S. R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 117-124, Aug. 1999.

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. (Boletim de Pesquisa, 23).

STEBBINS, G. L. Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, v. 23, p. 365-378, 1958.

WADT, L. H. O.; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of "Pimenta Longa" genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 74-82, 2004.

ZARCO, C. R. A new method for estimating karyotype asymetry. **Taxon**, Utrecht, v. 35, n. 3, p. 526-530, Aug. 1986.

ARTIGO 2

Meiose e palinologia de três espécies do gênero *Piper* L

RESUMO

A família Piperaceae engloba cerca de 2500 espécies, distribuídas em cinco gêneros, sendo *Piper* e *Peperomia* os dois maiores. No gênero *Piper*, encontram-se mais de 700 espécies, que além do interesse medicinal, despertam a atenção para vários tipos de componentes secundários. Há alguns anos a Embrapa Acre iniciou um programa de melhoramento com as espécies de *Piper* para produção de óleos essenciais, o que acarretou a necessidade de se conhecer o potencial reprodutivo dessas espécies. Objetivou-se nesse trabalho realizar análise meiótica e palinológica em *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. A meiose foi estudada em lâminas de esmagamento e o estudo palinológico realizado em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. A meiose dessas espécies apresenta divisão assincrônica e anormalidades, especialmente nas metáfases I e II, sendo o índice meiótico em torno de 75% para as três espécies. Entretanto, a viabilidade dos grãos de pólen, estimada por coloração com Alexander e carmim propiônico 2%, foi diferente significativamente sendo o menor valor (9,1%) encontrado em *P. affinis hispidinervum* e o maior (85,7%) em *P. hispidinervum*. Os grãos de pólen são pequenos e variam em número e formato de colpo bem como na ornamentação da exina. Quando encontrado, o colpo apresenta granulações na exina que o diferenciam da exina do pólen, apesar de terem a mesma classificação. De acordo com as características morfo-polínicas *P. affinis hispidinervum* é mais próxima de *Piper aduncum*.

Palavras-chave: Piperaceae. Meiose. Viabilidade polínica. Morfologia polínica.

ABSTRACT

The family Piperaceae comprises about 2500 species belonging to five genera, being *Piper* and *Peperomia* the two largest ones. In *Piper*, there are over 1000 species of medicinal interest due to their secondary metabolites. A breeding program on some *Piper* species is developed in Embrapa Acre, what makes important the knowledge on fertility of these species. The objective of this study was to analyse meiotic behavior and morphology of pollen grains of *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* and *P. hispidinervum*. Slides for meiotic analysis were prepared by squashing technique. Pollen grains analysis was made either by light microscopy or scanning electron microscopy. The meiosis of these species showed relevant index of asynchronic division and abnormalities, mainly in metaphases I and II. The meiotic index was around 75% for all species. However, the pollen grain viability, verified by Alexander and 1% propionic carmine, was significantly different, with *P. affinis hispidinervum* showing the lowest index (9.1%) and *P. hispidinervum* the highest one (85.7%). Pollen grains are small, varying in number and format of colpus and in exin ornamentation. When the colpus is present, it shows granulation that differentiates its exine from the rest of the pollen, despite of having the same classification. Considering pollen grain features, *P. affinis hispidinervum* is closer to *P. aduncum*.

Keywords: Piperaceae. Meiosis. Pollen viability. Pollen morphology.

1 INTRODUÇÃO

A família Piperaceae compreende cerca de cinco gêneros, sendo *Piper* um dos maiores entre as angiospermas basais, incluindo mais de 700 espécies (AGAREZ; RIZZINI; PEREIRA, 1994; KUBITZKI; ROHWER; BITTRICH, 1993; SOLTIS; SOLTIS; CHASE, 1999). No Brasil, algumas dessas espécies vêm ganhando atenção dos pesquisadores e das indústrias farmacêuticas, nacionais e multinacionais interessados em princípios e essências para a produção de cosméticos, temperos e bioherbicidas (FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DO AMAZONAS, 2002).

Dentre as diferentes substâncias de interesse destaca-se o safrol, que no Brasil passou a ser extraído da canela sassafrás (*Ocotea pretiosa*), a partir de sua descoberta em 1939 (ROCHA; MING, 1999). Porém a exploração indiscriminada da canela levou o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) a proibir, em 1991, o corte de *O. pretiosa* em florestas primárias da Mata Atlântica.

A descoberta da pimenta longa (*Piper hispidinervum*) como uma espécie promissora para a obtenção de safrol se deu na década de 70, por meio do programa de triagem de plantas aromáticas da Amazônia, coordenado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Por meio desse programa de triagem, outras espécies de *Piper*, muito semelhantes a *P. hispidinervum*, foram descobertas: *P. aduncum* que produz óleo essencial rico em dilapiol e *P. affinis hispidinervum* na qual o sarisan é o constituinte principal do óleo essencial (SILVA; OLIVEIRA, 2000; BIZZO et al., 2001).

Nesse contexto, desde a bioprospecção de espécies de *Piper* produtoras de safrol na Amazônia, a Embrapa Acre vem se dedicando ao estudo das espécies de *Piper* e à implementação de um programa de melhoramento. Para tanto, conta com um Banco de Germoplasma de três espécies de *Piper* (*P.*

hispidinervum, *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum*) nativas da Amazônia Brasileira.

Um das dificuldades nos programas de melhoramento de espécies em processo de domesticação, como a pimenta longa, é a escassez de informações a respeito da fertilidade dessas espécies. A fertilidade é consequência da formação de gametas normais e balanceados e, portanto, o estudo do comportamento cromossômico na meiose é uma ferramenta que pode servir como um guia para a escolha de genótipos mais estáveis e férteis. Além do conhecimento do comportamento meiótico, a caracterização do grão de pólen pode evidenciar a potencialidade reprodutora masculina da espécie e fornecer informações básicas para o planejamento de um programa de melhoramento.

Visando gerar subsídios para trabalhos de melhoramento genético, o presente estudo objetivou verificar a regularidade meiótica e descrever a morfologia polínica de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Foram utilizadas inflorescências de diferentes acessos de três espécies do gênero *Piper*, *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Acre. As inflorescências foram coletadas, imediatamente fixadas em carnoy (3 etanol: 1 ácido propiônico) e enviadas ao Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Lavras, onde foram armazenadas a -20°C

2.2 Análise meiótica e viabilidade do pólen

As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento em orceína acética 1%. Para cada espécie foram avaliados, em média, 10.000 meiócitos. A porcentagem de anormalidades foi calculada separadamente para cada fase da meiose e a determinação da eficiência de todo o processo meiótico foi feita por meio do cálculo do índice meiótico proposto por Love (1951): $IM = (\text{número de tétrades normais/número de tétrades observadas}) \times 100$; para o qual foram avaliadas em média 2500 tétrades por espécie.

A viabilidade do pólen foi estimada por colorimetria com uso de carmim propiônico 1% e o Corante de Alexander. As lâminas coradas com carmim propiônico 1% foram analisadas logo após o preparo, já aquelas coradas com Alexander foram mantidas em câmara úmida, a 4 °C, por 24h.

Foram avaliadas 25 lâminas por espécie e 200 grãos de pólen por lâmina. Para o corante carmim propiônico 1% foram considerados polens viáveis aqueles que se coraram fortemente e inviáveis os que se coraram com menor intensidade ou não se coraram. Para o Corante de Alexander foram considerados polens viáveis aqueles que se coraram de roxo e os inviáveis aqueles que se coraram de verde.

Os dados foram submetidos à análise de variância no programa SISVAR considerando o modelo de blocos casualizados e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

2.3 Estudo palinológico

Os grãos de pólen foram preparados segundo o método acetolítico de Erdtman (1952). Cinco indivíduos por espécie foram avaliados, sendo montadas cinco lâminas de cada indivíduo. As lâminas foram examinadas em microscópio de campo claro, equipado com microcâmara para digitalização das imagens. As medidas do eixo polar (P), diâmetro equatorial (E) e espessura da exina foram obtidas em seis grãos de pólen de cada uma das cinco lâminas preparadas para cada indivíduo, totalizando 150 grãos de pólen mensurados por espécie. Foram estabelecidas as relações P/E por meio das quais foi classificado o tipo polínico de acordo com Punt et al. (1999). O tamanho do grão de pólen foi determinado a partir da medida do eixo polar com base na terminologia adotada por Punt et al. (1999). De acordo com esse autor, grãos do pólen com diâmetro polar de até 40 μm são classificados como pequenos, entre 40 – 60 μm como médios, entre 60 - 80 μm como grandes e entre 80 - 100 μm como muito grandes.

Para a análise da morfologia polínica por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) as flores não acetolisadas foram lavadas três vezes por dez minutos em tampão cacodilato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por uma hora, à temperatura ambiente. Após este período foram lavadas por três vezes em água destilada, desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes) e levadas ao aparelho de ponto crítico (CPD 030). Em seguida os grãos de pólen foram retirados sobre stubs e levados ao evaporador de ouro (SCD 050), sendo analisados em aparelho MEV-LEO-EVO40.

3 RESULTADOS

3.1 Análise meiótica e viabilidade polínica

A Tabela 1 apresenta o percentual de células com anormalidades em cada fase da meiose I e meiose II de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. É possível observar que na prófase I das três espécies estudadas não foram observadas irregularidades que comprometessem o processo meiótico.

Em *P. aduncum*, do total de células analisadas em metáfase I, 18.37% apresentaram cromossomos com posicionamento incorreto (tabela 1, figura 1a). Essa irregularidade também foi observada nas células que se encontravam em anáfase I, metáfase II (figura 1b) e anáfase II (Tabela 1). Em telófase I foram encontrados cromossomos com posicionamento incorreto (4.6%) e formação de micronúcleos (1.44%) (tabela 1, figura 1d). O maior percentual de anormalidades foi constatado em metáfase II (24.1%) que além de cromossomos com posicionamento incorreto (1.28%) apresentaram orientação irregular da placa metafásica (22.82%) (tabela 1, figura 1c). Em telófase II não foi observada nenhuma anormalidade.

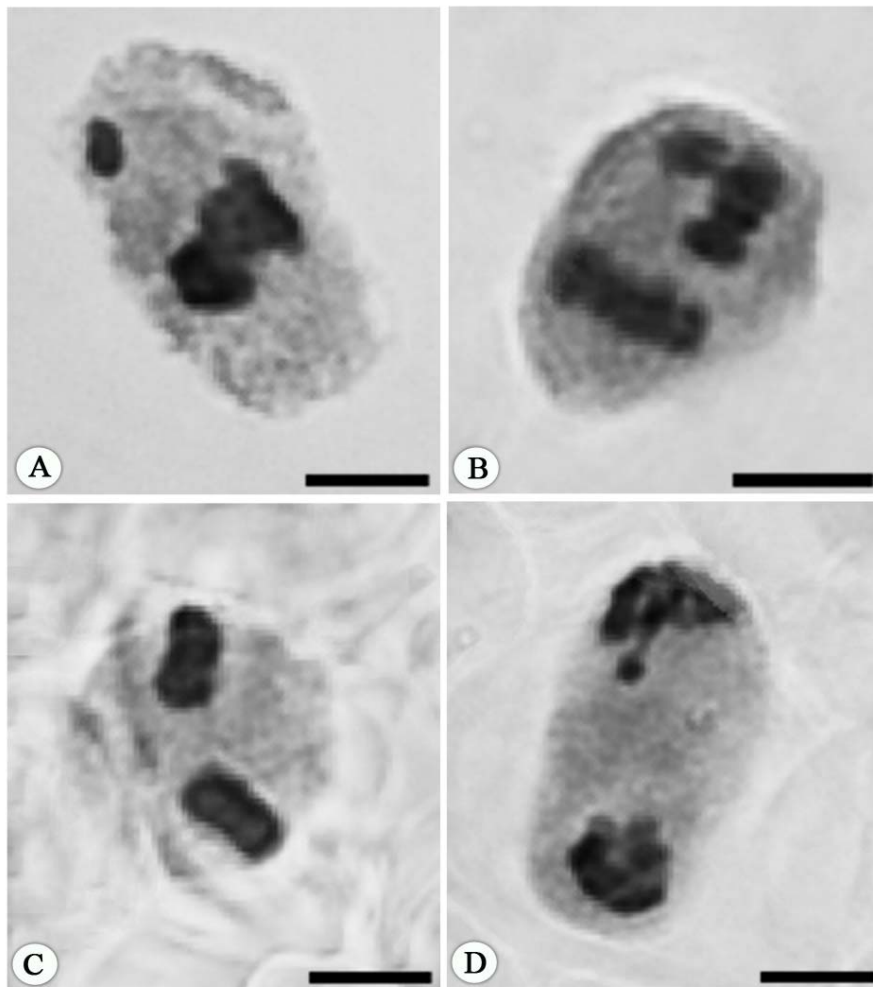


Figura 1 Meiócitos em meiose I e II de *P. aduncum*, A – Metáfase I com cromossomo com posicionamento incorreto. B- Metáfase II com cromossomo com posicionamento incorreto. C – Metáfase II com orientação irregular da placa metafásica. D – Telófase I inicial com cromossomo com posicionamento incorreto. (Barra=5 μ m)

Tabela 1 Anormalidades meióticas durante a microsporogênese de espécies de *Piper*

Fase da meiose	Espécie					
	<i>P. aduncum</i>		<i>P. affinis hispidinervum</i>		<i>P. hispidinervum</i>	
	n de células analisadas	% de irregularidades	n. de células analisadas	% de irregularidades	n. de células analisadas	% de irregularidades
Prófase I	3113	0	2507	0	2287	0
Metáfase I	626	18.37	744	24.46	621	26.73
Anáfase I	228	7.89	322	0	360	2.5
Telófase I	348	6.03	817	0	414	0.97
Intercinese	386	0	381	0	433	0.46
Prófase II	541	0	642	0.15	638	0
Metáfase II	390	24.1	463	20.94	506	28.19
Anáfase II	156	1.92	171	0	161	1.24
Telófase II	368	0	502	0	542	0
Tétrades	3019	23.6	3056	23.77	2979	22.31
Meiócitos assincrônicos em meiose II	439		471		502	
Total de células analisadas	9617		10076		9443	
Índice Meiótico	74%		74.5%		74.9%	

Em *P. affinis hispidinervum*, assim como em *P. aduncum* também foram observados cromossomos com posicionamento incorreto em metáfase I e II (tabela 1, figura 2a-c). Em metáfase II ainda foi observada orientação irregular da placa metafásica (figura 2d). Ao contrário de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, esta espécie apresentou 0.15% de células em prófase II com presença de micronúcleos (tabela 1). Nas demais fases da meiose não foi encontrada nenhuma anormalidade, o que diferencia *P. affinis hispidinervum* de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* (tabela 1).

P. hispidinervum assim como as duas espécies já citadas também apresentou alta porcentagem de cromossomos com posicionamento incorreto em metáfase I e II (tabela 1, figura 3a-c). Essa anormalidade também foi observada em anáfase I e II, porém em anáfase I a porcentagem de cromossomos com posicionamento incorreto foi menor quando comparada com *P. aduncum* (tabela 1). Em metáfase II a orientação irregular da placa metafásica também foi observada (figura 3d). Em teláfase I foi observada a presença de micronúcleos em menor porcentagem em relação a *P. aduncum*. *P. hispidinervum* foi a única espécie a apresentar micronúcleos em intercinese (tabela 1).

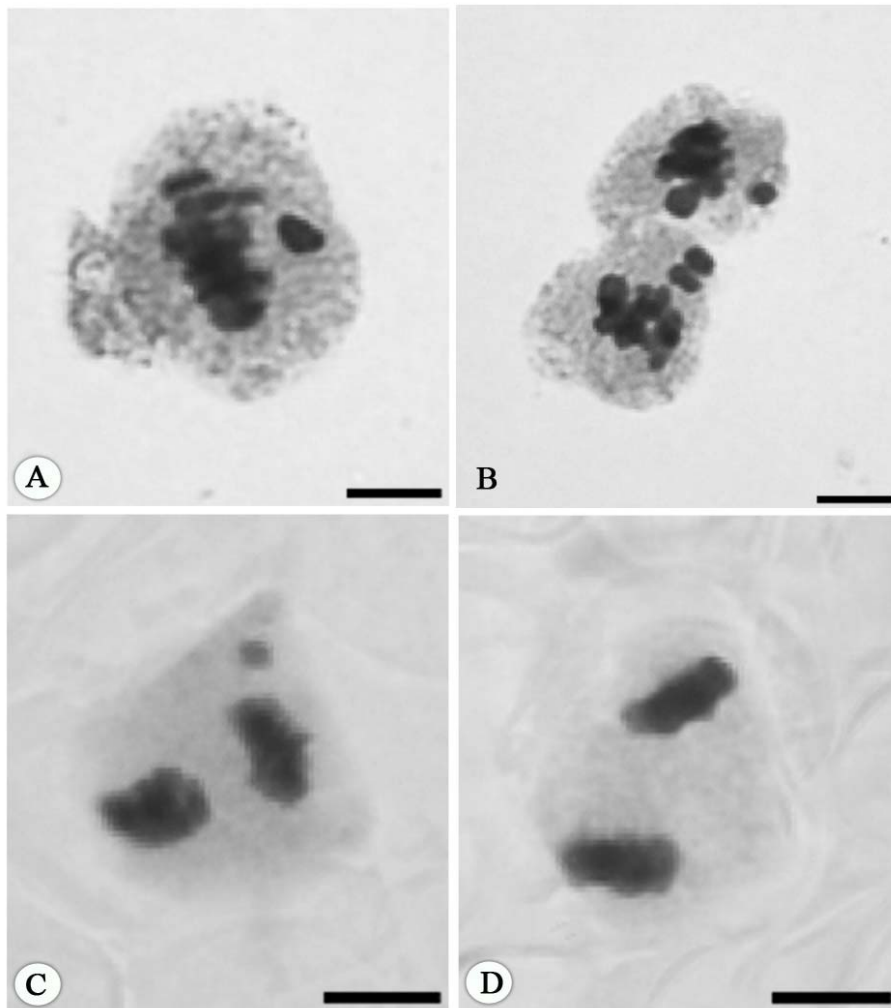


Figura 2 Meiócitos em meiose I e II de *P. affinis hispidinervum*, A e B – Metáfase I com cromossomos com posicionamento incorreto. C - Metáfase II com cromossomo com posicionamento incorreto. D – Metáfase II com orientação irregular da placa metafásica. (Barra=5 μm)

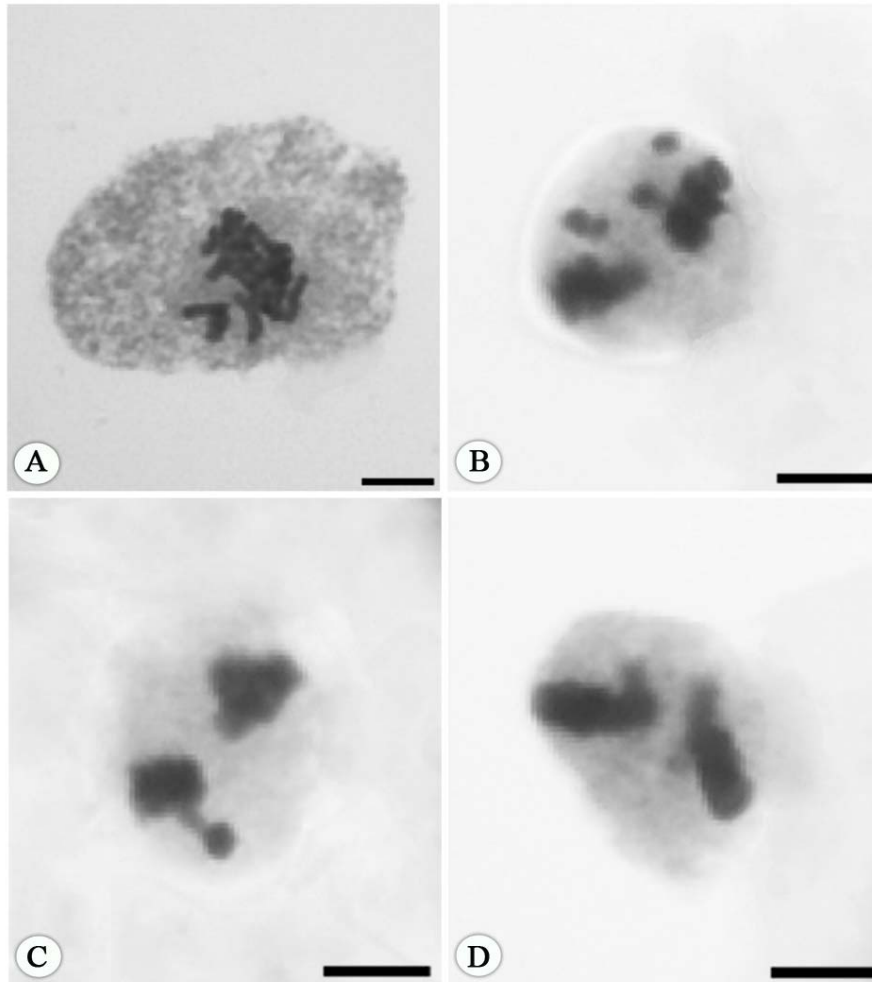


Figura 3 Meiócitos em meiose I e II de *P. hispidinervum*, A – Metáfase I com cromossomo com posicionamento incorreto. B-C Metáfase II com cromossomo com posicionamento incorreto. D – Metáfase II com orientação irregular da placa metafásica. (Barra=5 µm)

Divisão assincrônica foi um fenômeno comum na meiose II nas três espécies em estudo. Meiócitos com essa característica apresentaram núcleos em diferentes estágios do processo de divisão e, por esse motivo, a fase onde esse assincronismo ocorreu não pode ser determinada (Tabela 1). O assincronismo ocorreu principalmente nas fases iniciais da meiose II e a partir da metáfase II essa anormalidade foi menos encontrada.

Nas espécies estudadas, a citocinese não foi simétrica, pois produtos pós-meióticos do tipo tríade foram observados (Figura 4a). Mesmo havendo predominância de tétrades, a ocorrência das tríades resultou em um índice meiótico abaixo de 80% (Tabela 1), indicativo de plantas instáveis para programa de melhoramento, segundo Love (1951). As tétrades observadas apresentavam, em sua maioria, configuração do tipo tetragonal (Figura 4b).

Quanto à viabilidade dos grãos do pólen, foi verificada diferença significativa entre as espécies, mas não para a interação corante /espécies, a 5 % de probabilidade (Tabela 2). Dentre as espécies analisadas, *P. affinis hispidinervum* apresentou menor porcentagem de viabilidade do pólen e a maior foi observada em *P. hispidinervum* (Tabela 3). Grãos de pólen de vários tamanhos foram observados tanto no grupo dos viáveis quanto dos inviáveis.

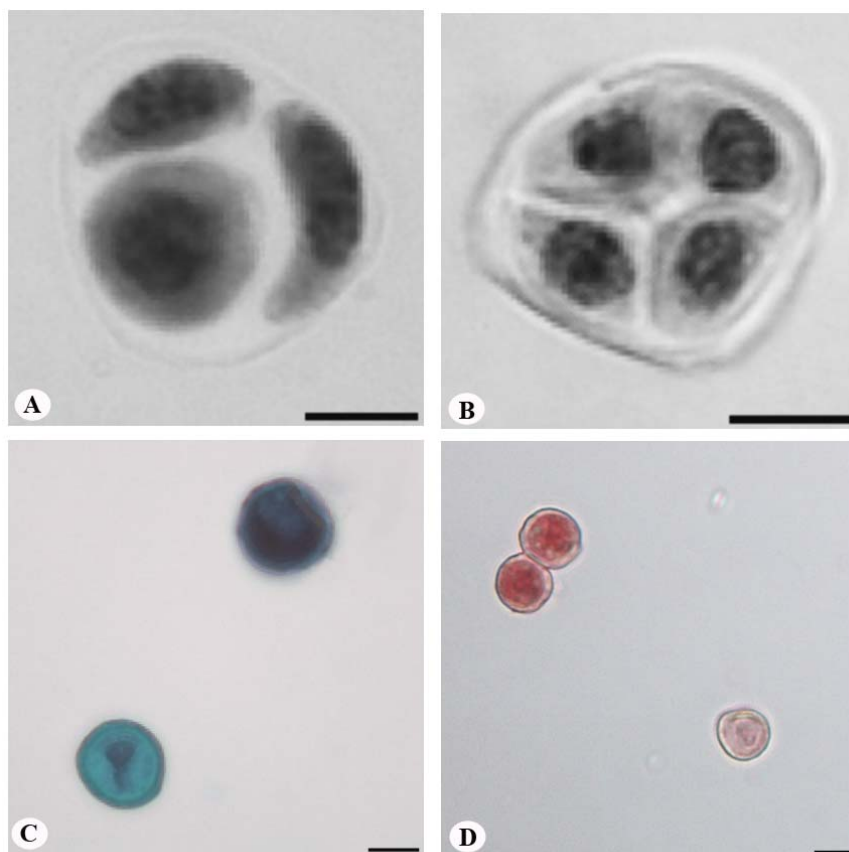


Figura 4 Produtos pós meióticos e viabilidade do grão de pólen representando *Piper aduncum*, *Piper affinis hispidinervum* e *Piper hispidinervum*. A – Tríade; B- Tétrade; C - Grãos de pólen corados com Alexander. D – Grãos de pólen corados com carmim propiônico 1%. (Barra=5 µm)

Tabela 2 Resumo da análise de variância da viabilidade polínica de *Piper aduncum*, *Piper affinis hispidinervum* e *Piper hispidinervum*

FV	GL	QM
		Viabilidade polínica
Espécie	2	14682.23*
Espécie*corante	4	34.05 ^{NS}
resíduo	21	11.83
Média geral	46,74	
CV	7,36	

* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; NS Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; CV – coeficiente de variação (%)

Tabela 3 Porcentagem da viabilidade do pólen das espécies de *Piper*

Espécies	% de viabilidade polínica
<i>P. aduncum</i>	45.4 b
<i>P. affinis hispidinervum</i>	9.1 c
<i>P. hispidinervum</i>	85.7 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo agrupamento, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

3.2 Estudo palinológico

P. aduncum, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum* apresentam grãos de pólen de âmbito circular, pequenos, muito semelhantes e com média da razão do diâmetro polar sobre o diâmetro equatorial (P/E) variando de 1,09 – 1,13 μm (Tabela 4). Estes valores classificam o grão de pólen, de acordo com Punt et al. (1999) como prolato esferoidal, tipo polínico com diâmetro polar maior que o equatorial (Figura 5).

A exina em *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum* apresenta-se um pouco menos espessa que em *P. hispidinervum* (Tabela 4). Os grãos de pólen das três espécies apresentaram exina escabrada e ondulada. As ondulações são maiores, se destacando com depressões mais profundas e formando canaletas sinuosas em *P. aduncum*. Em *P. affinis hispidinervum*, as ondulações são mais rasas e também formam canaletas sinuosas. Entretanto, em *P. hispidinervum* as ondulações são bem rasas e menos pronunciadas (Figura 6 b,c e,f,j,l).

Em *P. aduncum* observou-se grãos de pólen com uma ou nenhuma abertura e também variação quanto à forma desta abertura: em algumas flores, nos grãos de pólen havia a presença de um colpóide e em outras um colpo no qual a exina estava se diferenciando (Figura 6a,b,d). *P. affinis hispidinervum* apresentou grãos de pólen sem abertura aparente (inaperturados) ou com uma única abertura, sendo variável (em forma de colpóide ou colpo recoberto com grânulos) de flor para flor (Figura 6 e,g,h). *P. hispidinervum*, no entanto, apresentou grãos de pólen inaperturados e alguns raros com uma abertura na forma de um colpóide (figura 6 i,j).

Tabela 4 Medidas em μm dos grãos de polens das espécies de *Piper*

Espécie	Exina		Diâmetro polar (P)		Diâmetro equatorial (E)	
	Faixa variação	X +/- s	Faixa variação	X +/- s	Faixa variação	X +/- s
<i>P. aduncum</i>	0.51 - 1.54	1.04 +/- 0.17	7.79 - 10.83	9.22 +/- 0.61	6.43 - 10.02	8.15 +/- 0.58
<i>P. affinis</i>						
<i>hipidinervum</i>	0.69 - 1.4	1.01 +/- 0.17	7.2 - 11.5	9.46 +/- 0.73	6.6 - 10.46	8.6 - 0.71
<i>P. hispidinervum</i>	0.65 - 1.66	1.13 +/- 0.2	7.86 - 11.91	9.88 +/- 0.84	7.02 - 11.01	9.04 +/- 0.77

X – média aritmética, s – desvio padrão da média.

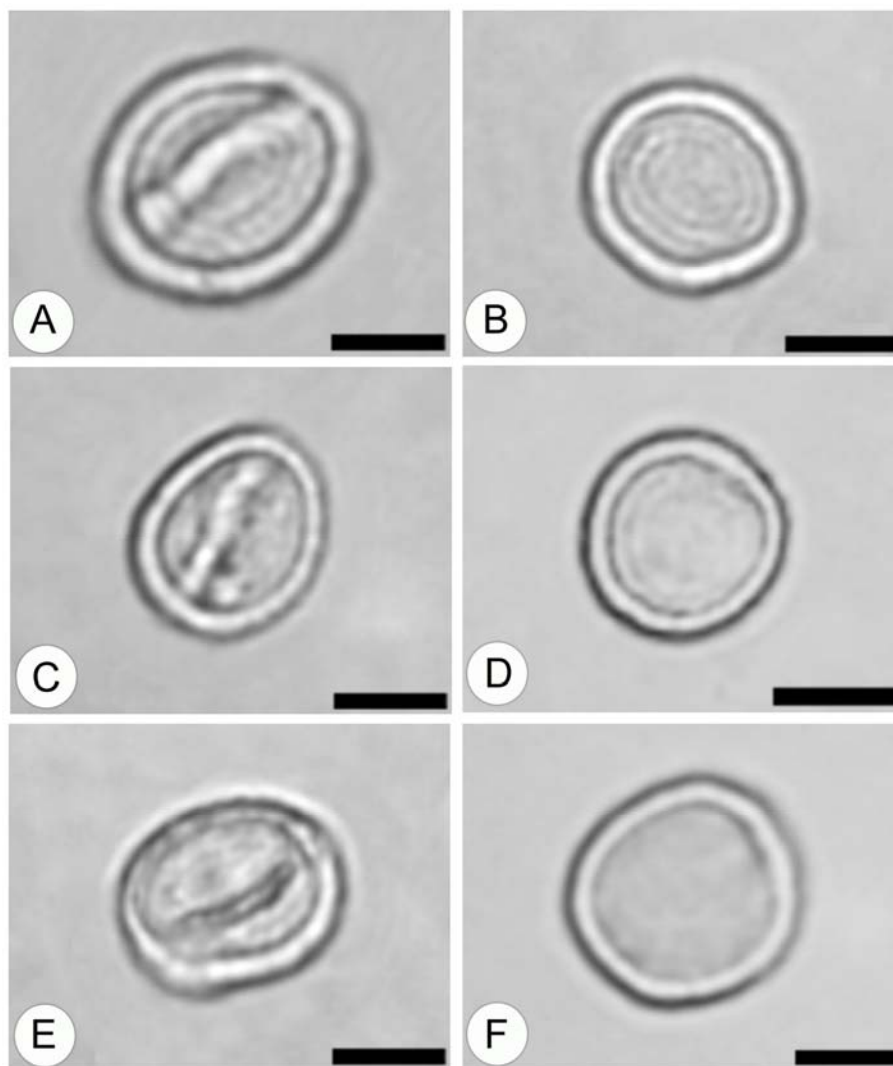


Figura 5 Visão equatorial de grãos de pólen acetolisados de espécies de *Piper*. A-B: *P. aduncum*; C-D: *P. affinis hispidinervum*; E-F: *P. hispidinervum*. (Barra=5 μ m)

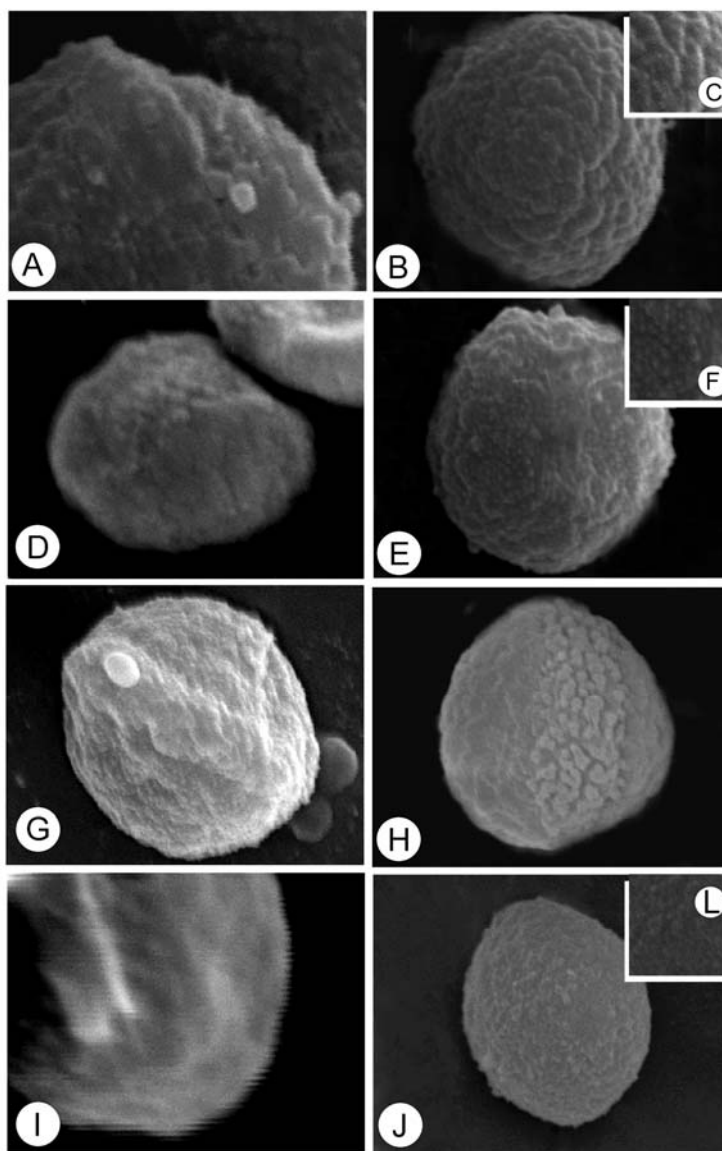


Figura 6 Visão equatorial dos grãos de pólen de espécies de *Piper* em MEV. (A-D)- *P. aduncum*: (A) Colpóide; (B) Pólen sem abertura aparente; (C) Detalhe da exina; (D) Colpo. (E-H) – *P. affinis hispidinervum*: (E) Pólen sem abertura aparente; (F) Detalhe da exina; (G) Colpóide; (H) Colpo. (I-L) *P. hispidinervum*: (I) Colpóide; (J) Pólen sem abertura aparente; (L) Detalhe da exina. Aumento aproximado de 35.000x

4 DISCUSSÃO

O estudo meiótico das espécies de *Piper* teve como principal complicador o reduzido tamanho dos botões florais das inflorescências que dificultou o manuseio dos mesmos. O tamanho ideal da inflorescência para obtenção de meiócitos variou de 4 a 6 cm. No entanto, não foi encontrada uma boa correlação entre esse comprimento e o estágio de desenvolvimento dos meiócitos, o que demonstra uma assincronia entre desenvolvimento do botão floral e a ocorrência da meiose nas anteras.

Considerando, nas três espécies em estudos, a porcentagem de células em metáfase I que apresentaram irregularidades (cromossomos com posicionamento incorreto) (Tabela1) e a baixa ou nenhuma taxa de anormalidades nas fases seguintes, pode-se inferir que o mecanismo de ponto de checagem de fuso foi eficiente. Esse mecanismo detecta a presença de um único cinetócoro não ligado ao fuso e bloqueia o progresso da mitose até que o cinetócoro não ligado se ligue a um microtúbulo (RISSO-PASCOTTO et al., 2003). Essa eficiência pode ser melhor constatada em *P. affinis hispidinervum* a qual não apresentou irregularidades meióticas na anáfase I e telófase I. Em *P. aduncum* o ponto de checagem pode ser considerado eficiente mesmo pelas porcentagens de anormalidades em anáfase I (7.89%) e telófase I (6.03%) uma vez que houve uma redução na porcentagem destas quando comparadas à metáfase I.

A eficiência do ponto de checagem também pode ser constatada na meiose II. Mais uma vez, *P. affinis hispidinervum* apresentou irregularidades na metáfase II, mas em anáfase II e telófase II não foi constatada nenhuma irregularidade (tabela 1). Em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, a porcentagem de anormalidades caiu significativamente de metáfase II para anáfase II, não sendo observada nenhuma irregularidade na telófase II (tabela 1).

Na segunda divisão meiótica, a assincronia entre duas células irmãs foi observada em centenas de meiócitos em *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* (tabela 1). Em alguns meiócitos, esse assincronismo pode ter levado à formação de núcleos contendo diferentes tamanhos, o que pode ser relacionado com um desbalanço da quantidade de material genético entre os núcleos. A assincronia foi observada desde o final de telófase I até o começo de telófase II.

Alguns trabalhos têm relatado essa divisão assincrônica das células na meiose e diferentes graus de condensação entre os núcleos de um meiócito (ANDRADA; LOZZIA; CRISTOBAL, 2009; FERREIRA et al. 2010, MARTINS et al., 2010; RISSO-PASCOTTO et al., 2003). Andrada, Lozzia e Cristobal (2009) avaliaram o comportamento meiótico de *Piper hieronymi* e *Piper tucumanum* e observaram que em *P. hieronymi* células com diferentes graus de condensação entre os núcleos foram freqüentes.

As configurações das tétrades seguem dois padrões de citocinese, determinados pelo momento em que ela ocorre durante a meiose: quando as paredes celulares são formadas tanto após a meiose I quanto após a meiose II a citocinese é dita sucessiva, e quando não ocorre citocinese até que ambas as divisões meióticas nucleares estejam completas a citocinese é simultânea (FURNESS; RUDALL, 2004).

Na microsporogênese simultânea, os dois núcleos resultantes da primeira divisão meiótica geralmente entram em meiose II de forma assíncrona. A orientação do eixo durante a meiose II é variável, e os fusos podem ou não interagir uns com os outros. Se eles não interagem, em seguida, os eixos na meiose II normalmente permanecem perpendiculares aos da meiose I. Se os eixos interagem, eles conectam três ou todos os quatro núcleos, resultando na plasticidade observada na configuração das tétrades (GONZÁLEZ; RUDALL; FURNESS, 2001).

Diante do exposto, o alto número de células em meiose II em divisão assíncrona e com posição irregular da placa equatorial além das tétrades que, em sua maioria se apresentaram de forma tetragonal (figura 4 b) podem ser explicadas pela citocinese do tipo simultânea em *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. Citocinese desse tipo é comum em Piperaceae. (FURNESS; RUDALL, 2004; GONZÁLEZ; RUDALL; FURNESS, 2001). González, Rudall e Furness (2001) entretanto, observaram que, dentro de Aristolochiaceae (Piperales) microsporogênese do tipo simultânea e sucessiva podem ocorrer. Segundo os autores citocinese simultânea é, aparentemente, um caráter plesiomórfico dentro de Piperales

Em relação à viabilidade do grão de pólen, a interação não significativa entre os corantes e as espécies revela a eficácia dos corantes utilizados, podendo-se utilizar o carmim propiônico 1% ou o Corante de Alexander sem prejuízo na determinação da viabilidade do pólen (tabela 2, figura 4 c-d). Munhoz et al. (2008) analisaram os corantes Alexander e carmim acético em *Carica papaya* e verificaram que esses corantes são eficientes na determinação de constituintes celulares e da integridade do grão de pólen.

O potencial germinativo do pólen foi menor em *P. affinis hispidinervum* e maior em *P. hispidinervum* o que demonstra pouca relação com as anormalidades meióticas uma vez que o índice meiótico para as espécies foi próximo de 74% (tabela 1). Uma das prováveis explicações para a baixa viabilidade do pólen em *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum* seriam as irregularidades pós-meioticas. As mitoses que ocorrem na maturação do grão de pólen poderiam também estar influenciando a baixa viabilidade do pólen principalmente em *P. affinis hispidinervum*. Porém, como estas espécies produzem um número muito grande de grãos de pólen, essa baixa viabilidade deve ser compensada, uma vez que a produção de sementes nestas espécies é satisfatória.

A classificação palinológica dos grãos de pólen como pequenos é coerente com os trabalhos para o gênero e para a família (BARTH; BARBOSA, 1975; BAUERMANN; EVALDT; CASTELO BRANCO, 2009; LEI; LIANG, 1998). A classificação dos mesmos como prolato esferoidais também foi descrita por Bauermann et al. (2009) para *P. gaudichaudianum*, *P. miquelianum* e *P. xylosteoide*. Barth e Barbosa (1975), ao descreverem características polínicas das espécies *P. gaudichaudianum*, *Piper lindbergii*, *Piper richardiaefolium*, determinaram medidas do diâmetro polar (P) e do diâmetro equatorial, sem, no entanto, apresentar uma classificação quanto ao tipo polínico. Como essas medidas estão muito próximas das encontradas nesses trabalhos pode-se inferir que a classificação dos grãos de pólen estudados pelos autores é semelhante a prolato esferoidais, confirmando a homogeneidade morfológica para o gênero.

A espessura da exina se diferenciou em *P. hispidinervum* na qual foi mais espessa (Tabela 4). Essa característica não se diferencia muito de outras espécies do gênero. A espessura da exina em *P. gaudichaudianum* apresenta 0,9 µm, *P. lindbergii* 1,4 µm e 1,2 µm em *P. richardiaefolium* (BARTH; BARBOSA, 1975). Comparando a espessura da exina de Piper com alguns trabalhos da literatura (CRESPO; FERREIRA, 2006; LEITE; SIMÃO-BIANCHINI; SANTOS, 2005; MENDONÇA et al., 2007; VITAL; SANTOS; ALVES, 2008) pode-se observar que esse gênero não possui uma exina espessa o que pode facilitar a germinação do tubo polínico.

A ornamentação da exina diferenciou as três espécies em estudo. Embora todas sejam classificadas como escabradadas, as ondulações são determinantes para se distinguir *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. A distinção da exina pelo padrão de ondulação também foi relatada por Barth e Barbosa (1975) e por Lei e Liang (1998) para espécies do gênero *Piper* e *Peperomia*. Entretanto, Lei e Liang (1998) classificaram a exina

dos grãos de pólen de espécies do gênero *Piper* encontradas na Ásia, principalmente na Índia e China, variando de verrucada a semiverrucada.

A exina do colpo de *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum*, mesmo sendo escabrada, apresentou granulações (figura 6 d-h). Essa característica de granulações na extensão de todo o colpo também é relatada para *P. gaudichaudianum*, *P. lindbergii*, *P. richardiaefolium* (BARTH; BARBOSA, 1975). A exina do gênero *Piper* parece se diferenciar de *Peperomia* que apresenta exina verrucada (BAUERMANN; EVALDT; CASTELO BRANCO, 2009; LEI; LIANG, 1998).

A pouca ornamentação da exina observada nas espécies de *Piper* está relacionada com o tipo de polinização. Espécies com grãos de pólen com exina pouco ornamentada podem ser polinizadas pelo vento ou água, pois não apresentam maiores atrativos para insetos, aves e pequenos animais, enquanto que aqueles polens com exina reticulada ou equinulada podem ser associados com a polinização biótica (LUMAGA; COZZOLINO; KOCYAN, 2006). A maioria das espécies da família Piperaceae tem polinização pelo vento e/ou insetos. Em *P. aduncum* foi observada a polinização do tipo anemofilia e a miofilia (KINOSHITA et al., 2006) enquanto Thomazini e Thomazini (2002) verificaram abundância e frequência de visitas de abelhas nas inflorescências de *P. hispidinervum*. A possibilidade de polinização das espécies de Piperaceae por um agente abiótico, mesmo nas que apresentam elevada visitação de insetos, pode ser importante para minimizar uma eventual deficiência da polinização biótica nas épocas de menor abundância de polinizadores (FIGUEIREDO, 1997).

P. aduncum, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* parecem estar passando por um processo evolutivo no que diz respeito à abertura do pólen. Os pólenes sem abertura aparente podem ser considerados como inaperturados e estes são produzidos pelas três espécies. Foi possível observar que *P.*

hispidinervum apresenta maior frequência de pólen inaperturados enquanto *P. affinis hispidinervum* a menor.

Uma forma colpóide pode ser interpretada como uma forma primitiva do colpo. *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum* podem ser consideradas espécies mais derivadas, pois os grãos de pólen apresentam uma abertura na forma de colpóide ou de colpo. Por outro lado, *P. hispidinervum*, quando apresenta abertura, é apenas na forma colpóide. Portanto, para essas três espécies é reconhecido o potencial para produzir os três tipos de pólen: inaperturados (*P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*), com um colpóide (*P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*) e com um colpo (*P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum*).

Um aumento do número de aberturas oferece uma vantagem seletiva, pois aumenta o número de sítios potenciais de germinação, facilitando o contato entre pelo menos uma abertura e a superfície estigmática. Esse aumento ocorreu na base do clado das eudicotiledôneas, juntamente com uma aparente mudança fundamental na posição da abertura, que passou de polar a equatorial. Polens com apenas uma abertura representam um clado com uma série de angiospermas basais incluindo Piperales e monocotiledôneas (FURNESS; RUDALL, 2004).

A ausência de abertura ou presença de uma única abertura parece ser comum em Piperaceae. Em *Peperomia*, assim como em *Piper*, alguns polens inaperturados puderam ser observados (BAUERMAN; EVALDT; CASTELO BRANCO, 2009; LEI; LIANG, 1998). Os polens inaperturados encontrados em *Piper* podem ser estéreis (servem como atrativo ou alimentação) ou férteis (FURNESS; RUDALL, 1999, 2000). A maioria dos pólenes inaperturados férteis tem uma exina fina, ou a exina é restrita aos componentes isolados (muros e protuberâncias) separados por áreas mais finas que provavelmente devem funcionar como aberturas (FURNESS, 2007). Como a porcentagem de viabilidade polínica em *P. hispidinervum* é alta e a exina não é considerada

espessa, pelo menos nessa espécie, a grande maioria dos pólenes inaperturados deve ser fértil.

A formação de pólenes inaperturados em *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* não deve estar relacionada ao tipo de citocinese, uma vez que a orientação das tétrades não tem influência no desenvolvimento desse tipo polínico (FURNESS; RUDALL, 1999, 2000; 2007). A formação desse tipo de pólen pode estar associado à ausência de um escudo colpal do retículo endoplasmático na fase de tétrade que leva a deposição da primexine entre a membrana plasmática e parede ser ininterrupta em torno de cada micrósporo. (FURNESS, 2007).

No entanto, investigações a respeito do padrão da citocinese no gênero *Piper* são necessárias para se compreender melhor a formação dos grãos de pólen e a evolução da abertura dos mesmos.

5 CONCLUSÕES

P. aduncum, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* apresentam irregularidades meióticas semelhantes, porém a viabilidade dos grãos de pólen dessas espécies foram significativamente diferentes o que sugere que eventos pós-meióticos podem estar influenciando na viabilidade.

Os grãos de pólen apresentaram uma homogeneidade morfológica divergindo, no entanto, quanto ao tipo de exina e ao número e a forma da abertura.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ANDRADA, A. R.; LOZZIA, M. E.; CRISTOBAL, M. E. Cytological studies in *Piper tucumanum* C. DC. and *Piper hieronymi* C. DC. **Lilloa**: revista de botânica, v. 46, n. 1/2, p. 3-9, 2009.
- BARTH, O. M.; BARBOSA, A. F. Catálogo sistemático dos pólenes das plantas arbóreas do Brasil Meridional: XX - Chloranthaceae e Piperaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1/2, p. 101-108, 1975.
- BAUERMANN, S. G.; EVALDT, A. C. P.; CASTELO BRANCO, S. Atlas de pólen e esporos do vale do Rio Caí, RS, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 5, p. 895-905, set./out. 2009.
- BIZZO, H. R. et al. Sarisan from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C. DC (Long pepper). **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 16, n. 2, p. 113-115, Feb. 2001.
- CRESPO, S. R. de M.; FERREIRA, W. M. Morfologia polínica dos gêneros *Curtia* Cham. & Schltdl. e *Hockinia* Gardner (Gentianaceae Juss.). **Acta Botanica Brasil**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 273-284, abr./jun. 2006.
- ERDTMAN, V. **Pollen morphology and plant taxonomy**: angiosperms. Stockholm: Almqvist & Wilsell, 1952. 539 p.
- FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DO AMAZONAS. Pelo aproveitamento racional das plantas medicinais da Amazônia. In: **AGRIANUAL 2002**: anuário da agricultura brasileira, São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2002. p. 28-29.
- FERREIRA, K. et al. Abnormal meiotic behavior in three species of *Crotalaria*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1641-1646, Dec. 2009.
- FERREIRA, K. et al. Karyotype, meiotic behavior and pollen features of *Senna occidentalis*. **Biologia**, Bratislava, v. 65, n. 5, p. 789-795, Oct. 2010.

FIGUEIREDO, R. A. **Fenologia e ecologia da polinização de espécies de Piperaceae em mata semidecídua do sudeste brasileiro**. 1997. 145 p. Tese (Doutorado em ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

FURNESS, C. A. Why does some pollen lack apertures? A review of inaperturate pollen in eudicots. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 155, n. 1, p. 29-48, Sept. 2007.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Aperture absence in pollen of monocotyledons. In: HARLEY, M. M.; MORTON, C. M. BLACKMORE, S. (Ed.). **Pollen and spores: morphology and biology**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2000. p. 249–257

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Inaperturate pollen in monocotyledons. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 160, n. 2, p. 395-414, Mar. 1999.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Pollen aperture evolution – a crucial factor for eudicot success? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 1360–1385, Mar. 2004.

FURNESS, C. A.; RUDALL P. J.; SAMPSON, F. B. Evolution of microsporogenesis in Angiosperms. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 163, n. 2, p. 235-260, Mar. 2002.

GONZALEZ, F.; RUDALL, P. J.; FURNESS, C. A. Microsporogenesis and systematics of Aristolochiaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 137, n. 3, p. 221-242, Nov. 2001.

KINOSHITA, L. S. et al. Composição florística e síndromes de polinização e de dispersão da mata do Sítio São Francisco, Campinas, SP. **Acta Botanica Brasílica**, Porto Alegre, v. 20, n. 2, p. 313-327, jun. 2006.

KUBITZKI, K.; ROHWER J. G.; BITTRICH, V. [Ed.]. **Flowering plants. Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families**. Berlin: Springer, 1993.

KUMAR, P. et al. Cytomixis and associated meiotic abnormalities affecting pollen fertility in *Clematis orientalis*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 54, n. 1, p. 181-184, Mar. 2010.

LEI, L. G.; LIANG, H. X. Pollen morphology and its taxonomic significance in Piperaceae. **Acta Botanica Yunnanica**, Kunming, v. 20, n. 4, p. 429–433, Aug. 1998.

LEITE, K. R. B.; SIMÃO-BIANCHINI, R.; SANTOS, F. A. R. Morfologia polínica do gênero *Merremia* Dennst. (Convolvulaceae) ocorrentes no Estado da Bahia, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, Porto Alegre, v. 19, n. 2, p. 313-321, jun. 2005.

LOVE, R. M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**, Madison, v. 43, n. 2, p. 72-76, 1951.

LUMAGA, M. R.; COZZOLINO, S.; KOCYAN, A. Exine Micromorphology of Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae): Phylogenetic Constraints or Ecological Influences? **Annals of Botany**, London, v. 98, n. 1, p. 237-244, July 2006.

MARTINS, K. C. et al. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 8, p. 1746-1751, ago, 2010.

MENDONÇA, C. B. et al. Estudio Polínico de *Albertinia brasiliensis* Spreng., de las Especies de *Cololobus* H. Rob., *Curtocymura* H. Rob. Y *Dasyanthina serrata* (Less.) H. Rob. (Vernoninae-Compositae) que Ocurren en el Sudeste de Brasil. **Polibotánica**, Colonia Santo Tomás, v. 23, p. 77-92, 2007.

MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, abr./jun. 2008

PIMENTEL, F. A.; PEREIRA, J. B. M.; OLIVEIRA, M. N. de. **Zoneamento e caracterização de habitats naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) no Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 17 p. (Boletim de Pesquisa, 20).

PUNT, W. et al. **Glossary of pollen and spore terminology**. Utrecht, 1999. Disponível em: < <http://www.biol.ruu.nl/>>. Acesso em : 30 may 2011.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Chromosome number and microsporogenesis of two accessions of *Brachiaria dura* Stapf (Poaceae). **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 257-261, Apr./Jun. 2009.

RISSO-PASCOTTO, C. et al. **Comportamento citológico atípico durante a microsporogênese em *Brachiaria ruziziensis* e *B. decumbens***. Campo Grande: Embrapa gado de corte, 2003. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 16)

ROCHA, S. F. R.; MING, L. C. Piper hispidinervum: a sustainable source of safrole. In: JANICK, J. (Ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS, 1999. p. 479-481.

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. (Boletim de Pesquisa, 23).

SOLTIS, P. A.; SOLTIS, D. E.; CHASE, M. W. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. **Nature**, London, v. 402, p. 402–404, Nov. 1999.

THOMAZINI, M. J.; THOMAZINI, A. P. de B. W. Diversidade de Abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em Inflorescências de *Piper hispidinervum* (C.DC.). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 27-34, jan./mar. 2002.

VITAL, M. T. A. B.; SANTOS, F. D. A. R.; ALVES, M. Diversidade palinológica das Convolvulaceae do Parque Nacional do Catimbau, Buíque, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 22, n. 4, p. 1163-1171, 2008.

ARTIGO 3

Anatomia foliar, padrão de venação e histoquímica de três espécies do gênero *Piper* L. (Piperaceae)

RESUMO

Dentre as espécies de *Piper* produtoras de óleos essenciais encontradas na Amazônia brasileira destacam-se *Piper aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. Visando contribuir para solução de controvérsia taxonômica que envolve essas espécies de *Piper*, o objetivo desse trabalho foi o estudo da anatomia, do padrão de venação e da histoquímica das folhas de *Piper aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. Lâminas com secções paradérmicas e transversais, bem como folhas diafanizadas, foram preparadas segundo as técnicas usuais em anatomia vegetal. As folhas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* são hipoestomáticas enquanto as de *P. affinis hispidinervum*, anfi hipoestomáticas. Os complexos estomáticos nas espécies variam no número de células subsidiárias (de 3 a 6) podendo ser classificados como tetracíticos, anisocíticos ou estaurocíticos. Além dos estômatos, tricomas glandulares e tectores foram observados na epiderme foliar. Em *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* é possível verificar a existência de epiderme uniestratificada, além de uma camada subepidérmica que se torna descontínua nas regiões onde estão presentes os estômatos. O mesofilo é heterogêneo assimétrico, caracterizando a folha como dorsiventral. Idioblastos oleíferos estão presentes por todo parênquima clorofiliano, inclusive junto à hipoderme das duas faces da folha. A nervura central na altura mediana da folha possui feixes vasculares colaterais abertos dispostos em forma de arco, variando em número nas três espécies e envoltos por parênquima fundamental. O teste histoquímico revelou a presença de lipídeos, amido e substâncias pécnicas nas folhas. As três espécies não diferiram quanto ao padrão de venação apresentando venação penada, camptódroma, eucamptódroma, com nervuras até a quarta ordem. Um dendograma baseado em Distância Euclidiana com todas as características analisadas foi contruído possibilitando a visualização de uma maior proximidade entre *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum*.

Palavras-chave: *Piper*. Anatomia foliar. Histoquímica. Padrão de venação. Taxonomia.

ABSTRACT

Among the Brazilian species of *Piper* rich in essential oils, we can highlight *Piper aduncum*, *P. affinis hispidinervum* and *P. hispidinervum*. In order to contribute to the taxonomic definition of these three *Piper* species, the objective was to characterize anatomy, histochemistry and venation pattern of leaves of *Piper aduncum*, *P. hispidinervum affinis* and *P. hispidinervum*. Paradermic and transverse sections, in addition to diaphanized leaves were analysed. The leaves of *P. aduncum* and *P. hispidinervum* are hypostomatic while *P. affinis hispidinervum* ones are amphihypostomatic. The stomatal complex varies in the number of cells (3-6) and stomata are classified as tetracytic, anisocytic or staurocytic. In addition to the stomata, glandular and tector trichomes were observed in the epidermal surfaces of leaves. In *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* and *P. hispidinervum* is possible to verify the existence of a single-layered epidermis and a subepidermal layer, which becomes discontinuous in the regions where the stomata are present. The mesophyll is heterogeneous asymmetric, characterizing a dorsiventral leaf. Lipidic idioblasts are present throughout chlorenchyma, including the hypodermis along the two sides. The central vein, in the medium region of leaf, has opened collateral vascular bundles that are arranged in an arc shape, varying in number in the three species and surrounded by fundamental parenchyma. The histochemical tests revealed the presence of lipids, starch and pectic substances in the leaves. The pattern of venation, described as pennate, camptodroma, eucamptodroma, with veins up to fourth order, was the same for all species. A dendrogram based on Euclidean distance of all the features analyzed showed higher similarity between *P. aduncum* and *P. affinis hispidinervum*.

Keywords: *Piper*. Leaf anatomy. Histochemistry. Venation patterns. Taxonomy.

1 INTRODUÇÃO

Inserida em Piperales, ordem basal e primitiva das angiospermas, Piperaceae compreende seis gêneros, dentre os quais se destaca o gênero *Piper* L. com aproximadamente 2000 espécies (APG III, 2009). No Brasil, existem cerca de 76 espécies descritas para este gênero, havendo uma grande diversidade no estado do Acre (EHRINGHAUS, 1997). Algumas dessas espécies merecem atenção pela importância econômica do óleo essencial, como *Piper hispidinervum* C. DC., rica em safrol (87% a 97%), *Piper aduncum* L., que apresenta o dilapiol como componente principal (58% a 88,4%) e *Piper affinis hispidinervum*, rica em sarisan (70% a 80%) (GOTTLIEB et al., 1981; PIMENTEL et al., 1998, SILVA e OLIVEIRA, 2000; BIZZO et al., 2001; ESTRELA et al., 2006, FAZOLIN, 2007). Embora possa ser observada diferença na produção desses óleos essenciais, há uma grande dificuldade na delimitação taxonômica dessas espécies, uma vez que elas são morfológicamente muito semelhantes.

Uma ferramenta utilizada para ajudar na diferenciação de *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *Piper affinis hispidinervum* é a análise das características morfológicas e foliares. *P. hispidinervum*, também conhecida como pimenta longa, é arbustiva, com ramos não-pubescentes, com pecíolo variando de 0,1 a 0,2 cm de comprimento. Suas folhas são oblongo-lanceoladas ou oblongoelípticas, variando de 14,5 a 22 cm de comprimento e de quatro a sete cm de largura; ápice acuminado a levemente cuspidado; base oblíqua a inequilátera; levemente ásperas na face ventral (SILVA e OLIVEIRA 2000). Já *P. aduncum*, conhecida popularmente como pimenta de macaco, apresenta arbusto com ramos pubescentes com pecíolo de 0,2 a 0,4 cm de comprimento, sem bainha. Suas folhas são elípticas ou lanceoladas, com aproximadamente 20 cm de comprimento; sete cm de largura; ápice acuminado e base redonda ou cordulata; áspera nas faces dorsal e ventral (SILVA e OLIVEIRA 2000).

Apesar da semelhança morfológica entre as espécies de *Piper*, Albiero et al (2006) afirmam que a localização e o número de estratos celulares da hipoderme na folha, os tipos de tricomas e sua localização, as células e os idioblastos oleíferos, bem como a natureza química de seu conteúdo são bons caracteres para auxiliar em estudos taxonômicos do gênero *Piper*.

Além do estudo da anatomia, a compreensão da arquitetura das folhas também pode fornecer importantes subsídios taxonômicos. Comparando a arquitetura foliar de *P. hispidinervum* (NASCIMENTO E VILHENA-POTIGUARA, 1999) e *P. hispidum* (ALBIERO et al., 2006) é possível observar uma diferença no padrão de venação entre elas. Enquanto em *P. hispidinervum* o padrão de venação é do tipo camptódromo- eucamptódromo, em *P. hispidum* é do tipo camptódromo-bronquidódromo. No entanto, nem sempre essa ferramenta é suficiente para a discriminação das espécies, sendo necessário aliá-la a outras informações como: anatômicas, citogenéticas e de marcadores.

A correta identificação de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* é necessária para o programa de melhoramento da Pimenta Longa da Embrapa Acre, que visa a obtenção de genótipos superiores na produção de safrol. Portanto, este estudo visa à caracterização anatômica das folhas, bem como a análise histoquímica e do padrão de venação das três espécies de *Piper*, buscando subsídios para a distinção das mesmas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material genético

Foram utilizadas folhas de três espécies do gênero *Piper*: *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. As plantas utilizadas encontram-se em cultivo no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Acre.

2.2 Obtenção e análise dos cortes anatômicos

2.2.1 Cortes paradérmicos

Folhas de 20 indivíduos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* e de 10 indivíduos de *P. affinis hispidinervum* foram coletadas da porção mediana da planta, fixadas e armazenadas em etanol 70%.

Secções paradérmicas foram efetuadas nas faces adaxial e abaxial de duas folhas por planta e coradas com uma solução de safranina 1%. De cada folha foi montada uma lâmina em glicerina 70% contendo cinco cortes, totalizando 200 observações para *P. aduncum* e *P. hispidinervum* e 100 para *P. affinis hispidinervum*.

Foram calculadas, para a face adaxial de cada espécie, as densidades de células epidérmicas ($DCE = \text{número de células/mm}^2$) e de estômatos ($DE = \text{número de estômatos/mm}^2$). A porcentagem dos tipos de estômatos foi obtida nos mesmos campos onde se avaliou a densidade dos mesmos. Os diâmetros polar (DP) e equatorial (DEQ) dos estômatos foram mensurados e a razão DP/DEQ foi utilizada para se determinar a forma dos estômatos.

2.2.2 Cortes transversais, análise de tricomas e testes histoquímicos

Folhas de cinco indivíduos de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* foram coletadas da porção mediana da planta e fixadas em Karnovsky (Karnovsky, 1965).

As amostras foram submetidas a uma série crescente de desidratação em etanol (70, 94 e 100%), infiltradas e incluídas em hidroxietilmetacrilato Leica® segundo protocolo do fabricante, para a confecção do laminário permanente.

Os cortes foram obtidos em micrótomo rotativo e corados com Azul de Toluidina pH 6,8 (O'BRIEN; MCCULLY, 1981). As lâminas de duas folhas por indivíduo foram montadas em Bálsamo do Canadá, sendo que cada lâmina continha cinco cortes, totalizando 50 imagens analisadas por espécie. Além da descrição qualitativa, foram feitas medições da espessura da epiderme nas faces abaxial e adaxial e dos parênquimas paliçádico e lacunoso, componentes do mesofilo.

Secções transversais das mesmas folhas de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* utilizadas para os cortes transversais foram usadas para análise de tricomas e testes histoquímicos.

Em microscopia de luz foi realizada a contagem de tricomas nas faces adaxial e abaxial de duas folhas por indivíduo, sendo que cada lâmina, preparada pelo método de impressão (com auxílio de uma fita adesiva tira-se uma impressão da folha), continha cinco cortes, totalizando 50 observações por espécie.

Os tipos de tricomas foram determinados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, as folhas fixadas foram lavadas três vezes por dez minutos em tampão cacodilato e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por duas horas, à temperatura ambiente. Após este período os espécimes foram lavados por três vezes em água destilada, desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes), levados ao aparelho de ponto crítico

(CPD 030) e de evaporador de ouro (SCD 050), sendo analisados em aparelho MEV-LEO-EVO40.

Na análise histoquímica utilizou-se: solução de Sudan Black B (PEARSE, 1980), Sudan III em solução alcoólica (JOHANSEN, 1940) e Sufato Azul do Nilo (CAIN, 1947) para evidenciar substâncias lipídicas; Azul de toluidina pH 6.8 (O'BRIEN; MCCULLY, 1981) e Cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para localizar compostos fenólicos; ácido periódico/reagente de Schiff (PAS) (FEDER; O'BRIEN, 1968; MAIA, 1979) para detecção de polissacarídeos, substâncias pécnicas e mucilagens; reagente de Lugol (JOHANSEN, 1940) para localização de amido; Xilidine Ponceau (O'BRIEN; MCCULLY, 1981) para proteínas totais e Reagente de Wagner (FURR; MAHLBERG, 1981) para observação de alcalóides.

2.2.3 Obtenção das medidas e análise estatística

As medidas foram realizadas com o software Image Tool 3.00 da UTHSCA (The University of Texas Health Science Center in San Antonio), no Laboratório de Citogenética da UFLA.

Os dados obtidos foram transformados (raiz quadrada) e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade utilizando o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

A similaridade entre as três espécies foi estimada usando distâncias Euclidianas calculadas a partir das médias das características que foram mensuradas, sendo gerado um dendrograma utilizando o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

2.3 Padrão de venação

Cinco folhas de cada espécie (*P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum* *P. hispidinervum*) coletadas da porção mediana e fixadas etanol 70% foram utilizadas para o estudo.

As amostras foram clarificadas adotando o protocolo de diafanização descrito por Strittmatter (1973) com modificações: ebulição durante 10 min em álcool etílico absoluto; ebulição durante 10 min em solução de álcool etílico absoluto e hipoclorito de sódio em partes iguais; lavagem em água destilada; clarificação com solução aquosa de hipoclorito de sódio durante 10 a 15 min, seguida de lavagem em água destilada. O padrão vascular e morfológico foi determinado de acordo com Hickey (1979).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A face adaxial da epiderme de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* é constituída, predominantemente, de células ordinárias alongadas e heterodimensionais, embora células anexas, estômatos e tricomas também tenham sido encontrados (Figura 1). Houve uma clara distinção entre as espécies com relação ao número de estômatos da face adaxial. Em *P. aduncum* (Figura 1 a) não existem estômatos, em *P. affinis hispidinervum*, cerca de 3 a 4 estômatos foram observados por campo (Figura 1 c) e em *P. hispidinervum* eles são raros ou inexistentes (Figura 1 e).

Wilkinson (1979) afirma que presença ou ausência de estômatos na epiderme das faces adaxial ou abaxial das folhas, bem como o arranjo das células epidérmicas adjacentes às células-guarda são características diagnósticas importantes taxonomicamente.

Foram encontrados estômatos na face abaxial da epiderme das três espécies (Figura 1 b,d,f). Por não apresentarem estômatos ou estes serem raros na face adaxial, *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, foram classificadas como hipoestomáticas, enquanto *P. affinis hispidinervum* foi classificada como anfilipoestomática. Esta classificação também foi descrita para algumas espécies do gênero como *P. diospyrifolium* (SOUZA; MOSCHETA; OLIVEIRA, 2004), *P. crassinervium*, *P. gaudichaudianum*, *P. hispidum* (ALBIERO et al., 2005a, 2005b, 2006) e inclusive para *P. aduncum* (VIANNA; AKISUE, 1997). Nascimento e Vilhena-Potiguara (1999), no entanto, caracterizaram *P. hispidinervum* como anfiestomática apesar de também terem observado raros estômatos na face adaxial.

As três espécies foram estatisticamente distintas para as características diâmetro polar e equatorial dos estômatos, densidade de células epidérmicas, densidade estomática e a forma do estômato (Tabelas 1 e 2).

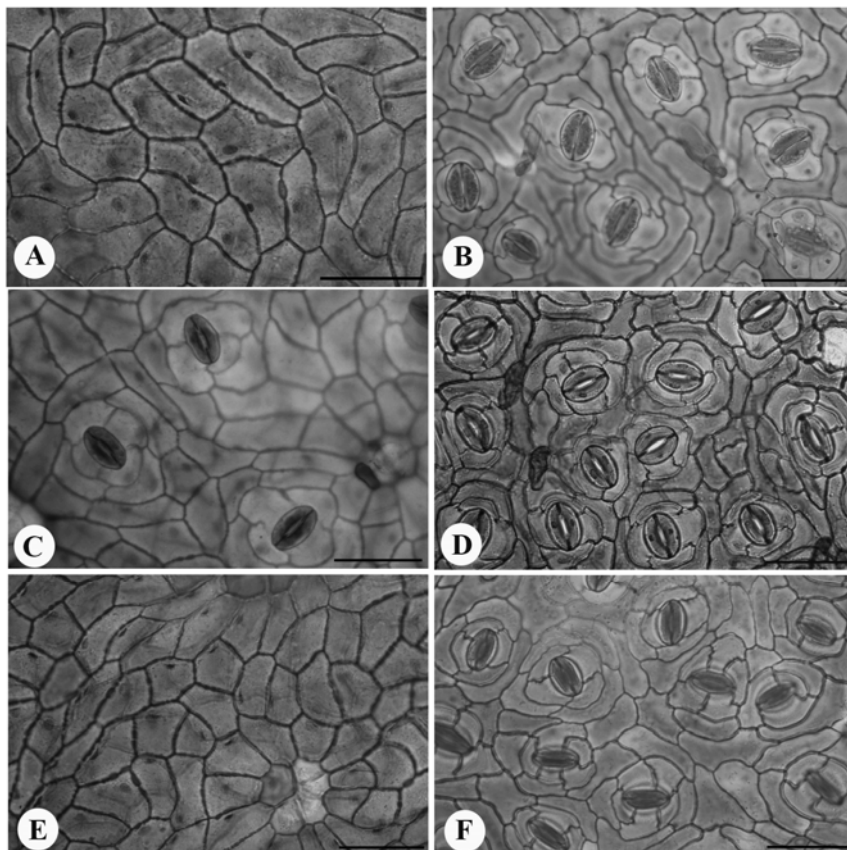


Figura 1 Secções paradérmicas das faces da epiderme de espécies de *Piper* L. (A) Face adaxial da epiderme de *P. aduncum* (B); Face abaxial da epiderme de *P. aduncum* (C) Face adaxial da epiderme de *P.affinis hispidinervum* (D); Face abaxial da epiderme de *P.affinis hispidinervum* (E); Face adaxial da epiderme de *P. hispidinervum* (F); Face abaxial da epiderme de *P. hispidinervum*. (Barra=50 μ m)

Tabela 1 Resumo das análises da variância de características dos estômatos e células epidérmicas da folha de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*

Quadarados Médios						
Fonte de Variação	GL	DP	DE	DCE	DES	FE
Espécie	2	7,7459**	12,7307**	25,0423**	5,1546**	0,02189**
Resíduo	47	0,2430	0,1221	1,3611	0,5954	0,00070

* significativo a 5% e ** 1% pelo teste F

(DP) Diâmetro polar do estômato; (DE) Diâmetro equatorial do estômato; (DCE) Densidade de células epidérmicas; (DES) Densidade estomática; (FE) Forma dos estômatos

Tabela 2 Valores médios de características dos estômatos e células epidérmicas da folha de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*

Espécie	DP (µm)	DE (µm)	DCE (n/mm ²)	DES (n/mm ²)	FE
<i>P. aduncum</i>	14,85 a	9,727 b	1250,33a	207,65b	1,53b
<i>P. affinis hispidinervum</i>	14,54 a	10,18 a	1151,24b	244,92a	1,42c
<i>P. hispidinervum</i>	13,63 b	8,459c	1098,26b	221,41b	1,61a
Média geral	14,30	9,31	1168,72	220,42	1,53

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

(DP) Diâmetro polar do estômato; (DE) Diâmetro equatorial do estômato; (DCE) Densidade de células epidérmicas; (DES) Densidade estomática; (FE) Forma dos estômatos

P. aduncum e *P. hispidinervum* apresentaram menor densidade estomática quando comparados a *P. affinis hispidinervum* (Tabela 2). Essa diferença no número de estômatos por área entre as espécies pode estar relacionada a maiores taxas de condutância estomática, transpiratória e fotossintética dessas plantas. Segundo Meidner e Mansfield (1986) a densidade estomática varia devido à influência de fatores ambientais durante o crescimento da planta.

De acordo com Larcher (1986) luminosidade, umidade e estresse hídrico são exemplos de fatores abióticos que influenciam as diferenças quanto ao número, distribuição e forma dos estômatos. As diferenças estomáticas encontradas para as espécies podem ser características específicas variando de acordo com as condições ambientais, uma vez que estas interferem diretamente nos mecanismos estomáticos. *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum*, e *P. hispidinervum* foram coletadas nos municípios do Estado do Acre em áreas de capoeiras abertas que surgiram em áreas de pastagens abandonadas e degradadas. Em nenhum dos municípios essas espécies foram encontradas em áreas de florestas primária e secundária, confirmando alta exigência da planta em relação à luz (PIMENTEL et al., 1998).

Segundo Khan et al. (2003), alterações na forma dos estômatos afetam diretamente a funcionalidade dos mesmos, sendo que a forma mais elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto que a forma mais esférica é, frequentemente, associada a estômatos com baixa funcionalidade em plantas *in vivo*. Embora os valores da razão DP/DE das três espécies de *Piper* sejam característicos de forma elíptica, elas diferiram com relação a essa característica (Tabelas 1 e 2). *P. hispidinervum* apresenta, potencialmente, estômatos mais funcionais, seguida por *P. aduncum* e finalmente por *P. affinis hispidinervum*. A funcionalidade estomática pode estar inversamente relacionada com a densidade dos estômatos, portanto, espera-se que a espécie com menor funcionalidade

apresente maior número de estômatos por área, fato este observado em *P. affinis hispidinervum* que apresentou a maior densidade estomática.

Uma vez que os estômatos estão relacionados diretamente com a transpiração, fotossíntese e respiração (VANNUCI; REZENDE, 2003), pode-se inferir que *P. hispidinervum* consegue suportar melhor as variações abióticas, pois estômatos mais funcionais podem garantir uma fotossíntese mais eficiente em condições adversas.

Os estômatos encontrados em *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* apresentaram de 3 a 6 células anexas podendo ser classificados como anisocíticos, tetracíticos ou estaurocíticos (Figura 2). Os estômatos com quatro células anexas foram classificados como tetracíticos por apresentarem duas células polares e duas laterais (Figura 2b). No entanto, alguns estômatos com quatro células anexas não apresentaram uma disposição do tetracítico típico, sendo então classificados como estaurocíticos (Figura 2C). Segundo Takemori, Bona e Alquini (2003) o fato de haver mais de um tipo estomático na mesma folha pode ser devido à existência de mais de uma rota ontogênica, o que poderá ser melhor compreendido em trabalhos futuros onde se explore melhor essa rota.

Nas três espécies descritas neste trabalho, estômatos do tipo tetracítico foram os mais comuns (Figura 1 e 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Nascimento e Vilhena-Potiguara (1999) em *P. hispidinervum* na qual estômatos do tipo ciclocíticos, anisocíticos e tetracíticos foram observados e o tipo tetracítico também predominou sobre os demais. Vianna e Akisue (1997) observaram estômatos anomocíticos ou tetracíticos que se distribuem de maneira regular na epiderme de *P. aduncum*. Estômatos do tipo tetracíticos também são comuns em *P. hispidum* que apresenta, além desses, alguns raros anisocíticos (ALBIERO et al., 2006). Em *P. crassinervium* os estômatos observados foram do tipo ciclocítico e tetracítico (ALBIERO et al., 2005a). A

variação do tipo de estômato já havia sido relatada para *Peperomia* por Takemori, Bona e Alquini (2003). Esses autores relatam que a ontogenia estomática é mesoperígena e dá origem a estômatos do tipo anisocítico, tetracítico e estaurocítico.

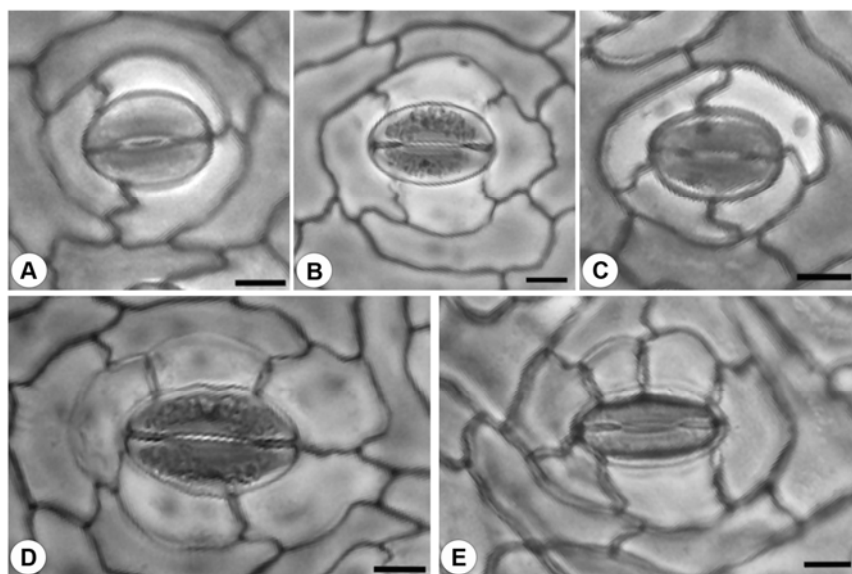


Figura 2 Tipos de estômatos encontrados nas folhas de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. (A) Anisocítico (B) Tetracítico. (C – E) Estaurocítico com diferente número de células guarda. Barra = 10 μm

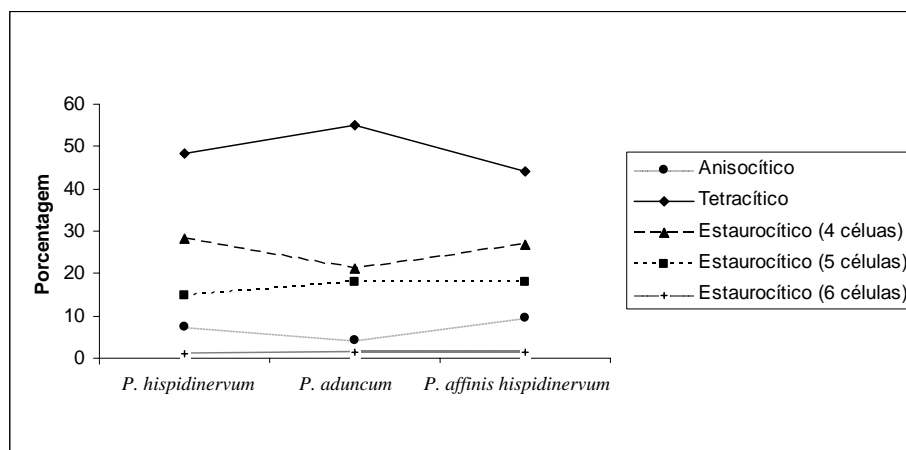


Figura 3 Porcentagem de tipos de estômatos encontrados na face abaxial da epiderme da folha de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*

P. aduncum, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* apresentam alguns complexos estomáticos típicos para a família. Todavia, a variação no número de células subsidiárias nos estômatos do tipo estaurocítico é relatada pela primeira vez para o gênero. Essa característica pode ser uma ferramenta importante para a taxonomia dessas espécies uma vez que *P. aduncum* apresenta uma porcentagem maior de estômatos tetracíticos e menor de estaurocíticos com quatro células subsidiárias quando comparada a *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. Nessas duas últimas espécies há grande semelhança nas porcentagens tanto para o tipo tetracítico quanto para o estaurocítico com quatro células subsidiárias. Os estômatos estaurocíticos com 6 células subsidiárias foram raros nas três espécies estudadas.

A densidade dos tricomas foi significativamente diferente entre as espécies na face adaxial enquanto na abaxial as espécies não diferiram (Tabelas 3 e 4). A densidade dos tricomas pode estar correlacionada com mecanismos de defesa das plantas. Uma alta densidade pode interferir na continuidade do filme

d'água sobre a superfície da planta, dificultando a germinação dos esporos, a multiplicação de bactérias, a ovoposição de insetos adultos, a nutrição e a mobilidade de larvas. Exsudados de tricomas glandulares podem matar microrganismos ou insetos por envenenamento, colando-o ou repelindo-o ou ainda, retardando o crescimento (SILVA et al., 2007). A atividade inseticida dos óleos essenciais das espécies de *Piper* tem sido comprovada para diversos patógenos que atingem as principais culturas brasileiras (ESTRELA et al., 2006; FAZOLIN et al., 2005; LIMA et al., 2009; SANTOS, et al., 2010; SILVA et al., 2007). Portanto, *P. aduncum* e *P. hispidinervum* apesar de não se diferenciarem de *P. affinis hispidinervum* quanto à densidade de tricomas na face abaxial, apresentam maior densidade de tricomas na face adaxial o que pode lhes conferir maior resistência a patógenos.

Tabela 3 Resumo das análises da variância para as medições das faces da epiderme, parênquima e para a densidade de tricomas da folha de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*

Fonte de Variação	Quadrados Médios						
	GL	EAD	EAB	PP	PL	DTEAD	DTEAB
Espécie	2	0,2365*	2,2764*	2,9459**	0,2796*	1,16601 ^{ns}	17,7729**
Resíduo	12	0,0478	0,3397	0,3794	0,0670	0,39731	0,6557

* significativo a 5% e ** 1% pelo teste F

(EAD) Espessura da face adaxial da epiderme; (EAB) Espessura da face adaxial epiderme; (PP) Espessura do Parênquima Paliçádico; (PL) Espessura do Parênquima Lacunoso; (DTEAD) Densidade de tricomas na face abaxial; (DTEAB) Densidade de tricomas na epiderme abaxial

Tabela 4 Valores médios das medidas, em μm , das faces abaxial, e adaxial da epiderme, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso e densidade, em número/ mm^2 , de tricomas nas faces abaxial e adaxial da folha de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*

Espécie	EAD	EAB	PP	PL	DTEAD	DTEAB
<i>P. aduncum</i>	10,14 b	11,26 b	83,91 ab	58,86 a	228,58 a	217,74a
<i>P. affinis hispidinervum</i>	13,34 a	14,29 a	71,32 b	37,66 b	212,63 a	129,48b
<i>P. hispidinervum</i>	12,10 ab	12,13 ab	95,90 a	47,29 ab	200,36 a	210,86a
Média geral	11,83	12,53	83,40	47,55	213,71	183,65

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo agrupamento pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

(EAD) Espessura da face adaxial da epiderme; (EAB) Espessura da face abaxial da epiderme; (PP) Espessura do Parênquima Paliçádico; (PL) Espessura do Parênquima Lacunoso; (DTEAD) Densidade de tricomas na face abaxial; (DTEAB) Densidade de tricomas na face abaxial

Tricomas glandulares e tectores foram observados na epiderme foliar das três espécies. Os tricomas tectores são de dois tipos: curto, pluricelular, de base alargada e de extremidade afilada (figura 4 b) ou longo, pluricelular, unisseriado, de extremidade também afilada (figura 4 c). Apenas um tipo de tricoma glandular ocorre, apresentando pedúnculo unicelular e célula secretora de formato ovóide inclinada sobre a epiderme (Figura 4 a).

Tricoma glandular na face adaxial de *P. aduncum* não é de ocorrência comum, enquanto que em *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* esses tricomas são encontrados com mais frequência. Os tricomas tectores curtos são observados em maior quantidade na face adaxial, enquanto que os tectores longos ocorrem preferencialmente na face abaxial, principalmente na região das nervuras. Nascimento e Vilhena-Potiguara (1999) também descreveram para *P. hispidinervum* tricomas tectores e glandulares na face adaxial. Na face abaxial, os tricomas tectores foram raros enquanto os secretores foram mais abundantes quando comparados com a epiderme adaxial. Tricomas tectores e secretores também foram relatados por Albiero (2005, 2006) ao estudar *P. hispidum* e *P. crassinervium* que observaram frequência e disposição dos tricomas semelhantes às descritas neste trabalho.

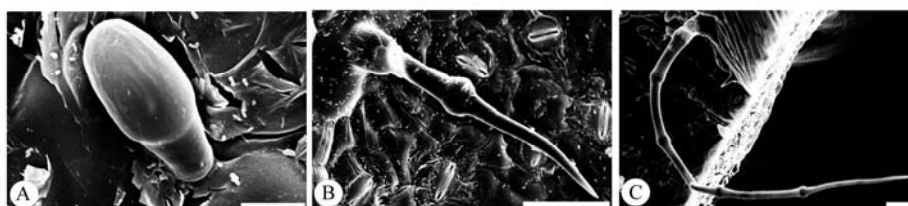


Figura 4 Tipos de tricomas encontrados nas folhas de *Piper aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. A- Tricoma glandular (Barra=10 μm). B – Tricoma tector curto (Barra= 10 μm). C – Tricoma tector longo (Barra= 50 μm)

Nos secções transversais de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* foi possível verificar a existência de epiderme uniestratificada constituída de células de formato variado, podendo ser cúbicas ou alongadas, em ambas as faces foliares e recoberta por cutícula fina (Figura 5).

A espessura da epiderme das faces adaxial e abaxial é significativamente diferente entre as três espécies analisadas (Tabela 3). *P. affinis hispidinervum* apresentou epiderme tanto da face adaxial quanto abaxial mais espessa enquanto em *P. aduncum* elas foram as menos espessas e em *P. hispidinervum* os valores foram intermediários não diferindo estatisticamente das outras duas (Tabela 4).

Uma hipoderme em ambas as faces foi observada, embora as células que constituem a face abaxial sejam menores e quase do mesmo tamanho das células epidérmicas e a camada se torne descontínua nas regiões onde estão presentes os estômatos. Trabalhos anteriores realizados para *P. aduncum* e *P. hispidinervum* (NASCIMENTO; VILHENA-POTIGUARA, 1999; VIANNA; AKISUE, 1997) relatam que apenas abaixo da epiderme adaxial foram observados estratos de células grandes e aclorofiladas que constituem uma hipoderme. Em *P. hispidum* também é relatada a presença, na face abaxial do limbo, de uma ou duas camadas subepidérmicas de natureza parenquimática, onde pode ocorrer, inclusive, idioblastos oleíferos. Essa subepiderme também ocorre na face adaxial, nas proximidades da região do bordo (ALBIERO et al., 2005b).

As características da epiderme nos cortes transversais se mostrou uma ferramenta útil na diferenciação das espécies dentro do gênero uma vez que a hipoderme adaxial de *P. aduncum* variou de uma a duas camadas e a hipoderme abaxial apenas uma camada (figura 5a) enquanto *P. hispidinervum* apresentou de duas a três camadas na hipoderme adaxial sendo a hipoderme abaxial constituída de apenas uma camada (figura 5c). Essas duas espécies diferem ainda de *P. affinis hispidinervum* a qual apresentou uma hipoderme adaxial constituída de

duas a três camadas e a hipoderme abaxial pode apresentar uma ou duas camadas de células (Figura 5b).

O mesofilo é heterogêneo assimétrico, caracterizando a folha como dorsiventral. Em *P. aduncum* o parênquima paliçádico constitui dois estratos celulares enquanto em *P. hispidinervum* de dois a três e em *P. affinis hispidinervum* três estratos. O parênquima lacunoso das três espécies apresenta cerca de três camadas celulares. A espessura dos parênquimas paliçádico e lacunoso foi significativamente diferente entre as espécies de *Piper* (Tabela 3). A maior espessura para o parênquima paliçádico foi verificada em *P. hispidinervum* enquanto a menor em *P. affinis hispidinervum*. *P. aduncum* apresenta um parênquima lacunoso mais espesso e *P. affinis hispidinervum* o de menor espessura (Tabela 4).

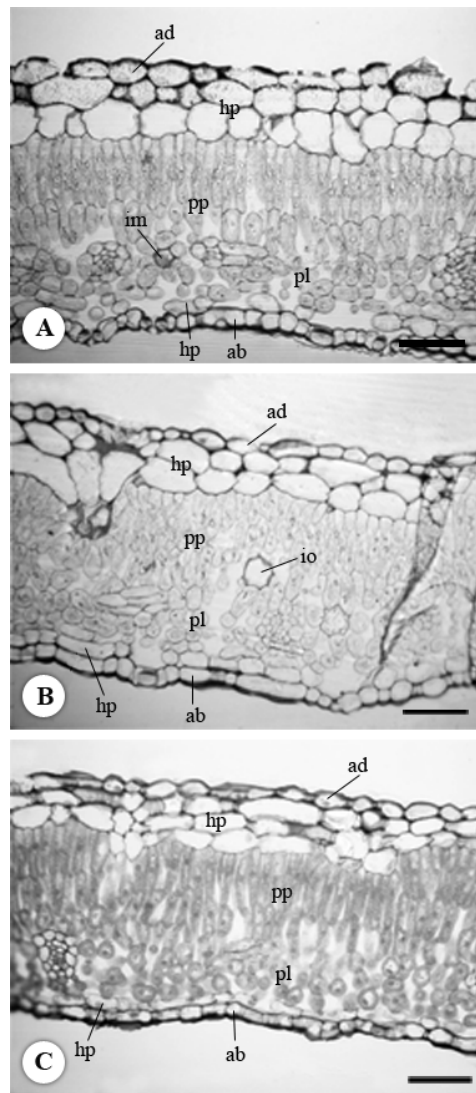


Figura 5 Secções transversais da folha de *Piper*. (A,B,C) Mesofilo de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*, respectivamente. (ab – epiderme abaxial, ad – epiderme adaxial, hp – hipoderme, pl – parênquima lacunoso, pp – parênquima paliçádico). Barra = 50 μ m

Idioblastos estão presentes por todo parênquima clorofiliano, inclusive junto à hipoderme das duas faces da folha (Figura 6). Estes idioblastos são estruturas secretoras que se caracterizam como células destacadas pela forma esférica e tamanho maior que as demais, sendo seu produto de secreção uma substância lipídica.

A nervura central na altura mediana da folha possui feixes vasculares colaterais abertos dispostos em forma de arco e envoltos por parênquima fundamental. O número de feixes varia nas três espécies, sendo três em *P. hispidinervum*, quatro em *P. aduncum* e quatro ou cinco em *P. affinis hispidinervum*. Abaixo da epiderme da face abaxial há uma faixa de colênquima na metade inferior da nervura, também estando presente na face adaxial. No parênquima fundamental que preenche toda a nervura central foram observados idioblastos cristalíferos contendo ráfides envoltas por conteúdo mucilaginoso e também idioblastos oleíferos situados abaixo das células do floema (figura 7).

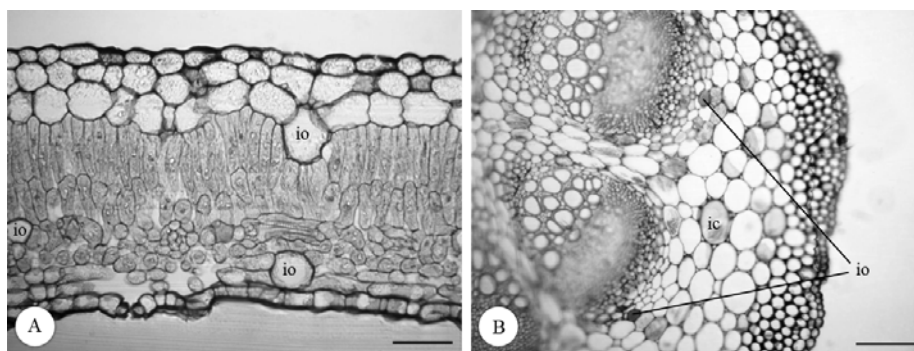


Figura 6 Secções transversais da folha de *Piper* sp. A – Mesofilo de *P. aduncum* evidenciando idioblastos oleíferos. B – Nervura central de *P. affinis hispidinervum* mostrando idioblastos oleíferos próximos ao floema e idioblastos cristalíferos junto ao parênquima fundamental. , ic – idioblasto cristalífero, io – idioblasto oleífero. Barra = 50µm

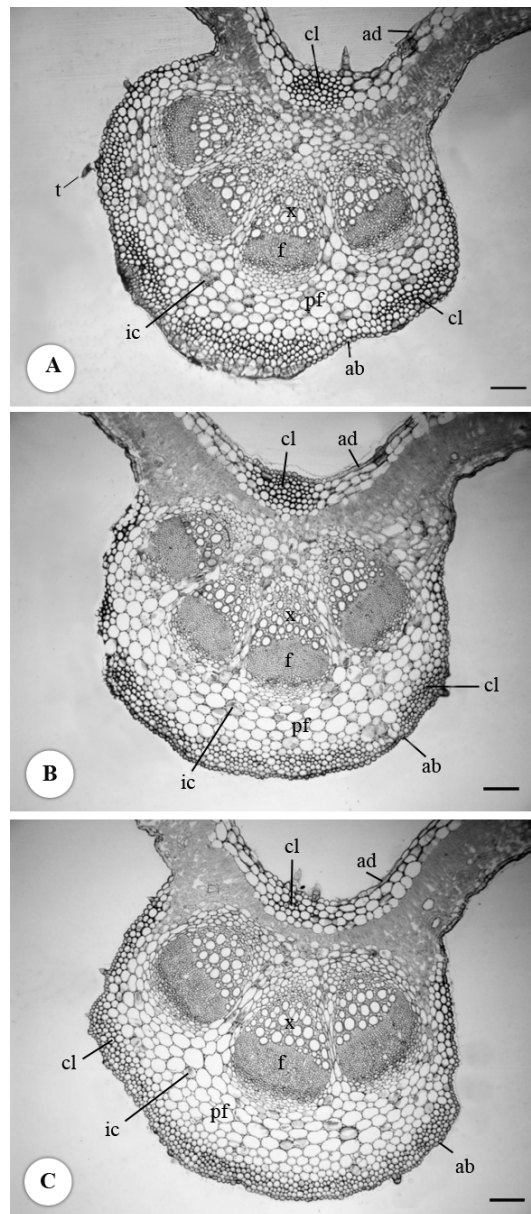


Figura 7 Secções transversais da folha de *Piper*. A-C – Região da nervura central de *P. aduncum*, *P.affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*, respectivamente. (ab – epiderme abaxial, ad – epiderme adaxial, cl – colênquima, f – floema, ic – idioblasto cristalífero, pf – parênquima fundamental, t – tricoma, x – xilema. Barra = 50 μ m)

Os resultados da análise histoquímica das folhas (Tabela 5) não revelou diferença entre as três espécies avaliadas. Nos testes para detecção de compostos lipídicos o resultado da reação foi a mesma para as três soluções utilizadas, sendo positivas na região do mesofilo, estando presente nos idioblastos e em forma de oleossomas. A reação com cloreto férrico foi negativa para compostos fenólicos, enquanto o azul de toluidina foi reativo em idioblastos oleíferos presentes na nervura central e no mesofilo. Isso pode ter ocorrido devido à natureza do composto fenólico que pode ser inespecífico para o cloreto férrico.

O PAS foi positivo detectando grânulos de amido em células do parênquima fundamental da nervura central e no mesofilo. Mucilagens foram observadas nos idioblastos cristalíferos da nervura central envolvendo as ráfides neles presentes e também em células mucilaginosas presentes no mesofilo. Os grãos de amido detectados na reação de PAS foram confirmados com a solução de lugol. Na reação com Xilidine Ponceau foi possível visualizar a região do parênquima paliádico fortemente corado em vermelho, o que leva a crer que esta região possui intensa atividade metabólica. Por fim, alcalóides não foram detectados.

Nascimento e Vilhena-Potiguara (1999) realizaram um teste histoquímico em folhas de *P. hispidinervum* e verificaram a presença de alcalóide nas células parenquimáticas da região cortical, amiloplastos na endoderme ao nível do floema do cilindro vascular e cristais de oxalato de cálcio nas células parenquimáticas, principalmente na região medular. Esses resultados são semelhantes ao encontrados no presente trabalho, exceto pela presença de alcalóides que não foi verificado em nenhuma das três espécies.

Tabela 5 Testes histoquímicos em folhas de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*

Composto	Teste	Resultado
Lipídios	Sudan Black B	+
	Sudan III	+
	Sulfato Azul do Nilo	+
Compostos fenólicos	Azul de toluidina	+
	Cloreto férrico	-
Polissacrídeos, Substâncias pécticas e mucilagens	PAS	+
Amido	Lugol	+
Proteínas	Xilidine Ponceau	+
Alcalóides	Reativo de Wagner	-

Canais de células de conteúdo mucilaginoso também foram descritos para *P. regnelli* (SILVA; MACHADO, 1999) entretanto em *P. hispidum* essas estruturas não foram encontradas (ALBIERO et al., 2006). Ainda nesta última espécie também foi possível observar, através de testes histoquímicos a presença marcante de substâncias de origem lipídica e cristais de oxalato de cálcio, bem como amido, compostos fenólicos e alcalóide. Essa característica parece ser comum em Piperaceae.

P. aduncum, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum* não diferiram quanto ao padrão de venação (Figura 8), apresentando venação penada, camptódroma, eucamptódroma, com nervuras até a quarta ordem. As nervuras secundárias que partem da nervura principal são ascendentes, ligeiramente curvas, alternadas e se posicionam nos terços mediano e inferior do limbo, sendo encontrados em número de cinco a sete pares nas três espécies.

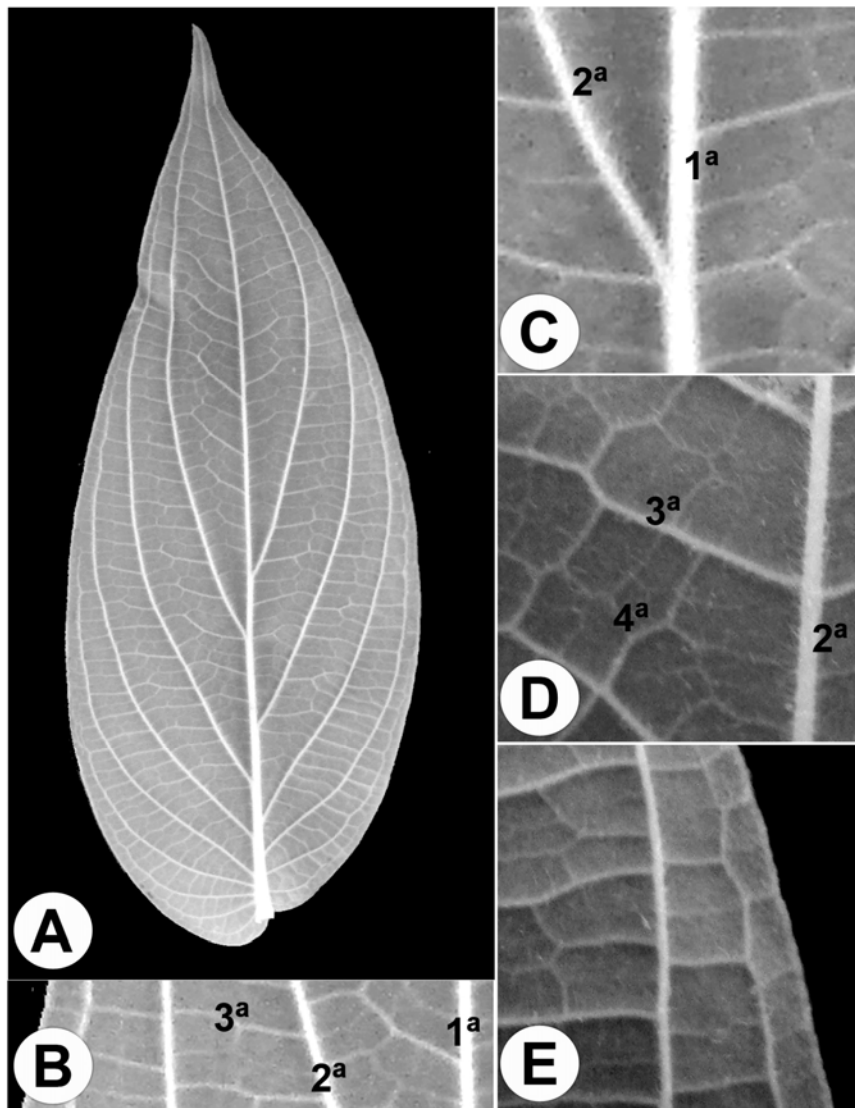


Figura 8 Padrão de venação de *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. A - Aspecto geral da vascularização da folha mostrando padrão da nervura principal e secundária. B – E - Detalhes das nervuras secundárias, terciárias e de quarta ordem

As nervuras são adaxialmente impressas e proeminentes abaxialmente, mais próximas entre si na porção basal, com ângulos de divergência variando entre 21 e 90° no último par basal, sendo classificados como agudos, moderados. As nervuras terciárias são do tipo perpendicular e subdivididas por veias quaternárias. Esses resultados corroboram a descrição feita para *P. hispidinervum* por Nascimento e Vilhena-Potiguara (1999) que a classificaram como camptódroma, eucamptódroma.

O padrão de venação também foi descrito para *P. hispidum* (ALBIERO et al., 2006) o qual foi camptódromo, broquidódromo apresentando 10 nervuras secundárias. A rede de nervuras terciárias foi do tipo perpendicular, subdividida por veias quaternárias e de quinta grandeza. Comparando o padrão de venação desta espécie com *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*, relatadas nesse trabalho, pode-se perceber que as características diferem apenas em alguns pontos, porém essas diferenças, aliadas as outras descritas nesse trabalho têm potencial como ferramenta taxonômica para o gênero *Piper*.

A partir dos caracteres quantitativos aqui analisados para as três espécies em estudos, foi montado um dendograma baseado em Distância Euclidiana (figura 9). É possível observar uma maior proximidade de *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum*. Esse resultado indica que *P. affinis hispidinervum* pode ser um híbrido entre *P. hispidinervum* e *P. aduncum*, uma das hipóteses levantadas por Wadt, Ehringhaus e Kageyama (2004), uma vez que é morfológicamente muito similar a *P. hispidinervum*, mas mais próxima de *P. aduncum* com relação a características anatômicas. Dados ainda não publicados revelam que, pelas características morfológicas, *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum* também foram mais relacionadas do que com *P. hispidinervum*.

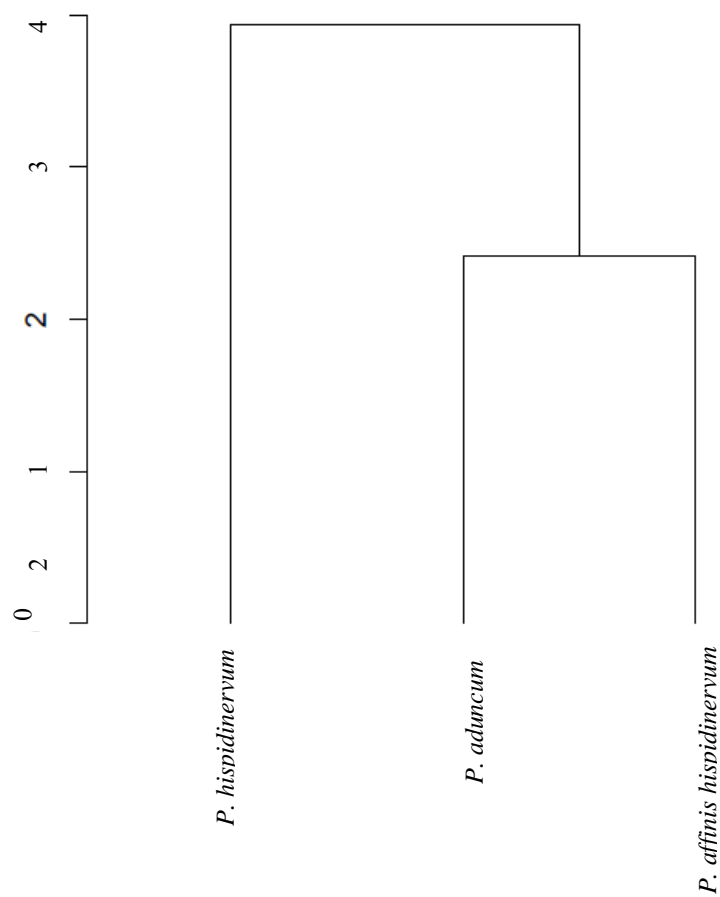


Figura 9 Dendrograma construído com as Distâncias Euclidianas obtidas com os valores médios das características diâmetro polar do estômato, diâmetro equatorial do estômato, densidade de células epidérmicas, densidade estomática, forma dos estômatos, densidade dos tricomas da face abaxial, densidade dos tricomas da face adaxial, espessura da epideme adaxial, espessura da epideme abaxial, espessura do parênquima paliçádico e espessura do parênquima lacunoso

4 CONCLUSÕES

As espécies *Piper hispidinervum*, *Piper affinis hispidinervum* e *Piper aduncum* podem ser diferenciadas por características anatômicas da folha, sendo as duas últimas mais próximas entre si e igualmente distantes da primeira.

As três espécies não diferem quanto ao tipo de composto químico presente nos tecidos foliares e tampouco quanto ao padrão de venação.

REFERÊNCIAS

ALBIERO A. L. M. et al. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervium* H.B.&K. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 19, n. 2, p. 305-312, jun. 2005a.

ALBIERO, A. L. M. et al. Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 24, n. 4, p. 550-554, jul. 2005b.

ALBIERO, A. L. M. et al. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 379-391, jul./set. 2006.

BIZZO, H. R. et al. Sarisan from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C. DC (Long pepper). **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 16, n. 2, p. 113-115, Feb. 2001.

CAIN, A. J. The use of Nile Blue in the examination of lipids. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 88, p. 111-116, 1947.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**: parte I: células e tecidos. 2. ed. São Paulo: Roca, 1986.

EHRINGHAUS, C. **Piper spp. (Piperaceae) Use in an indigenous Kaxinawá community in Acre, Brazil: Ethnobotany, ecology, phytochemistry and biological activity**. 1997. Thesis (M.S.) - Florida International University, Gainesville, 1997.

ESTRELA, J. L. V. et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 217-222, fev. 2006.

FAZOLIN, M. et al. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C.DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K.Shum sobre *Tenebrio molitor* L. 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 113-120, jan./fev. 2007.

FAZOLIN, M. et al. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 485-489, May/June 2005

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Columbus, v.55, n.1, p.123-142, 1968.

FONSÊCA, L. C. M.; PROENÇA, C. E. B.; GONÇALVES, E. G. Descrição do padrão de venação foliar em *Spathicarpa* Hook. (Araceae). **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 21, n. 1, p. 213-221, Mar. 2006.

FURR, M.; MAHLBERG, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 44, n. 2, p.153-159, Mar. 1981.

GOTTLIEB, O.R.M. et al. Óleos essenciais da Amazônia VII. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 11, n. 1, p. 143-148, 1981.

HICKEY, L.J. A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. In: METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon, 1979. p. 25-39.

HICKEY, L. J.; TAYLOR, D.W. The leaf architecture of *Ticodendron* and the application of foliar characters in discerning its relationships. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 78, n. 1, p. 105-130, 1991.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 423 p.

KHAN, S. V. et al. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 46, n. 2, p. 161-166, Mar. 2003.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1986. 297 p.

LIMA, R. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 2, p. 377-382, 2009.

MAIA, V. **Técnica histológica**. Atheneu: São Paulo, 1979. 298 p.

MEIDNER, H.; MANSFIELD, T. A. **Physiology of stomata**. New York: McGraw-Hill, 1968. 179 p.

NASCIMENTO, M. E.; VILHENA-POTIGUARA, C. R. Aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Piper hispidinervium* C. DC. (Piperaceae) e suas estruturas secretoras. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Série Botânica**, Belém, v. 15, p. 39-104, 1999.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne : Termarcarphy PTY, 1981.

PEARSE, A. G. E. 1980. **Histochemistry theoretical and applied**. 4th ed. London: Longman Group, 1980. v. 2.

PIMENTEL, F. A.; PEREIRA, J. B. M.; OLIVEIRA, M. N. de. **Zoneamento e caracterização de habitats naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) no Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 1998. 17 p. (Boletim de Pesquisa, 20).

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, 2008. Disponível em: < <http://www.R-project.org>>. Acesso em: 19 maio 2011.

SANTIAGO, E. J. A. et al. Aspectos da anatomia foliar da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1035-1042, 2001.

SANTOS, M. R. do A. dos et al. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 319-324, abr./jun. 2010.

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. (Boletim de Pesquisa, 23).

SILVA, E. M.; MACHADO, S. R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 117-124, ago. 1999.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Interrelações entre anatomia vegetal e produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 19, n. 1, p. 183-194, mar. 2005.

SILVA, W. C. et al. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 37, n. 2, p. 293-298, jun. 2007.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; OLIVEIRA, J. H. G. Comparative morphology and anatomy of the leaf and stem of *Peperomia dahlstedtii*, *Ottonia martiana* and *Piper diospyrifolium* (Piperaceae). **Gayana Botanica**, Concepcion, v. 61, n. 1, p. 6-17, 2004.

STRITTMATTER, C. G. D. Nueva técnica de diafanización. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, La Plata, v. 14, n. 1, p. 126-129, 1973.

TAKEMORI, N. K.; BONA, C.; ALQUINI, Y. Anatomia comparada das folhas de espécies de *Peperomia* (Piperaceae) - I. Ontogênese do tecido aquífero e dos estômatos. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 17, n. 3, p. 387-394, jul./set. 2003.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, n. 2, p. 399-436, Oct. 2009.

THEOBALD, W. L.; KRAHULIK, J. L.; ROLLINS, R. C. Trichome description and classification. In: METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford: Clarendon, 1979. p. 40-53.

VANNUCI, A. L.; REZENDE, M.H. **Anatomia vegetal**: noções básicas. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2003. 190 p.

VIANNA, W.O.; AKISUE, G. Caracterização morfológica de *Piper aduncum* L. **Lecta**: revista de farmácia e biologia da Universidade São Francisco, Bragança Paulista, v. 15, n. 1/2, p. 11-62, jan./dez. 1997.

WADT, L. H. O.; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of "Pimenta Longa" genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 74-82, 2004.

WILKINSON, H.P. The plant surface. In: METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons**. New York, Oxford University, 1979. v. 1. p. 97-165.