

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica

**ORGANOGENESE, EMBRIOGENESE SOMÁTICA E USO DE ÓLEO
MINERAL COMO ESTRATÉGIAS DE PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in*
vitro DE *Piper aduncum* L. E *Piper hispidinervum* C. DC.**

PAULO CESAR ALVES DE SOUSA

Brasília – DF

Agosto/2013

**ORGANOGENESE, EMBRIOGENESE SOMÁTICA E USO DE ÓLEO
MINERAL COMO ESTRATÉGIAS DE PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in*
vitro DE *Piper aduncum* L. E *Piper hispidinervum* C. DC.**

Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Aluno: Paulo Cesar Alves de Sousa

Orientador: Jonny Everson Scherwinski-Pereira

Brasília – DF

Agosto/2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1011028.

Sousa, Paulo Cesar Alves de.
S725o Organogênese, embriogênese somática e uso de óleo mineral como estratégias de propagação e conservação in vitro de *Piper aduncum* L. e *Piper hispidinervum* C. DC / Paulo Cesar Alves de Sousa. -- 2013.
xviii, 75 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2013.
Inclui bibliografia.
Orientação: Jonny Everson Scherwinski-Pereira.

1. Botânica - Embriologia. 2. Anatomia vegetal.
3. Morfogênese. I. Scherwinski-Pereira, Jonny Everson.
II. Título.

CDU 631.52

**ORGANOGENESE, EMBRIOGENESE SOMÁTICA E USO DE ÓLEO
MINERAL COMO ESTRATÉGIAS DE PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in*
vitro DE *Piper aduncum* L. E *Piper hispidinervum* C. DC.**

Paulo Cesar Alves de Sousa

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Botânica.

Banca Examinadora:

Jonny Everson Scherwinski-Pereira
Doutor em Agronomia
Presidente da banca

João Batista Teixeira
Doutor em Biologia Vegetal
Membro titular

Maria Elvira de Rezende
Doutora em Produção Vegetal
Membro titular

Gabriela Ferreira Nogueira
Doutora em Fisiologia Vegetal
Membro suplente

A todos que buscam sentido para vida, com uma perspectiva mais ampla do que os poucos anos que temos para nascer, crescer e trabalhar antes de deixar este mundo. A todos os que acreditam que o espírito é eterno, que as nossas vidas neste mundo não se resumem senão a um estágio de aprendizado rumo à perfeição. A todos os que se esforçam para melhorar um pouco a cada dia, mesmo que muitas vezes falhando sob o peso das próprias imperfeições. A aqueles que, mesmo sem conseguir fazer muita coisa, acendem no seu íntimo a certeza de que a vida, como um todo, faz sentido, e que todos nós fazemos parte dela.

Aos meus parentes

Aos meus amigos

Aos meus mestres

E principalmente à minha família:

Mãe

Pai

Irmãos

Que tanto me amam!

Dedico

“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam”.

(I Coríntios 2:9)

Agradecimentos

Sinceros agradecimentos a todos que estiveram presentes na minha vida e/ou colaboram de alguma forma (gestos, ações ou palavras) para a realização e concretização deste trabalho:

Tereza Alves da Rocha, mãe, heroína, pelo amor doado durante sua vida dedicada inteiramente aos filhos. **Oscar Alves de Sousa**, pai, pelo exemplo de trabalhador, pela moradia que me abriga e pelo pão que alimenta a mim e meus irmãos. **Mauro Alves de Sousa**, pelo exemplo de trabalhador e dedicação à família. **José Nilson Rocha**, pelo amor dedicado a mim e pelo exemplo de luta pela família. **Nelson Alves Rocha**, pela amizade e pela perseverança de dias melhores. **Nilda Alves de Sousa**, pelo imenso amor dedicado a mim e pelo exemplo de amor aos filhos e todos da família. **Lêda Maria Alves de Sousa**, pela grande amor, amizade e apoio dedicado a mim, a todos os irmãos e filhos. **Luciene Pais**, pelo apoio em todos os momentos. **Thyago Sousa, Igor Ximenes, Lorena Carvalho, Thaynara Sousa, Yasmin Ximenes, Mayara Rocha, Myrela Rocha, Yane Ximenes, Fernando Rocha, Maria Fernanda, Cauã Gabriel, João Pedro, Maryele**; por trazer alegria e perspectiva de futuro melhor ao meu lar.

Juliana Alves, Magda Rodrigues, Gustavo Henrique, Pablo Leite, James Barbosa, Carlos Eduardo Correia, Mara Liliane, Myrian, Valéria Oliveira, Francisco carvalho, Patrik Alves; pelos anos de amizade, compreensão e apoio durante as horas difíceis.

Milton Paz Lima, Zanderluce Gomes, Giovanna Caramaschi, Luciana de Paiva, Juliano Carregaro, mestres, pelos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo de profissionalismo, que tanto me influenciaram na escolha da minha carreira.

Dr. Jonny Everson Scherwinski-Pereira, pela confiança, pela orientação e por todas as contribuições na minha vida profissional.

Stênio Sterferson Silva e Souza, Patrícia Monah, Hugo Teixeira Gomes, Gabriela Nogueira, pelo apoio e colaboração direta nos trabalhos desenvolvidos.

Carlos Vinícius, Elínea Oliveira, Leandro Gomes, Luanna Pena, Ludmilla Natasha, Rosana, André Xavier, Tatiane Monteiro, Rayssa Archeti, Nero Carlos, Felipe Satler, Emilia Saleh e Jaqueline Vasconcelos pelo apoio e convívio diário no Laboratório de Cultura de Tecidos II.

Funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que, de uma forma ou de outra, colaboraram com a infraestrutura necessária. **Capex**, pela concessão da bolsa. **Universidade de Brasília**, por tanto conhecimento adquirido. **Departamento de Botânica da UnB**, pelo apoio.

A aqueles que não foram citados, mas que contribuíram com sorriso, palavras de apoio ou críticas, ajudando imensamente nesta conquista.

**ORGANOGÊNESE, EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E USO DE ÓLEO
MINERAL COMO ESTRATÉGIAS DE PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO *in vitro*
DE *Piper aduncum* L. E *Piper hispidinervum* C. DC.**

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver a organogênese e embriogênese somática e avaliar o uso do óleo mineral na propagação e conservação *in vitro* de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum*, bem como avaliar a estabilidade genômica dos acessos regenerados. Plantas germinadas *in vitro* foram utilizadas como material vegetal. Inicialmente, as sementes passaram por processo de desinfestação, antes da inoculação em meio de crescimento. Para os testes de germinação foram utilizados os meios de cultura de MS e WPM, com incubação nas temperaturas de 25 °C e 30 °C, nas condições de luz e escuro. Foi avaliada a taxa de germinação (%), o tempo médio de germinação e a velocidade de germinação. Os resultados sobre a germinação das sementes cultivadas em meio de cultura de MS e WPM a 25 °C foram: taxa de Germinação = 84% e 81% (*P. aduncum* MS/WPM), 100% e 100% (*P. hispidinervum* MS/WPM); tempos médios de germinação = 253,429 e 240,593 horas (*P. aduncum* MS/WPM), 202,320 e 190,320 horas (*P. hispidinervum* MS/WPM); velocidades médias de germinação = 3,94 h⁻¹ e 4,14 h⁻¹ (*P. aduncum* MS/WPM); 4,94 h⁻¹ e 5,25 h⁻¹ (*P. hispidinervum* MS/WPM). As médias de germinação ficaram com valores próximos em ambos os meios de cultura testados. A germinação das sementes cultivadas em meio WPM a 25 °C e 30 °C foram: taxa de Germinação = 81% e 74% (*P. aduncum* 25 °C / 30 °C), 100% e 96% (*P. hispidinervum* 25 °C / 30 °C), tempo médio de germinação = 240,593 e 333,081 horas (*P. aduncum* 25 °C / 30 °C); 190,320 e 215,250 horas (*P. hispidinervum* 25 °C / 30 °C), velocidades médias de germinação = 4,14 h⁻¹ e 3,00 h⁻¹ (*P. aduncum* 25 °C / 30 °C); 5,25 h⁻¹ e 4,64 h⁻¹ (*P. hispidinervum* 25 °C / 30 °C). A temperatura de 25 °C proporcionou maior *percentagem* de germinação dentro do menor espaço de tempo para ambas as espécies. Nos testes de micropropagação foi avaliado o cultivo de microestacas em meios de cultura com diferentes concentrações de sais de MS e WPM (50, 70 e 100%), e em outra etapa, o cultivo em meio de MS adicionado de diferentes concentrações dos reguladores BAP (6-benzilaminopurina) e KIN (Cinetina) (0,00; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹). Na primeira etapa os dados apresentaram diferenças significativas no que diz respeito ao número de formação de gemas e à altura em ambas as espécies. *P. aduncum* apresentou melhores resultados, tanto no número de gemas quanto na altura, quando cultivada em meio com concentrações de 50% e 75% de sais de MS e em 75% e 100% de sais de WPM, enquanto *P. hispidinervum* apresentou melhor desempenho quando cultivada em meio de WPM nas concentrações de 75% e 100%. Com relação ao meio de cultura adicionado dos reguladores de crescimento, *P. aduncum* apresentou melhores resultados nos tratamentos com 0,50 mg.L⁻¹ de KIN e 0,05 mg.L⁻¹ de BAP, com maior número de brotos; para *P. hispidinervum* as concentrações dos reguladores foram significativas apenas quando se

utilizou o BAP, com melhores resultados obtidos na concentração de 1,0 mg.L⁻¹. Para se determinar um protocolo visando a embriogênese somática a partir de explantes foliares de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* foram realizados testes combinando diferentes concentrações de ANA (ácido α -naftalenoacético) e BAP adicionados ao meio de MS, formando 5 tratamentos: T1 (5 mg.L⁻¹ de ANA + 0 mg.L⁻¹ de BAP), T2 (10 mg.L⁻¹ de ANA + 0 mg.L⁻¹ de BAP,) T3 (0 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP), T4 (5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP) e T5 (10 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5mg.L⁻¹ de BAP). Aos 60 dias de cultivo, no escuro, o tratamento T4 proporcionou os melhores resultados para a indução de calos primários em *P. aduncum* com 80% de formação de calos. A transferência dos calos primários para o meio T5 (10 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5mg.L⁻¹ de BAP) ocasionou a formação de calos embriogênicos e surgimento de embriões somáticos. De maneira geral, a regeneração dos embriões somáticos teve início 15 dias após a transferência para meio de crescimento de MS, sob condições de luz. As plantas regeneradas a partir dos embriões de *P. aduncum* apresentaram crescimento mais lento, portanto, apenas as plantas regeneradas a partir dos embriões de *P. hispidinervum* foram pré-aclimatizadas e levadas para casa de vegetação. A citometria de fluxo foi utilizada verificar a estabilidade genômica das plantas de *P. hispidinervum* regeneradas, no que diz respeito à quantidade de DNA. Os resultados revelaram que o conteúdo médio estimado de DNA de *P. hispidinervum* provenientes de plantas da embriogênese somática e da casa de vegetação foi de $1,8329 \pm 0,02$ pg e $1,8666 \pm 0,05$ pg, respectivamente, não havendo existência de instabilidade genômica nas plantas avaliadas. Para a conservação de germoplasma *in vitro* foi testada a estratégia de conservação por de imersão em óleo mineral (OM). Microestacas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* foram inoculadas em tubos de ensaio e cobertas completamente com óleo mineral, sendo cultivadas durante 30 e 180 dias. Aos 30 dias de cultivo, as estacas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* submersas em óleo mineral (OM) apresentaram taxa de 100% e 80% de sobrevivência, respectivamente. As estacas vivas foram transferidas para meio de crescimento e após 120 dias de cultivo apenas as estacas de *P. aduncum* apresentaram sobrevivência (30 %). Na etapa de 180 dias de cultivo, apenas as estacas de *P. aduncum* sobreviveram, obtendo taxa sobrevivência 40%.

Palavras-chave: *Piper spp.*, cultivo *in vitro*, calogênese, anatomia vegetal, citometria de fluxo, conservação *in vitro*.

ORGANOGENESIS, SOMATIC EMBRYOGENESIS AND USE OF MINERAL OIL AS *in vitro* PROPAGATION AND CONSERVATION STRATEGIES OF *Piper aduncum* L. AND *Piper hispidinervum* C. DC.

ABSTRACT

This study aimed to develop the organogenesis, somatic embryogenesis and mineral oil as *in vitro* propagation and conservation strategies of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* as well as assess the genomic stability of regenerated plants. Germinated seeds passed through the process of disinfecting before inoculation into the growth medium. In order for germination tests were used MS and WPM growing medium, with incubation at 25 °C and 30 °C, under the conditions of light and dark. It was evaluated the rate of germination (%), the germination mean time and the speed of germination. The measures of seed germination grown on MS and WPM medium at 25 °C were: rate of germination= 84% and 81% (*P. aduncum* MS/WPM), 100% and 100% (*P. hispidinervum* MS/WPM); germination mean time= 253,429 and 240,593 hours (*P. aduncum* MS/WPM), 202,320 and 190,320 hours (*P. hispidinervum* MS/WPM); speed of germination= 3,94 h⁻¹ and 4,14 h⁻¹ (*P. aduncum* MS/WPM); 4,94 h⁻¹ and 5,25 h⁻¹ (*P. hispidinervum* MS/WPM). The measures germination have demonstrated similar values in both growing medium. The measures of seed germination grown on WPM medium at 25 °C and 30 °C were: rate of germination= 81% and 74% (*P. aduncum* 25 °C / 30 °C), 100% and 96% (*P. hispidinervum* 25 °C / 30 °C); germination mean time= 240,593 and 333,081 hours (*P. aduncum* 25 °C / 30 °C); 190,320 and 215,250 hours (*P. hispidinervum* 25 °C / 30 °C); speed of germination= 4,14 h⁻¹ and 3,00 h⁻¹ (*P. aduncum* 25 °C / 30 °C); 5,25 h⁻¹ and 4,64 h⁻¹ (*P. hispidinervum* 25 °C / 30 °C). The temperature 25 °C had proportioned higher percentage of germination into the shortest time in both species. In the micropropagation tests were evaluated microshoots growing in MS and WPM medium with different concentrations of salts (50, 70 and 100%), and in another step, the culture in MS medium supplemented with different concentrations of BAP (6-benzylaminopurine) and kinetin regulators. (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 mgL⁻¹). In the first step the results showed significant differences regarding the number of bud formation and height in both species. *P. aduncum* achieved better results, as numbers of buds as height when grown in medium with 50%, 75%, 100% MS and 50%, 75% and 100% WPM salts concentrations, on the other hand, *P. hispidinervum* showed the best performance when cultivated in 75% and 100% WPM medium concentrations. Regarding to the culture medium supplemented with regulators, *P. aduncum* achieved better results in the treatments with 0.50 mgL⁻¹ kinetin and 0.05 mgL⁻¹ BAP which resulted in larger number of shoots, for *P. hispidinervum* concentrations of regulators were significant only with the use of BAP, and the best results obtained in the concentration of 1.0 mg.L⁻¹. In order to determine a protocol aiming the formation of callus from leaf explants of *P. hispidinervum* and *P. aduncum* tests were conducted by combining different concentrations of NAA (α -naphthaleneacetic acid) and BAP added

to MS medium, forming 5 treatments: T1 (5 mg.L⁻¹ NAA + 0 mg.L⁻¹ BAP), T2 (10 mg.L⁻¹ NAA + 0 mg.L⁻¹ BAP) T3 (0 mg.L⁻¹ + NAA 2.5 mg.L⁻¹ BAP), T4 (5 mg.L⁻¹ + NAA 2.5 mg.L⁻¹ BAP) and T5 (10 mg.L⁻¹ NAA + 2.5 mg.L⁻¹ BAP). Treatment T4 showed the best result in the primary callus induction after 60 days of culture in the dark (*P. aduncum* with 80% and *P. hispidinervum* 32% of primary callus formation). The transfer of calluses primary for the treatment T5 (10 mg.L⁻¹ de NAA + 2.5 mg.L⁻¹ de BAP) resulted in the formation of embryogenic callus and somatic embryo emergence. The regeneration of the embryos began 15 days after transfer to growth medium with salts and nutrients of MS and cultivation under light conditions. Plants regenerated from the embryos of *P. aduncum* grew slower, so only the plants regenerated from the embryos of *P. hispidinervum* were pre-acclimatized and taken to a greenhouse. The flow cytometry was used to verify the stability of the genome of *P. hispidinervum* plants regenerated with regard to the amount of DNA. The results showed that the estimated DNA contents of *P. hispidinervum* from somatic embryogenesis and greenhouse (1.8329 ± 1.8666 ± 0.02 pg and 0.05 pg) with a coefficient of variation below 5% leads to the conclusion about the absence of genomic instability in plants obtained by somatic embryogenesis. For Germplasm *in vitro* conservation was tested conservation strategy by immersion in mineral oil (MO). Microshoots from *P. aduncum* and *P. hispidinervum* were inoculated into sampling tubes and completely covered with mineral oil and cultured for 30 and 180 days. After 30 days of culture, the stakes of *P. aduncum* and *P. hispidinervum* submerged in mineral oil (MO) had a survival rate of 100% and 80% respectively. The live cuttings were transferred to growth medium and after 120 days of cultivation only cuttings of *P. aduncum* showed a survival rate (30%). In the stage 180 days of cultivation, cuttings *P. aduncum* and *P. hispidinervum* submerged in mineral oil (MO) had survival rates of 40% and 0% respectively.

Key words: *Piper ssp.*, *in vitro* culture, plant anatomy, flow cytometry, *in vitro* conservation.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Tratamentos utilizados para a indução de calos em segmentos foliares de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	25
Tabela 2. Relação de altura e número de nós em diferentes concentrações salinas de meios de MS e WPM em um subcultivo de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	33
Tabela 3. Cultivo de microestacas de <i>P. aduncum</i> em diferentes concentrações de BAP e Cinetina.....	36
Tabela 4. Cultivo de microestacas de <i>P. hispidinervum</i> em diferentes concentrações de BAP e Cinetina.....	36
Tabela 5. Formação de calos, em relação ao tempo e aos tratamentos utilizados para indução de calos em <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	38
Tabela 6. Conteúdo médio de DNA relativo (pg) entre plantas <i>in vitro</i> derivadas da embriogênese somática e plantas cultivadas em casa de vegetação de <i>Piper hispidinervum</i>	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aspecto da planta adulta de <i>P. aduncum</i> mantida sob condições de campo.....	6
Figura 2: Aspecto da planta adulta de <i>P. hispidinervum</i> sob condições de campo.....	7
Figura 3: Microestacas de <i>P. aduncum</i> inoculadas em meio de MS.....	22
Figura 4: Explantes foliares de <i>P. hispidinervum</i> inoculadas em meio de cultura de MS adicionado de reguladores.....	24
Figura 5: Aspecto da germinação das sementes de <i>Piper</i> a partir do processo de emissão da radícula.....	29
Figura 6: Germinação de sementes de <i>P. hispidinervum</i> e <i>P. aduncum</i> sob dois meios de cultura (MS e WPM).....	30
Figura 7: Germinação de sementes de <i>P. hispidinervum</i> e <i>P. aduncum</i> sob duas condições de temperatura e meio de cultura WPM.....	31
Figura 8. Figura 8. Desenvolvimento de microestacas de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i> em diferentes concentrações de citocininas e processo de alongamento dos brotos de <i>P. aduncum</i> provenientes do tratamento com 0,50 mg.L ⁻¹ de Cinetina. A. broto de <i>P. aduncum</i> classificação C3 (superior a 3 cm), B. broto de <i>P. aduncum</i> classificação C2 (acima de 1,5 até 3 cm), C. broto de <i>P. hispidinervum</i> classificação C1 (até 1,5 cm), D. multibrotações em <i>P. aduncum</i> em tratamento com 0,5 mg.L ⁻¹ de Cinetina, E. aspecto de calo desenvolvido nas estacas de <i>P. hispidinervum</i> nos tratamentos com 0,5 mg.L ⁻¹ de BAP, F. aspecto de calo desenvolvido nas microestacas de <i>P. hispidinervum</i> nos tratamentos com Cinetina, G. brotos de <i>P. aduncum</i> em processo de alongamento, H. plantas de <i>P. aduncum</i> em processo de transferência para aclimatização, I. plantas de <i>P. aduncum</i> em processo de aclimatização.....	37
Figura 9. Aspecto dos calos desenvolvidos após 60 dias de cultivo no tratamento T4 (5 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L ⁻¹ de BAP). A. explante de <i>P. aduncum</i> (Barra 2 mm), B. <i>P. hispidinervum</i>	39
Figura 10. . Aspecto dos embriões somáticos diferenciados sobre calos embriogênicos, após 45 dias da transferência do tratamento T4 (5 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L ⁻¹ de BAP) para o T5 (10 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5mg.L ⁻¹ de BAP). A. <i>P. aduncum</i> ; B. <i>P. hispidinervum</i> , Setas brancas: embriões somáticos, Estrelas: regiões de calos embriogênicos.....	40

Figura 11. Formação dos calos primários após 45 dias em meio de cultura contendo 5 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L ⁻¹ de BAP. A. <i>P. aduncum</i> , B. <i>P. hispidinervum</i>	41
Figura 12. Aspecto da formação de calos embriogênicos em meio de cultura suplementado com 10 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5mg.L ⁻¹ de BAP. A. <i>P. aduncum</i> , B. <i>P. hispidinervum</i>	41
Figura 13. Detalhes de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento, A. <i>P. aduncum</i> , B. <i>P. hispidinervum</i> . Seta indicando formação de tricomas na base do embrião.....	42
Figura 14. Corte transversal de folhas em regiões de intersecção de calos primários. A. <i>P. hispidinervum</i> , B. <i>P. aduncum</i> . AD= face adaxial, AB= face abaxial, ME= Mesofilo, CP= calo primário, Seta indicando estômatos.....	44
Figura 15. Corte histológico de calos primários, A. calos primários originados em folhas de <i>P. aduncum</i> , B. <i>P. hispidinervum</i> . Setas indicando bordos dos calos.....	44
Figura 16. Corte histológico de calos embriogênicos, A. calos primários originados em folhas de <i>P. aduncum</i> , B. <i>P. hispidinervum</i> . Setas indicando processo de linearização de células.....	45
Figura 17. Corte histológico de embriões somáticos em estágio cotiledonar, A. <i>P. aduncum</i> , B. <i>P. hispidinervum</i> . PD= protoderme, MF= meristema fundamental, PC= procâmbio, AR= ápice radicular.....	46
Figura 18. Estádios de regeneração dos embriões de <i>P. aduncum</i> , A. embrião somático recém-inoculado, B. início da regeneração com surgimento do ápice radicular e início do desenvolvimento da parte aérea, C. desenvolvimento da parte aérea e surgimento da zone pilífera após 15 dias de cultivo D. planta completa apresentando raiz e parte aérea bem desenvolvidas. Seta indicando área de formação de calo.....	47
Figura 19. Estádios da regeneração dos embriões somáticos de <i>P. hispidinervum</i> , A. embrião somático recém-inoculado, B. início da regeneração com surgimento do ápice radicular e início do desenvolvimento da parte aérea, C. desenvolvimento da parte aérea e surgimento da zone pilífera após 15 dias de cultivo D. planta completa apresentando raiz e parte aérea bem desenvolvidas.....	48
Figura 20. Plantas regeneradas de <i>P. hispidinervum</i> obtidas por embriogênese somática em fase de aclimatização em BOD.....	49
Figura 21. Plantas de <i>P. hispidinervum</i> obtidas por embriogênese somática em condições de casa de vegetação.....	49

Figura 22. Histogramas relativos à análise por citometria de fluxo da quantidade de DNA em <i>P.r hispidinervum</i> obtidos usando o tampão Marie. O primeiro pico corresponde a <i>Piper</i> e o segundo pico corresponde ao padrão de referência ervilha, A. plantas regeneradas via embriogênese somática, B. plantas cultivadas em casa-de-vegetação.....	50
Figura 23: Taxa de sobrevivência (%) de estacas de <i>P.r hispidinervum</i> e <i>P. aduncum</i> em ensaio de conservação em óleo mineral (OM), água e em tratamento controle (MS), 30 dias após a inoculação.....	53
Figura 24. Aspecto das microestacas de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i> após 30 dias de cultivo. A. explantes conservados por meio de imersão em óleo mineral (OM), B. explantes conservados em água considerados vivos, C. explantes conservados em água considerados mortos, D. testemunhas vivas em processo de desenvolvimento. Seta branca: <i>P. hispidinervum</i>	53
Figura 25. Plantas de <i>P. aduncum</i> regeneradas provenientes do tratamento de conservação em OM. A. testemunha, B. plantas regeneradas, C. planta regenerada do tratamento de conservação em óleo mineral (OM) em condições de aclimatização.....	54
Figura 26: Taxa de sobrevivência (%) de microestacas de <i>P. hispidinervum</i> e <i>P. aduncum</i> em ensaio de conservação em óleo mineral (OM), água e em tratamento controle (MS), 180 dias após a inoculação.....	55
Figura 27. Aspecto das microestacas sobreviventes após 180 dias de cultivo. A. explantes de <i>Piper aduncum</i> em óleo mineral (OM), B. Testemunhas de <i>P. aduncum</i> , C. explante de <i>P. hispidinervum</i> conservado em água.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

μM – micromolar

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2iP: 2- isopentenil-adenina

AB: Face abaxial

AD: Face adaxial

ABA: Ácido abscísico

AIA: Ácido indolilacético

AIB: Ácido indol-3-butírico

ANA: α -Ácido –naftalenoacético

AR: Ápice radicular

BAP: 6-Benzilaminopurina

CIN: N⁶-furfurilaminopurina (cinetina)

CP: Calo primário

CV: Coeficiente de variação

ME: Mesofilo

MF: Meristema fundamental

MS: Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog

OM: Óleo Mineral

PC: Procâmbio

PD: Protoderme

PICLORAM: Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico

TDZ: Thidiazuron (N-fenil-N'-1,2,3-thiadiazol-5-feniluréia)

WPM: Woody Plant Medium

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Família Peperaceae.....	4
2.2. <i>Piper aduncum</i> L.	4
2.3. <i>Piper hispidinervum</i> C. DC.....	7
2.4. Conservação de Germoplasma <i>in vitro</i>	9
2.5. Regeneração e Multiplicação.....	11
2.5.1. Micropropagação.....	12
2.5.2. Embriogênese Somática.....	13
2.5.3. Variação Somaclonal e Variação Genética.....	14
2.6. Citometria de Fluxo.....	16
2.7. Estudos Anatômicos.....	16
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Local de realização dos experimentos.....	19
4.2. Material vegetal.....	19
4.3. Experimento I – Estudos de germinação de sementes de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	20
4.3.1. Etapa I – Efeito de meios de cultura e condições de cultivo na germinação de sementes de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	20
4.3.2. Etapa II – Efeito da temperatura na germinação <i>in vitro</i> de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	21
4.4. Experimento II – Efeito das concentrações de sais dos meios de cultura MS e WPM na micropropagação de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	21
4.5. Experimento III – Efeito de concentrações de BAP e Cinetina na indução de multibrotação em microestacas de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	23
4.6. Experimento IV – Calogênese e embriogênese somática em <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	23
4.6.1. Etapa I – Indução de calos primários em <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	24
4.6.2. Etapa II – Indução de calos embriogênicos e embriões somáticos em <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	25
4.6.3. Etapa III – Caracterização morfológica e diferenciação dos calos de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	25
4.6.4. Etapa IV – Estudos anatômicos da calogênese e da embriogênese somática em <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	26
4.6.5. Etapa V – Regeneração dos embriões somáticos de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	26
4.6.6. Etapa VI – Aclimatização das plantas regeneradas de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	27

4.6.7. Etapa VII – Análise da fidelidade genômica por citometria de fluxo em plantas regeneradas de <i>P. hispidinervum</i>	27
4.7. Experimento VI – Conservação <i>in vitro</i> de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i> por imersão em óleo mineral (OM).....	28
4.8. Análises estatísticas.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1. Experimento I – Estudo de germinação de sementes de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	29
5.1.1. Etapa I – Efeito de meios de cultura e condições de cultivo na germinação de sementes de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	29
5.1.2. Etapa II – Efeito da temperatura na germinação <i>in vitro</i> de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	31
5.2. Experimento II – Efeito das concentrações de sais dos meios de cultura MS e WPM na micropropagação de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	32
5.3. Experimento III – Efeito de concentrações de BAP e Cinetina na indução de multibrotação em microestacas de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	34
5.4. Experimento IV – Calogênese e embriogênese somática em <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	38
5.4.1. Etapa I – Indução de calos primários em <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	38
5.4.2. Etapa II – Indução de calos embriogênicos e embriões somáticos em <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	40
5.4.3. Etapa III – Caracterização morfológica e diferenciação dos calos de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	41
5.4.4. Etapa IV – Estudos anatômicos da calogênese e da embriogênese somática em <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	43
5.4.4.1. Explante foliar e calo primário.....	43
5.4.4.2. Calos embriogênicos.....	45
5.4.4.4. Embriões somáticos.....	45
5.4.5. Etapa V – Regeneração dos embriões somáticos de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i>	46
5.4.6. Etapa VI – Aclimatização das plantas regeneradas de <i>Piper hispidinervum</i>	48
5.5. Análise da fidelidade genômica por citometria de fluxo em plantas regeneradas de <i>P. hispidinervum</i>	50
5.6. Experimento VI – Conservação <i>in vitro</i> de <i>P. aduncum</i> e <i>P. hispidinervum</i> por imersão em óleo mineral (OM).....	52
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal país dentre os que possuem uma vasta biodiversidade, detendo em seu território entre 15% e 20% do número total de espécies do planeta, bem como alguns dos ecossistemas mais ricos em número de espécies vegetais: a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado. A Floresta Amazônica brasileira, com mais de 30 mil espécies vegetais, compreende cerca de 26% das florestas tropicais remanescentes no planeta. Grande número de espécies é usado pelo ser humano como fonte de alimento, como matéria-prima para construção, fabricação de medicamentos para cura de enfermidades ou uso como aromatizantes (MMA, 2013).

Na região Amazônica, espécies utilizadas pela população humana sofrem uma forte pressão, devido ao extrativismo indiscriminado, sem a devida preocupação com a conservação e a produção sustentável, levando várias espécies ao risco de extinção (Wadt, 2001). De acordo com Vieira *et al.* (2005) é urgente a tomada de iniciativas que permitam um avanço rápido do conhecimento científico sobre a composição e a ecologia das espécies amazônicas, antes de começarem a desaparecer, antes mesmo de terem sido catalogadas.

Duas espécies vegetais encontradas na região amazônica vêm tendo merecido destaque por suas características fitoquímicas: a pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.) e a pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC). Pertencentes à família Piperaceae, essas duas espécies apresentam porte arbustivo e formam um recurso natural de grande valor comercial, devido aos respectivos compostos secundários, dilapiol e safrol encontrados como compostos majoritários em seus óleos essenciais. Apesar da diferença entre os compostos secundários encontrados em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, as espécies são morfológicamente bastante similares (Nunes *et al.*, 2007).

A pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) é um arbusto com alto rendimento em óleo essencial rico em safrol. A demanda mundial por óleos ricos em safrol é bastante expressiva, tendo em vista que esse éter fenílico é um precursor de piperona e butóxido de piperonila, os quais possuem grande apelo farmacêutico e industrial (Bandone *et al.*, 2008). Já a pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.) é uma planta aromática, com óleo essencial rico em dilapiol. O dilapiol é um éter fenílico que vem sendo testado com êxito como fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e

larvicida, com a vantagem de ser um produto biodegradável (Silva, 2004). Neste sentido, aumenta cada vez mais a perspectiva de implantação de um sistema agrícola baseado na exploração destes óleos essenciais para produção em grande escala (Figueiredo *et al.*, 2012).

Baseado no grande interesse econômico despertado por parte de indústrias farmacêuticas, devido à presença do éter fenílico dilapiol, tem se tido a necessidade de se desenvolver sistemas de cultivo para a domesticação e melhoramento dessas espécies no que diz respeito à produção destes óleos essenciais. Porém, o sistema de cultivo ou o manejo destas espécies ainda não está bem definido e sua domesticação ainda está em fase de desenvolvimento, sendo que a Embrapa Acre tem realizado estudos para a definição do sistema de cultivo (Wadt, 2001).

Informações sobre as diferenças genéticas entre indivíduos de uma população e o estabelecimento de relações genéticas entre diferentes acessos de uma coleção de germoplasma são fundamentais para auxiliar o pesquisador na tomada de decisões durante o processo de melhoramento. A determinação da forma preferencial de propagação também é essencial para a escolha do método de melhoramento mais adequado, pois existem métodos específicos para os diferentes sistemas reprodutivos (Dias & Kageyama, 1982).

A micropropagação é a técnica da cultura de tecidos vegetais mais utilizadas para a produção de mudas de plantas com algum potencial econômico. Esta técnica é capaz de proporcionar a produção de um elevado número de plantas, em curto espaço de tempo e de alta qualidade genética e fitossanitária (Grattapaglia & Machado, 1998). Além da produção de mudas utilizando técnicas de cultura de tecidos, é possível também conservar recursos genéticos *in vitro* e produzir compostos secundários por meio da cultura de calos ou via suspensões celulares (Rosal, 2004). Devido à erosão genética e diminuição da diversidade gênica de espécies vegetais é crescente a preocupação com a conservação dos Recursos Genéticos Vegetais (Vilela-Morales & Valois, 2000). *P. aduncum* e *P. hispidinervum* estão incluídas na lista de espécies medicinais prioritárias para a conservação (Vieira & Silva, 2002). De acordo com estes autores, a conservação de sementes e a conservação *in vitro* são algumas das ações que devem ser tomadas para garantir a conservação destas espécies.

Assim sendo, torna-se imprescindível, estudos a respeito da multiplicação *in vitro* e de estratégias de conservação de germoplasma de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, gerando subsídios para a cadeia produtiva da pimenta de macaco e pimenta longa.

O objetivo deste trabalho é estabelecer um protocolo para conservação *in vitro* de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum*, otimizar técnicas de multiplicação e regeneração de plantas, bem como de avaliar a estabilidade genômica dos materiais obtidos e conservados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Piperaceae

A família Piperaceae engloba cerca de 2.500 espécies distribuídas em cinco gêneros, sendo *Piper* L. e *Peperomia* Ruiz & Pav. os dois maiores. Possui distribuição pantropical, com maior número de espécies ocorrendo na região neotropical. O principal centro de diversidade da família está localizado nas Américas Central e do Sul (Heywood 1979; Jaramillo & Manos 2001; Nee 2004).

No Brasil são encontradas aproximadamente 500 espécies (Yuncker, 1972) distribuídas em apenas três gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Sarcorrhachis* Trel. As espécies estão amplamente distribuídas no território nacional, sendo expressiva sua importância econômica e medicinal (Tebbs 1989; Jaramillo & Manos 2001). O gênero *Piper* apresenta um número próximo a 700 espécies, distribuídas em todas as regiões tropicais, das quais mais de 170 ocorrem no Brasil (Yuncker, 1972). Conforme Silva & Machado (1999), a maioria das espécies pertencente a este gênero possuem óleos essenciais e componentes secundários de grande interesse para as indústrias químicas e farmacêuticas, destacando-se também pelo seu uso na medicina popular.

2.2. *Piper aduncum* L.

Piper aduncum é um arbusto com 1,5 - 2,0 m de altura, ramos pubescentes e folhas com pecíolo de 0,2 a 0,4 cm de comprimento, sem bainha (Figura 1). As folhas podem ser elípticas ou lanceoladas, com aproximadamente 20 cm de comprimento e 7,0 cm de largura. O ápice é acuminado e a base foliar pode ser redonda ou cordulata. As folhas são ásperas na face ventral e pubescentes nas faces dorsal e ventral. As espigas são regularmente curvadas, de tamanho semelhante ao das folhas com pedúnculos curtos, com bractéolas pedicelado-peltadas, com pelta provida de pêlos. A espécie apresenta quatro estames e três estigmas sésseis (Silva & Oliveira, 2000).

A *P. aduncum* tem apresentado grande interesse comercial em função do teor de dilapiol presente no óleo essencial extraído da parte aérea; por isto, a espécie tem sido estudada e submetida a seleções de material para melhoramento genético (Negreiros *et al.*, 2013).

Inúmeros testes já foram realizados em relação ao controle de fitopatógenos que prejudicam diferentes produções agrícolas, com resultados positivos que comprovam a eficiência do dilapiol (Almeida *et al.* 2009). Além disso, estudos vêm sendo conduzidos nos últimos três anos, no que diz respeito ao beneficiamento da cadeia produtiva, com indicadores que viabilizam a produção, como: baixo custo envolvido, produtividade elevada e nível de agressão ambiental reduzido (Figueiredo *et al.*, 2010).

Diversas pesquisas também têm sido desenvolvidas para determinar a ação fungicida do óleo essencial de *P. aduncum*. Lobato *et al.* (2007) revelaram que o óleo essencial de *P. aduncum*, na concentração de 0,5%, mostrou-se eficaz no controle de fungos em sementes de *Vigna unguiculata* (feijão caupi). Estes autores recomendam o uso deste óleo essencial de forma econômica e racional. Também mencionam o elevado potencial do óleo como agente inibidor de colônias fúngicas e, conseqüentemente, uma forma biodegradável de se combater fungos fitopatogênicos que contribuem para a deterioração das sementes, morte de plântulas e possíveis prejuízos na produção, mostrando uma nova possibilidade e perspectivas para o tratamento de sementes desta espécie.

Bastos & Albuquerque (2004) relatam que o óleo de *P. aduncum*, além de ser um produto biológico natural, apresenta potencial de uso para o controle da podridão de frutos de banana causada por *Colletotrichum musae* em pós-colheita, com a vantagem de minimizar o uso dos fungicidas convencionais, preservando assim, o meio ambiente e protegendo a saúde do consumidor.

Outras ações reconhecidas de *P. aduncum* são a inseticida e sinergista. Fazolin *et al.* (2005) concluíram que o óleo rico em dilapiol, proveniente de plantas de *P. aduncum*, apresentou toxicidade para adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera) em concentrações a partir de 0,04% por ação de contato em superfície contaminada e a partir de 4,1% por aplicação tópica. Insetos submetidos às concentrações acima de 2,5% por aplicação tópica apresentaram distúrbios fisiológicos.

Rafael *et al.* (2008), estudando o efeito do extrato aquoso das folhas de *P. aduncum* sobre *Aedes aegypti*, o mosquito transmissor da dengue, observaram que quando o extrato foi aplicado no estágio larval e de pupa do mosquito, houve alto índice de mortalidade, demonstrando o efeito larvicida do extrato rico em dilapiol.

Segundo Scheffer *et al.* (1999), as plantas medicinais representam uma importância estratégica, especialmente no que diz respeito à assistência precária do sistema de saúde oficial e a baixa renda da população. Estes aspectos, quando associados aos conhecimentos tradicionais acumulados pelas comunidades, fazem com que grande parte da população utilize as plantas medicinais como recurso terapêutico. Já quando usadas como bioinseticidas no controle de pragas, essas substâncias apresentam a vantagem de não causarem prejuízos à saúde do aplicador e ao meio ambiente (Oliveira & Vendramim, 1999). Além do mais, os inseticidas biológicos não causam desequilíbrios biológicos, não poluem recursos hídricos, e não deixam acúmulos de resíduos tóxicos no meio ambiente, que podem afetar a saúde do ser humano (Almeida *et al.*, 1999).



Figura 1. Planta adulta de *P. aduncum* em condições de campo (Fonte: Silva, 2010).

2.3. *Piper hispidinervum* C. DC

De acordo com Silva & Oliveira (2000), a pimenta longa é um arbusto com 2,0 - 3,0 m de altura com ramos não pubescentes, com pecíolo variando de 0,1 a 0,2 cm de comprimento (Figura 2). As folhas são oblongo-lanceoladas ou oblonga-elípticas, variando de 14,5 a 22 cm de comprimento e 4,7 cm de largura. O ápice é acuminado e levemente cuspidado. A base da folha é oblíqua a inequilátera, com folhas levemente ásperas na face ventral. As espigas são de tamanhos semelhantes aos das folhas, com pedúnculos curtos, próximos a 1 cm de comprimento, com bractéolas pediceladopeltadas. As flores apresentam quatro estames sem anteras e três estigmas sésseis.



Figura 2: Planta adulta de *P. hispidinervum* em de campo (Fonte: Silva, 2010).

As plantas de pimenta longa apresentam características ecológicas que as definem como uma espécie pioneira antrópica, típica de ambiente aberto com incidência direta de luz e adaptada a locais quentes (Almeida, 1999). As populações naturais de *P.*

hispidinervum são densas, com domínio dessa espécie sobre as demais (Santiago *et al.*, 2001; Wadt & Kageyama, 2004).

Esta espécie vegetal tem despertado o interesse de empresários do ramo de fitoquímicos, com potencial para uso em indústrias de cosméticos e bioinseticidas. A pimenta longa é um recurso natural, encontrado no estado do Acre, de grande valor comercial devido ao alto teor de safrol em seu óleo essencial (Almeida, 1999).

Rocha & Ming (1999) relatam que a pimenta longa apresenta altos níveis do éter fenílico safrol (83-93%), podendo ser facilmente extraído por hidrodestilação das folhas e ramos finos. Os principais subprodutos obtidos a partir do safrol são a heliotropina, amplamente utilizada como fragrância, e o butóxido de piperonila (PBO), um ingrediente essencial para inseticidas biodegradáveis.

Zacaroni *et al.* (2009) avaliaram o efeito fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* em fitopatógenos. Estes autores concluíram que o óleo essencial de pimenta longa, na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, inibiu totalmente o crescimento de *Bipolaris sorokiniana* enquanto que, para o *Fusarium oxysporum* e o *Colletotrichum gloeosporioides* a inibição ocorreu na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Estudos também comprovam a ação inseticida do óleo essencial da pimenta longa. Fazolin *et al.* (2007) relatam que, a volatilidade apresentada pelo óleo essencial de *P. hispidinervum* pode ser a causa dos altos índices de mortalidade de *Tenebrio molitor* (bicho da farinha) ao efeito conjunto contato e fumigação, promovendo mortalidade acima de 80% das larvas.

Por meio de análise cromatográfica, Lima *et al.* (2009) constataram o safrol (82%) como constituinte majoritário do óleo essencial de pimenta longa, e por bioensaios demonstraram sua atividade inseticida em lagarta do milho (*Spodoptera frugiperda*), causando mortalidade e redução alimentar pelo teste de ingestão e toxicidade aguda pelo teste de aplicação tópica, sendo também observados sintomas de neurotoxicidade.

Apesar do grande apelo comercial que a pimenta longa apresenta, esta ainda encontra-se em fase de domesticação (Sousa *et al.*, 2001), e é praticamente desconhecida do ponto de vista científico (Sá & Pimentel, 2001). Pesquisas envolvendo métodos mais eficientes de propagação e cultivo, que possibilitem avanços no melhoramento vegetal ou que, ainda, favoreçam mecanismos para a produção de safrol em alta escala, são de maneira geral, escassas (Costa *et al.*, 2008), uma vez que a

produtividade depende da técnica de manejo adotada, como o número de cortes realizados por ano (geralmente um ou dois), do espaçamento e da altura e da época de corte (Miranda, 2002).

2.4. Conservação de Germoplasma *in vitro*

Os recursos genéticos vegetais devem ser conservados em sistemas vivos, isto é, na forma de plantas, sementes ou tecidos com potencial para reprodução. Nesse contexto, são de grande importância a implantação e manutenção de coleções e bancos ativos de germoplasma (Barbieri, 2003). O germoplasma, que é o patrimônio genético de uma espécie, é composto pelos parentes silvestres das plantas cultivadas, por variedades locais, também conhecidas como variedades crioulas ou landraces, por variedades obsoletas ou antigas, por linhas avançadas de melhoramento e por variedades elite atuais (Hoyt, 1992).

Um banco ativo de germoplasma é uma coleção de acessos que é rotineiramente usada para fins de pesquisa, conservação, caracterização, avaliação e uso, cujos objetivos são reduzir a erosão genética, conservar fontes de genes para uso futuro e identificar e caracterizar genótipos para utilização em sistemas agrícolas. Os acessos são multiplicados de acordo com a demanda e regenerados periodicamente (Barbieri, 2003).

Atualmente, a conservação dos recursos genéticos vegetais tem sido tratada como prioritária em vários países, além de ser considerada como elemento principal de qualquer estratégia que objetive assegurar o suprimento de alimentos e o desenvolvimento do setor agrícola, desde que associada à preservação de outros recursos naturais (Withers & Engelmann, 1998).

Assim, a disponibilidade de variabilidade genética vegetal por meio dos diversos modos de conservação constitui um requerimento básico à continuidade de programas de melhoramento clássicos e modernos, essenciais ao desenvolvimento de genótipos de elevada importância comercial.

Desde os anos de 1970, grande número espécies primitivas e silvestres cultivadas tem sido amostradas e conservadas em bancos *ex situ*, isto é, fora do seu habitat natural (Panis & Lombardi, 2006). Entretanto, a manutenção desses recursos em condições de campo, ou mesmo em viveiros, por meio de métodos convencionais de conservação, necessita normalmente de extensas áreas e de mão de obra extensiva.

Além disso, essas espécies estão sob o risco iminente de desaparecimento, em razão de fatores como: adversidades ambientais, ataque de pragas e dificuldade de multiplicação (Nassar, 2003).

Em geral, qualquer tecnologia destinada à conservação de germoplasma tem como princípio básico preservar o máximo possível a diversidade genética de determinado vegetal, tanto no nível de espécies, quanto de variedades ou de indivíduos, visando a seu uso atual e futuro como fonte de variabilidade (Razdan, 2003).

A conservação *ex situ* compreende a retirada dos recursos genéticos de seus ambientes de ocorrência natural e sua transferência para condições de armazenamento artificial, de modo adequado e por curto ou mesmo longo período de tempo. Além disso, consiste no principal método para conservação dos recursos genéticos. Este método pode ser constituído de materiais cultivados e selvagens, e requer para seu uso conhecimento sobre a estrutura das populações, técnicas de amostragem, métodos de regeneração e manutenção de variabilidade genética, particularmente em plantas homólogas (Withers & Engelmann, 1998).

Em consequência das limitações inerentes aos métodos convencionais de conservação *ex situ* e *in situ*, tecnologias alternativas, como as de conservação *in vitro*, têm sido desenvolvidas e aprimoradas. Atualmente, tais alternativas são consideradas estratégicas para a conservação de recursos genéticos vegetais, sobretudo para aquelas espécies multiplicadas assexuadamente (Razdan, 2003).

As técnicas *in vitro* também permitem os seguintes procedimentos: preservação da variação somaclonal nas culturas e nas linhagens de células de uso medicinal; armazenamento de pólen com vistas na melhoria de sua longevidade; conservação de germoplasma raro e de espécies ameaçadas de extinção, retardamento do processo de envelhecimento de materiais vegetais, entre outras (Islam *et al.*, 2003).

A conservação de germoplasma *in vitro* baseia-se na indução do crescimento mínimo por meio da redução do metabolismo celular da planta, aumentando ao máximo o espaço de tempo entre cada subcultivo. Para tanto, estratégias de redução da temperatura de crescimento e/ou adição de reguladores químicos e osmóticos ao meio de cultura são as mais utilizadas (Withers & Williams, 1998).

Silva & Scherwinski-Pereira (2011) concluíram que a manutenção à temperatura de 20 °C é efetiva para a conservação *in vitro* de brotos de *P. aduncum* e *P.*

hispidinervum, pois as culturas *in vitro*, mantidas nessa temperatura em meio de MS apresentaram 100% de sobrevivência com o crescimento lento dos brotos.

Gonçalves & Romano (2007) desenvolveram um método para a conservação *in vitro* de *Drosophyllum lusitanicum*. Neste estudo, as microestacas contendo duas gemas laterais foram mantidas por 4, 8 e 12 meses à temperatura de 5 °C ou 25 °C. Os autores concluíram que a espécie pode ser conservada por até oito meses a 5 °C, sem a necessidade de subcultivos durante o período de conservação.

Em *Asparagus officinalis*, Bekheet (2000) relata que 90% das microestacas conservadas por 12 meses à temperatura de 5 °C mantiveram-se viáveis após este período.

A suplementação do meio de cultura com reguladores de crescimento, tais como o ABA (ácido abscísico), o ancimidol, os açúcares alcoóis e/ou a sacarose, bem como a diminuição da intensidade de luz, ou mesmo a total ausência dela em associação à baixa temperatura, podem efetivamente auxiliar na velocidade de redução da taxa de crescimento (Islam *et al.*, 2003). Assim, prolonga-se o intervalo entre os subcultivos e reduz-se a necessidade de mão-de-obra e de reagentes e, desta forma, diminuem-se os riscos de perdas por contaminação (Lemos *et al.*, 2002).

2.5. Regeneração e Multiplicação

A cultura de tecidos de plantas é uma técnica que utiliza pequenos fragmentos de tecido vivo (explante) isolados de uma planta, os quais são cultivados assepticamente em um meio nutritivo previamente definido. O fundamento básico da cultura de tecidos é a totipotência celular, segundo a qual, qualquer célula vegetal contém toda a informação genética necessária à regeneração de uma planta completa (Termignoni, 2005).

Os principais usos da cultura de tecidos são a reprodução de plantas *in vitro* visando a produção de mudas de alta qualidade, a recuperação de plantas livres de vírus (limpeza clonal), a conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas (conservação de germoplasma), a produção de haplóides e duplos (Torres *et al.*, 1998).

2.5.1. Micropropagação

A primeira aplicação comercial da micropropagação foi feita por Morel (1960), ao multiplicar orquídeas mediante cultura de ápices caulinares e regeneração de protocormos, diminutas estruturas que se diferenciavam e davam origem a embriões. A sucessiva divisão desses protocormos acelerava a propagação de orquídeas.

Atualmente, a atividade comercial de micropropagação concentra-se principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies de interesse econômico. Na década de 70, quando a micropropagação ganhou grande impulso, Murashige (1974) apresentou o conceito de estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*, dividindo o esquema do sistema de micropropagação em três estágios: I) seleção de explantes, desinfestação e cultura em meios nutritivos sob condições assépticas; II) multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para multiplicação; III) transferência das partes aéreas produzidas para meio de enraizamento e subsequente transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo.

O sucesso de um sistema de micropropagação depende de diversos fatores que podem determinar o desenvolvimento de um bom protocolo, seja ele comercial ou não. Estes fatores são: iniciação e estabelecimento das culturas onde é dada a seleção dos explantes, escolha da planta matriz, a seleção e coleta dos explantes, a desinfestação, o isolamento dos explantes, e no que diz respeito ao meio de cultura diversas formulações têm sido utilizadas no início do cultivo. Não há uma formulação padrão, mas o meio de MS (Murashige & Skoog, 1962), suas modificações e diluições de fitorreguladores têm apresentado bons resultados para diversas espécies (Grattapaglia & Machado, 1998).

As técnicas de micropropagação clonal *in vitro* também adequam-se a programas de introdução, armazenamento e intercâmbio de germoplasma, contribuindo para prevenir perda de variabilidade genética. As técnicas de conservação de material vegetal *in vitro* incluem a criopreservação e a preservação sob condições de crescimento lento de explante (Torres *et al.*, 1998).

2.5.2. Embriogênese Somática

A embriogênese somática é definida como um processo no qual uma estrutura bipolar, assemelhando-se um embrião zigótico, se desenvolve a partir de uma célula não-zigótica sem conexão vascular com o tecido original. Os embriões somáticos são usados para estudos de regulação do desenvolvimento embrionário, e também como uma ferramenta para a propagação vegetativa em grande escala. A embriogênese somática é um processo de regeneração de múltiplos passos, começando com a formação de massas pró-embriogênicas, seguido de formação de embriões somáticos, maturação, dessecação e regeneração de plantas (Von Arnold *et al.*, 2002).

A embriogênese somática é uma das técnicas de propagação clonal mais promissora dos últimos tempos. Esta técnica tem apresentado inúmeras vantagens sobre as técnicas tradicionais de propagação, como a multiplicação em larga escala de genótipos superiores, a obtenção de um grande número de propágulos (embriões somáticos) em pequenos espaços físicos, a sincronização da produção das mudas, a possibilidade de armazenamento dos propágulos por um longo período de tempo via criopreservação, a produção de sementes sintéticas, eliminando assim, etapas do processo, como a de aclimatização, além da possibilidade de um alto grau de automatização do processo (Titon *et al.*, 2007).

A micropropagação via embriogênese somática é uma técnica da cultura de tecidos definida como o processo pelo qual células somáticas desenvolvem-se por meio de diferentes estádios embriogênicos, formando uma estrutura bipolar, chamada embrião somático, que ao final do processo de diferenciação dará origem a uma planta, sem que ocorra a fusão de gametas (Pereira *et al.*, 2007)

O desenvolvimento dos embriões somáticos se dá através dos mesmos estádios embriogênicos observados na embriogênese zigótica (globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar), diferindo apenas, pelo fato dos mesmos não se tornarem dormentes e não serem revestidos por tegumento e endosperma. Quanto à morfologia, os embriões somáticos também se assemelham muito aos embriões zigóticos, embora geralmente não tenham a característica de formar o suspensor e apresentarem um sistema vascular fechado, sem conexão com o tecido de origem. Os embriões somáticos também são bipolares e possuem órgãos tipicamente embriogênicos, como a radícula, o hipocótilo e o cotilédone (Moura *et al.*, 2009).

A indução da embriogênese somática é o desencadeamento de um processo morfogênético pela exposição do explante a um estímulo físico, químico ou biológico, sendo a etapa mais crítica para o estabelecimento das culturas embriogênicas *in vitro* (Guerra & Nodari, 2006). Segundo Merkle *et al.* (1995), a indução da embriogênese somática está relacionada a alterações no padrão de expressão gênica dos explantes, com reprogramação das células que estarão envolvidas no processo embriogênico. Entretanto, o potencial embriogênico não é somente determinado geneticamente, mas também é influenciado pelo meio de cultura e pela qualidade do explante (Loyola-Vargas *et al.*, 1999).

Culturas embriogênicas foram descritas pela primeira vez na literatura em 1958, por Steward e Reinert, independentemente, a partir de calos e suspensões celulares de cenoura cultivados em meio de cultura contendo água de côco (Jiménez, 2005).

Teoricamente, qualquer parte da planta em alguma fase do seu ciclo de vida pode ser utilizada como fonte de explante para gerar uma nova planta completa, o que deve-se ao fenômeno da totipotência celular. Contudo, existem vários fatores que devem ser considerados para assegurar o sucesso das técnicas de cultura de tecidos, incluindo tamanho e tipo do explante, facilidade de obtenção de culturas assépticas, estágio de desenvolvimento do tecido, condições fisiológicas e nutricionais do explante e o genótipo utilizado (Teixeira *et al.*, 1993).

Yusuf *et al.* (2001) conseguiram induzir embriogênese somática direta e regeneração de plantas utilizando explantes foliares de *Piper colubrinum*. Dalponte *et al.* (2009) também relatam em seu trabalho o uso de folhas de *Piper hispidinervum* na produção de massa celular, sem contudo terem diferenciado ou regenerado embriões somáticos.

2.5.3. Variação Somaclonal e Fidelidade Genética

As técnicas de micropropagação são muito importantes na clonagem e na multiplicação rápida de genótipos de interesse comercial, produzindo plantas, teoricamente, com a mesma identidade genética do material vegetal de origem, ou seja, com a mesma fidelidade genética. Porém, em todas essas técnicas, existe o risco de ocorrer variação genética nas células ou nas plantas regeneradas. Tal fenômeno, na literatura sobre cultura de tecidos, denomina-se variação somaclonal. O termo

‘somaclone’ exprime a idéia de qualquer planta originada sob condições *in vitro* que apresenta alguma anormalidade morfológica (visível) ou genética (Larkin & Scowcroft, 1981). Dentre os mecanismos causadores da variação somaclonal destacam-se as variações cromossômicas, as recombinação mitótica, a ativação de transposons, as mutações em um único gene, as metilações do DNA, os sítios de instabilidade “hot spots” no DNA genômico, a poliploidia e as mutações nucleares e citoplasmáticas (Santos, 2008; Konan *et al.*, 2010; Ting *et al.*, 2010).

Acredita-se que as variações somaclonais foram relatadas pela primeira vez por Butenko *et al.* (1967), analisando culturas regeneradas de calos de fumo. Desde então variantes somaclonais vêm sendo relatadas em diversas espécies vegetais propagadas *in vitro*, como no arroz, no tomate, na batata, além de algumas espécies de palmeiras, como na pupunheira e na tamareira (Evans *et al.*, 1984; Sugimoto *et al.*, 1999; Steinmacher *et al.*, 2007; Nistor *et al.*, 2009; Ahmed *et al.*, 2009).

Durante muito tempo foi discutido se as variações genéticas observadas nas plantas produzidas por meio da micropropagação resultavam da variabilidade genética pré-existente nas células somáticas ou eram induzidas pelas condições de cultivo *in vitro*. Atualmente, acredita-se que este fenômeno é provocado por ambos os fatores. Segundo Santos & Rodrigues (2004), as variações somaclonais podem surgir em decorrência de uma série de fatores, tais como: a fonte e o estado fisiológico do explante, o genótipo da planta mãe, a idade da cultura, o grau de organização meristemática, a presença de reguladores de crescimento, as propriedades físico-químicas do meio de cultura e o tempo de permanência *in vitro*.

No entanto, as variações somaclonais também são importantes em programas de melhoramento genético vegetal, induzindo mutações genéticas utilizadas no aprimoramento de características morfológicas e agronômicas das cultivares, como por exemplo, no peso e no rendimento dos grãos e cachos, na altura, na coloração, no perfilhamento e na floração das plantas e na resistência dos genótipos a doenças e pragas. Deste modo, torna-se indispensável identificação e a caracterização das variantes somaclonais em plantas provenientes da micropropagação, garantindo assim, a produção de mudas de alta qualidade para a formação de plantios comerciais e a utilização da melhor forma possível destas variantes em programas de melhoramento genético (Araújo & Prabhu, 2001).

2.6. Citometria de fluxo

A escolha do método de melhoramento depende do prévio conhecimento da variabilidade genética existente dentro da espécie, que pode ser obtido pelo seqüenciamento de partes do DNA ou da seqüência completa do genoma estrutural das espécies envolvidas. Uma ferramenta muito útil ao seqüenciamento de DNA é a citometria de fluxo, que permite determinar a quantidade de DNA que existe para ser seqüenciada em um genoma (Ferreira, 2003), além de permitir posteriormente, a diferenciação entre espécies afins e/ou seus híbridos.

A citometria de fluxo foi originalmente desenvolvida no fim dos anos 50 para a contagem e análise de células sanguíneas. Estudos utilizando citometria de fluxo em espécies vegetais ocorreram apenas no início da década de 80 e o número de aplicações tem aumentado continuamente desde então. É uma técnica que envolve a análise das propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas que fluem numa suspensão líquida e baseia-se, na intensidade de fluorescência relativa de núcleos corados com um fluorocromo específico para o DNA (Loureiro & Santos, 2002).

Além da estimativa do tamanho do genoma, a citometria de fluxo pode ser aplicada para análises de ploidia (Madon *et al.*, 2005), determinação do sexo em uma fase prévia do crescimento, detecção de genotoxicidade, análises do ciclo celular e alterações ocorridas no DNA durante as fases de cultura de tecidos (Srisawat *et al.*, 2005).

2.7. Estudos anatômicos

O emprego das técnicas de análise anatômica permite o detalhamento de eventos que ocorrem quando espécies vegetais são cultivadas *in vitro*. Estudos histológicos podem ser realizados para a verificação e a confirmação do desenvolvimento das gemas adventícias (organogênese) ou de embriões somáticos (embriogênese somática) e a definição da origem direta ou indireta (Rodrigues *et al.*, 2004).

Caracteres morfológicos e anatômicos tanto vegetativos quanto reprodutivos estão relacionados com determinadas condições ambientais, embora a relação entre esses caracteres adaptativos e as condições ambientais, em muitos casos, seja difícil de estabelecer (Ehrendorfer, 1973). No cultivo *in vitro*, as plantas podem apresentar

características peculiares como abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido, reduzida capacidade de sustentação (esclerênquima e colênquima) e outros tipos de desordens (Campostrini & Otoni, 1996).

Na embriogênese somática, a realização de estudos histológicos possibilita a observação dos tipos celulares a partir dos quais surgem os embriões somáticos, permitindo o aumento da manipulação das respostas embriogênicas (Barbosa, 2003).

O estudo do desenvolvimento de células ou grupos de células por técnicas histológicas tem se mostrado útil para o entendimento da embriogênese em várias espécies vegetais. Em *Hevea brasiliensis*, o tempo adequado de subcultivos foi determinado por meio de análises histológicas (Michaux-Fèrriere & Carron, 1996). Ao se utilizar embriões zigóticos de *Cocos nucifera* como fonte de embriogênese somática, verificou-se que o processo tem origem principalmente na plúmula (Chan *et al.*, 1998), e o cultivo desta estrutura vem potencializando os protocolos de embriogênese dessa espécie (Pérez-Nuñez *et al.*, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

- Desenvolver estratégias de conservação, multiplicação e regeneração *in vitro* de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, bem como avaliar a estabilidade genômica das plantas regeneradas.

3.2. Objetivos específicos:

- Estabelecer e otimizar um protocolo para a embriogênese somática e micropropagação em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*.

- Realizar caracterização morfológica e anatômica dos calos embriogênicos e embriões somáticos.

- Avaliar a estabilidade genômica de mudas conservadas e regeneradas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* por citometria de fluxo.

- Adequar condições ambientais e nutricionais que proporcione um crescimento mínimo durante a conservação *in vitro* de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de realização dos experimentos

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT II) da Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF.

4.2. Material vegetal

Os lotes de sementes utilizados para dar origem às plantas e realização dos experimentos foram provenientes do Banco de Germoplasma de *Piper aduncum* e *P. hispidinervum* localizado na Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

Todas as sementes passaram previamente por um processo de desinfestação que consistiu em imersão em álcool 70% por 4 minutos, seguido da imersão de 20 minutos em hipoclorito de sódio (NaOCl) numa concentração de 2,5% de cloro ativo e 5 lavagens com água destilada esterilizada para remoção do excesso dos agentes desinfestantes. Para a secagem das sementes utilizou-se papel filtro autoclavado.

As sementes foram inoculadas em meio de cultura com sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962) adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose e o pH ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição do agente geleificante Phytigel (2,5 g.L⁻¹). A alíquota de 40 mL de meio de cultura foi distribuída em frascos de 250 mL de capacidade. Em seguida os frascos com o meio foram esterilizados a 121°C e 1,5 atm de pressão, durante 20 minutos.

Todo processo de inoculação e manipulação das sementes foi realizado em condições assépticas em câmara de fluxo laminar e os utensílios, tais como, pinças, bisturis e placas de *Petri* foram previamente esterilizados por autoclavagem. O material inoculado *in vitro* foi acondicionado em sala de crescimento com temperatura de 25 °C ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação luminosa de 30 μmol.m⁻².s⁻¹ fornecidos por lâmpadas fluorescentes brancas fria.

4.3. Experimento I – Estudos de germinação de sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Neste experimento foram testados diferentes meios de cultura, condições de incubação e temperatura para avaliar a velocidade de germinação, taxa de germinação e tempo médio de germinação (Figura 3).

4.3.1. Etapa I – Efeito de meios de cultura e condições de cultivo na germinação de sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

As sementes foram inoculadas em meios de cultura contendo sais e vitaminas de MS e WPM (Lloyd & McCown, 1980), adicionados de 30 g.L⁻¹ de sacarose e o pH ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição de PhytigelTM (2,5 g.L⁻¹). Os meios de cultura foram distribuídos em placas de *Petri* (15 x 90 mm) preenchidos com 30 mL de meio de cultura cada.

O material inoculado foi acondicionado em estufas incubadoras BOD (demanda bioquímica de oxigênio) com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas ou na ausência de luz. O experimento foi avaliado durante 25 dias, sendo as observações relativas à germinação avaliadas diariamente. As medidas de germinação foram calculadas com base nas equações de Ferreira & Borghetti (2004) para tempo médio de germinação e velocidade média de germinação:

$$(\bar{t}) = \sum n_i \cdot t_i / \sum n_i \text{ e } (v) = 1 / \bar{t} = \sum n_i / \sum n_i \cdot t_i$$

Onde: (\bar{t}) é o tempo médio de germinação, n_i é o número de sementes germinadas em relação ao número de sementes colocadas para germinar, t_i é o intervalo de tempo e (v) é a velocidade média de germinação.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 10 repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por 10 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento e 400 sementes por espécie. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 2 x 2, sendo dois meios de cultura, MS e WPM; duas condições de cultivo, luz e escuro e duas espécies, *P. aduncum* e *P. hispidinervum*.

4.3.2. Etapa II – Efeito da temperatura na germinação *in vitro* de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Nesta etapa objetivou-se testar duas temperaturas (25 °C e 30 °C) na germinação de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*. Baseado nos resultados do experimento anterior optou-se utilizar apenas um meio de cultura. Para tanto, as sementes foram inoculadas em meios de cultura com sais e vitaminas de WPM, adicionados de 30 g.L⁻¹ de sacarose e o pH ajustado para 5,8 ± 0,1, antes da adição do agente geleificante PhytigelTM (2,5 g.L⁻¹). Cerca de 30 mL de meio de cultura foram distribuídos em placas de *Petri*.

O material inoculado foi acondicionado em duas estufas incubadoras, sendo uma com temperatura ajustada para 25 °C e outra, para 30 °C. Em ambas estufas, o fotoperíodo foi programado para 16 horas. O experimento foi avaliado durante 30 dias, sendo as observações relativas à germinação avaliadas diariamente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 10 repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por 10 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento e 200 sementes por espécie. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 2, sendo duas temperaturas, 25 e 30 °C e duas espécies, *P. aduncum* e *P. hispidinervum*.

4.4. Experimento II – Efeito das concentrações de sais dos meios de cultura MS e WPM na micropropagação de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

O neste experimento foi avaliado o efeito de diferentes concentrações salinas dos meios de cultura, MS e WPM, na micropropagação de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*. Para tanto, microestacas de aproximadamente 1 cm de altura, com pelo menos uma gema axilar, provenientes de plantas micropropagadas *in vitro* foram utilizadas como explantes (Figura 3).

As estacas foram inoculadas em frascos de 250 mL, contendo cerca de 40 mL de meio MS ou WPM, com concentrações dos sais a 50, 75 e 100%. Aos meios de cultura foi adicionado 30 g.L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição de 2,5 g.L⁻¹ de agente geleificante (Phytigel). Os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C e 1,5 atm, durante 20 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 5 repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por 5 explantes. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2 x 3, sendo dois meios de cultura, MS e WPM e três concentrações de sais, 50, 75 e 100%.

Após 45 dias de cultivo avaliou-se o número de gemas e altura das plantas regeneradas.

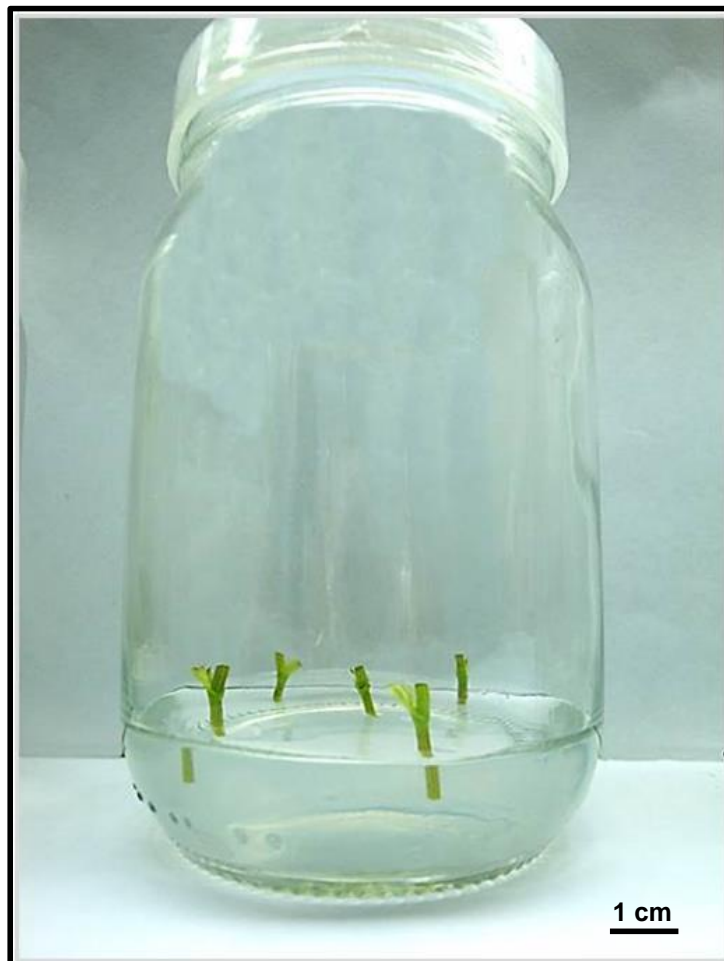


Figura 3: Microestacas de *Piper aduncum* inoculadas em meio de MS.

4.5. Experimento III – Efeito de concentrações de BAP e Cinetina na indução de multibrotação em microestacas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Uma vez determinado o melhor meio de cultura, microestacas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* contendo de uma a duas gemas axilares, com aproximadamente 1,0 cm de altura e provenientes de plantas germinadas *in vitro*, foram utilizadas como fonte de material vegetal.

As microestacas foram inoculadas em meio de cultura WPM, adicionado de diferentes concentrações de BAP e Cinetina (0,0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹), formando 14 tratamentos por espécie. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição de 2,5 g.L⁻¹ de PhytigelTM. O meio de cultura foi distribuído em frascos de 250 mL, que preenchidos com 40 mL e autoclavados a 121 °C e 1,5 atm de pressão, por 20 minutos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 5 repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por 5 explantes. Os tratamentos foram dispostos separadamente para cada espécie em esquema fatorial 2 x 7, sendo duas citocininas, BAP e Cinetina e sete concentrações, 0,0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹.

Após 60 dias de cultivo avaliou-se o número de brotações formadas e altura. Quanto à altura, as brotações foram classificadas em três classes: C1 (brotos com até 1,5 cm), C2 (acima de 1,5 até 3 cm) e C3 (altura superior a 3 cm).

4.6. Experimento IV – Calogênese e embriogênese somática em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Para o protocolo embriogênese somática em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, inicialmente foram combinados reguladores de crescimento em diferentes concentrações.

4.6.1. Etapa I – Indução de calos primários em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Nesta etapa, segmentos foliares de aproximadamente 0,5 cm², provenientes de plantas micropropagadas *in vitro* foram utilizados como explantes (Figura 4).

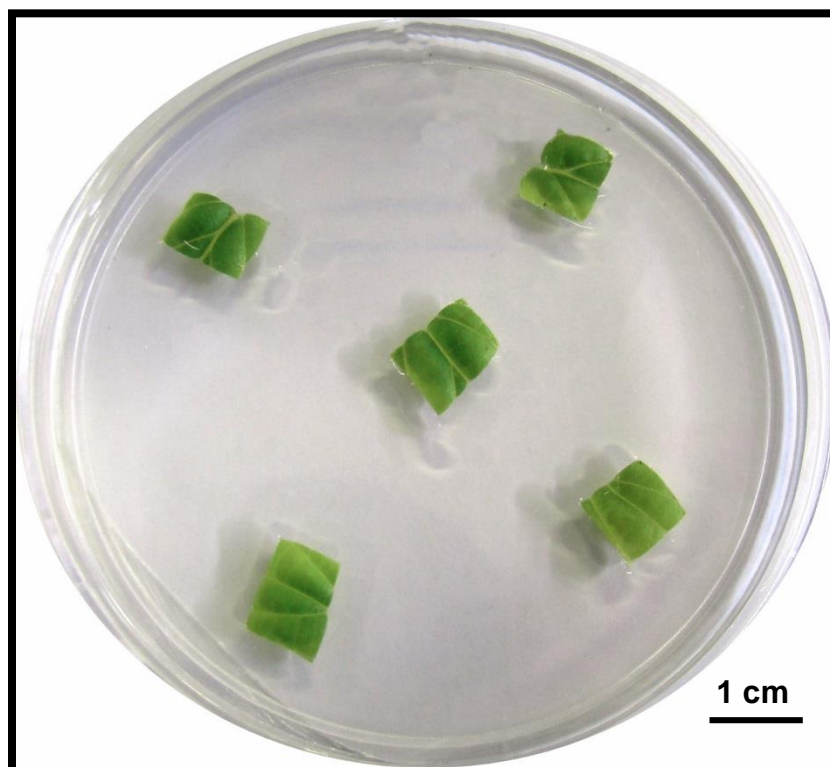


Figura 4: Explantes foliares de *Piper hispidinervum* inoculadas em meio de cultura de MS adicionado de reguladores de crescimento.

Os explantes foram cultivados em placas de *Petri* (15 x 90 mm) contendo meio de MS suplementado, inicialmente, com ANA (ácido α -naftalenoacético) e BAP (6-benzilaminopurina) formando seis tratamentos em diferentes combinações (Tabela 1).

Os segmentos foliares foram inoculados com a face abaxial em contato com o meio de cultura e cultivados em estufas incubadoras com temperatura a 25 °C \pm 2 °C no escuro durante 45 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 5 repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por 5 explantes. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 6 x 2 x 2, sendo seis tratamentos, duas espécies e dois tempos de incubação.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para a indução de calos em segmentos foliares de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*.

Tratamentos	Concentrações
T 0	0 mg.L ⁻¹ de ANA + 0 mg.L ⁻¹ de BAP
T 1	5 mg.L ⁻¹ de ANA + 0 mg.L ⁻¹ de BAP
T 2	10 mg.L ⁻¹ de ANA + 0 mg.L ⁻¹ de BAP
T 3	0 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L ⁻¹ de BAP
T 4	5 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L ⁻¹ de BAP
T 5	10 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5mg.L ⁻¹ de BAP

4.6.2. Etapa II – Indução de calos embriogênicos e embriões somáticos em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Após obtenção de calos primários, os mesmo foram retirados da cultura antiga e inoculados em meio de MS adicionado de 5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP e novamente incubados em temperatura a 25 ± 2 °C, na ausência de luz, por 40 dias.

4.6.3. Etapa III – Caracterização morfológica e diferenciação dos calos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Todos os calos obtidos foram selecionados de acordo com as características morfológicas e classificados como calo primário, embriogênico e formação de embrião somático. Esta caracterização morfológica foi realizada por meio de observação do material em estereoscópio seguindo padrões descritos em outros trabalhos (Sondahl *et al.*, 1979; Shoemaker *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1988).

4.6.4. Etapa IV – Estudos anatômicos da calogênese e da embriogênese somática em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

A caracterização anatômica do processo de embriogênese somática foi feita em calos obtidos durante diferentes fases do processo de indução da embriogênese somática e dos embriões somáticos após a sua formação.

As amostras foram fixadas em Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato 0,2M pH 7,2) durante 24 horas no dissecador, sob vácuo e estocadas em etanol 70%. Os explantes foram desidratados em série etílica e incluídos em metacrilato (Historesin, Leica), preparado conforme instrução do fabricante. Os blocos foram cortados longitudinalmente em secções de 5 µm de espessura em micrótomo rotativo de avanço automático, com a utilização de navalhas de aço descartáveis. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina em pH ácido.

As observações e a documentação fotográfica foram feitas em um microscópio Olympus (AX70), equipado com câmera Leica e software para captura de imagens. Esta parte do trabalho foi conduzida no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

4.6.5. Etapa V – Regeneração dos embriões somáticos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Após a caracterização dos calos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, aqueles que se diferenciaram em embriões somáticos foram retirados da cultura de indução onde estavam sendo cultivados e inoculados em placas de *Petri* com meio de crescimento. Foi utilizado o meio de cultura de MS, adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição de 2,5 g.L⁻¹ de Phytigel™. Os meios de cultura foram autoclavados a 121 °C e 1,5 atm de pressão, por 20 minutos.

Os embriões somáticos foram individualizados e inoculados nestes meios, sendo mantidos em sala de crescimento com temperatura a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas, por 45 dias até o desenvolvimento da planta.

4.6.6. Etapa VI – Aclimatização das plantas regeneradas de *P. hispidinervum*

Devido ao desenvolvimento lento na regeneração dos embriões de *P. aduncum*, apenas as plantas de *P. hispidinervum* foram aclimatizadas.

Após a regeneração dos embriões somáticos e crescimento das plantas, foi feita uma seleção dos melhores exemplares para aclimatização. Para tanto foi elaborado uma mistura de substrato comercial (Bioplant) e vermiculita autoclavados, na proporção de 2:1, respectivamente. As plantas foram retiradas dos frascos e lavadas em água corrente para eliminação do meio de cultura. O plantio foi feito em copos plásticos de 500 mL com a mistura de substrato cobrindo as raízes até parte do primeiro entrenó. As plantas foram acomodadas em bandejas, cobertas com fracos de vidro e levadas para estufa incubadora por 10 dias, com temperatura a 25 °C e fotoperíodo de 16 horas, para adaptação às condições de temperatura e umidade pós cultivo *in vitro*.

Após sete dias de aclimatização em estufa incubadora, as plantas foram transferidas para a casa de vegetação.

4.6.7. Etapa VII – Análise da fidelidade genômica por citometria de fluxo em plantas regeneradas de *P. hispidinervum*

O preparo das amostras e as análises foram realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Para isto, foram utilizadas aproximadamente, 30-50 mg. de folhas provenientes de plantas jovens regeneradas por embriogênese somática, de plantas cultivadas em casa de vegetação e do padrão de referência externo – ervilha (*Pisum sativum* L.).

Para a obtenção da suspensão de núcleos, o material vegetal foi inicialmente triturado em 1,0 mL de tampão de extração Marie (Marie & Brown, 1993), já adicionado à placa de *Petri* na presença de gelo. Em seguida, o tecido triturado em suspensão foi aspirado com auxílio de pipeta de Pasteur e filtrado em malha de 50 µm (Millipore). Por fim, a suspensão de núcleos foi corada com 25 µL de solução de 1 mg/1mL de iodeto de propídeo.

Em cada amostra, pelo menos vinte mil núcleos foram analisados quanto à emissão de fluorescência, para quantificação relativa do DNA nuclear. Os histogramas

foram obtidos no citômetro Accuri C6 (Becton Dickinson) com o programa Cell Quest. As quantidades de DNA, em pictogramas (pg), foram obtidas por meio da equação: Quantidade de DNA (pg) = (posição do pico G1 da amostra/posição do pico G1 da referência) x DNA de referência (Dolezel *et al.*, 2007).

4.7. Experimento VI – Conservação *in vitro* de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* por imersão em óleo mineral (OM)

Para estes experimentos foram usadas microestacas contendo uma gema lateral com aproximadamente 1,0 cm de altura, provenientes de plantas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* cultivadas *in vitro*.

Primeiramente, inoculou-se uma estaca por tubo de ensaio (25 x 150 mm) contendo cerca de 10 mL de meio MS.

Esta etapa foi constituída de três tratamentos: tubos com óleo mineral (o óleo mineral, previamente autoclavado e resfriado, foi distribuído nos tubos por meio de micropipeta até cobrir completamente o explante); tubos de ensaio com água destilada (água destilada cobrindo os explantes) e tubos de ensaio apenas com o meio de cultura utilizados como controle.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por 10 repetições por tratamento, sendo cada parcela composta por 1 explantes. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 3 x 2, sendo 3 tratamentos (testemunha, água e OM) e duas espécies, *P. aduncum* e *P. hispidinervum*.

O material foi mantido em sala de crescimento com temperatura a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas. Após 30 e 180 dias de cultivo foi realizada avaliação da sobrevivência e transferência dos explantes para meio de crescimento de MS.

4.8. Análises estatísticas

Os dados observados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o procedimento ANOVA (para dados balanceados) dos recursos do software estatístico SIVAR 4.0 (Ferreira, 2000). As comparações de médias foram efetuadas utilizando-se o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento I – Estudo de germinação de Sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

5.1.1. Etapa I – Efeito de meios de cultura e condições de cultivo na germinação de sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

As sementes que apresentaram a emissão da radícula, conforme demonstrado na Figura 5, foram consideradas como germinadas.



Figura 5: Fase de emissão de radícula na germinação das sementes de *Piper*.

Aos 25 dias da incubação, com fotoperíodo de 16 horas, verificou-se que as sementes de *P. hispidinervum* apresentaram 100% de germinação em ambos os meios de cultura testados (MS e WPM). Entretanto, as sementes de *P. aduncum* apresentaram 84% de germinação em meio de MS e 81% de germinação quando inoculadas em meio de cultura WPM (Figura 6).

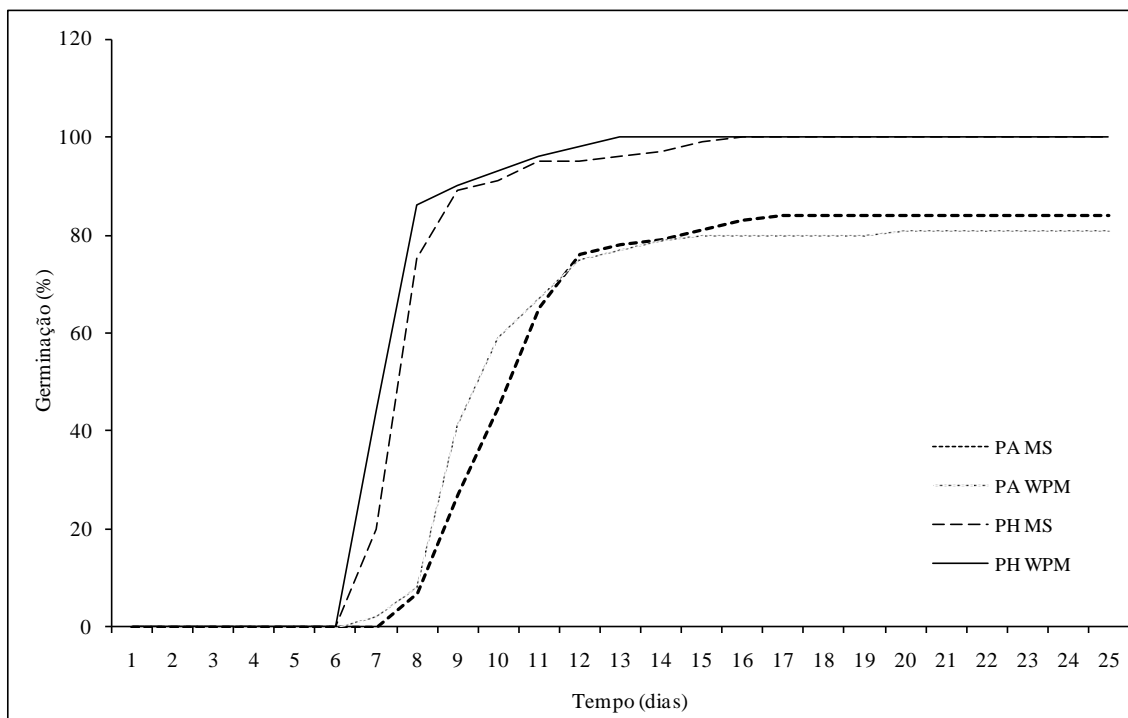


Figura 6: Germinação de sementes de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* sob dois meios de cultura (MS e WPM).

Os tempos médios de germinação (média do tempo necessário para o conjunto de sementes germinar) em *P. aduncum* e *P. hispidinervum* cultivadas em MS e WPM foram de 253,429 e 240,593 horas e de 202,320 e 190,320 horas, respectivamente. As velocidades médias de germinação foram de 3,94 h⁻¹ e 4,14 h⁻¹ em MS e WPM, respectivamente em *P. aduncum*, e em *P. hispidinervum* as velocidades médias foram de 4,94 h⁻¹ e 5,25 h⁻¹ para MS e WPM, respectivamente. As sementes cultivadas na ausência de luz não germinaram, em ambas as espécies e nos dois meios de cultura testados.

Os meios de cultura MS e WPM apresentaram resultados semelhantes na taxa germinação de sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, o que demonstra que ambos podem ser utilizados em estudos de germinação *in vitro*, em condições de 16 horas de fotoperíodo.

A resposta ao estímulo luminoso recebe o nome de fotoblastia. As sementes que germinam na presença de luz são classificadas como fotoblásticas positivas. As fotoblásticas negativas são as espécies que apresentam melhor germinação na ausência de luz. As fotoblásticas neutras germinam independentemente do regime de luz (Klein

& Felipe, 1991). No presente estudo, as sementes incubadas na ausência de luz não apresentaram sucesso na germinação para as espécies estudadas, independentemente do meio de cultura utilizado, o que caracteriza as sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* como fotoblásticas positivas.

5.1.2. Etapa II – Efeito da temperatura na germinação *in vitro* de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Os resultados da germinação nesta etapa demonstraram que as sementes de *P. hispidinervum* incubadas a 25 °C e 30 °C apresentaram respectivamente, uma taxa de germinação de 100% e 96%, tempos médios de germinação de 190,320 e 215,250 horas e velocidade de germinação de 5,25 h⁻¹ e 4,64 h⁻¹. As sementes de *P. aduncum* apresentaram uma taxa de germinação de 81% e 74% para 25 °C e 30 °C respectivamente, tempo médio de germinação de 240,593 e 333,081 horas e velocidade de germinação de 4,14 h⁻¹ e 3,00 h⁻¹ (Figura 7).

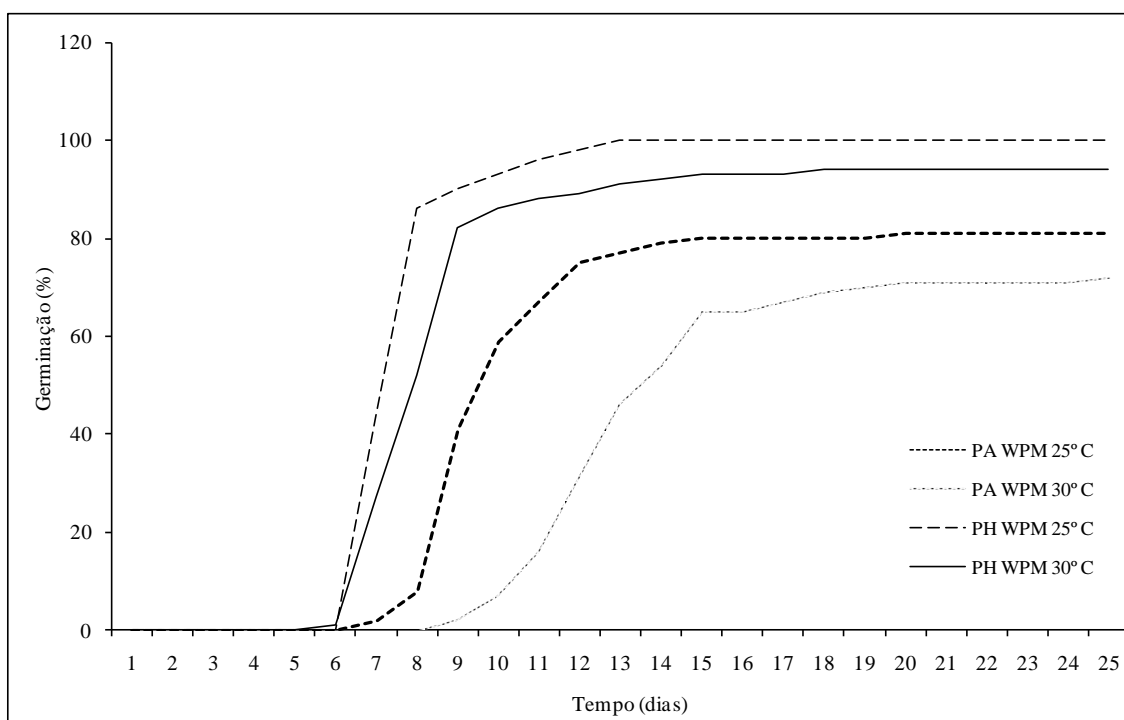


Figura 7: Germinação de sementes de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* sob duas condições de temperatura e meio de cultura WPM.

Em seu trabalho Bergo *et al.* (2010) também verificaram o índice de velocidade de germinação de sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, sob diferentes de temperatura, porém, usando como substrato papel filtro umedecido, constataram velocidade de germinação maior em *P. hispidinervum* com relação a *P. aduncum*. Na literatura não existe relatos de testes de germinação usando meios de cultura, para comparação de índice de velocidade.

De acordo com Mayer & Poljakoff-Mayer (1980) considera-se como temperatura ótima, aquela na qual a mais alta percentagem de germinação é alcançada dentro do menor espaço de tempo, o que ocorreu com as sementes incubadas a 25 °C em ambas as espécies. A temperatura de 25 °C também favoreceu a germinação de sementes de *P. aduncum* em estudo de Lobato *et al.* (2007).

A temperatura influencia a velocidade e a percentagem de germinação das sementes, modificando a velocidade das reações químicas que irão acionar o desdobramento, o transporte das reservas e a síntese de novas substâncias para a plântula (Bewley & Black, 1994). De maneira geral, temperaturas elevadas provocam diminuição do suprimento de aminoácidos livres, da síntese proteica e das reações anabólicas, podendo desnaturar proteínas e alterar a permeabilidade das membranas (Taiz & Zeiger, 2004). Ao contrário, temperaturas mais baixas, provocam atraso na germinação e no crescimento, devido à redução da atividade de enzimas envolvidas na respiração e no metabolismo (Marcos Filho, 2005).

5.2. Experimento II – Efeito das concentrações de sais dos meios de cultura MS e WPM na micropropagação de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Após 45 dias de cultivo, verificou-se que a espécie *P. aduncum* apresentou resultados superiores quanto ao número de gemas (3,8 gemas/brotação) e altura de brotação (4,13 cm) comparando-se à *P. hispidinervum* que apresentou 2,3 gemas/brotação e altura de 1,86 cm.

Verificou-se também efeitos significativos nas microestacas de *P. hispidinervum* quando estas foram cultivadas em meio de MS. Nestas condições, as brotações desenvolvidas apresentaram menor percentagem de formação de gemas e menor altura quando comparadas àquelas cultivadas em meio WPM, assim como observado em

relação às diferentes concentrações dos sais testadas, uma vez que os melhores resultados foram obtidos com concentrações salinas mais elevadas (Tabela 2).

O mesmo comportamento ocorreu com as microestacas de *P. aduncum* que apresentaram diferenças relevantes em altura e número de gemas, com relação ao tipo de meio de cultura e às concentrações salinas (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito de diferentes meios de cultura e concentrações salinas sobre o número de gemas e altura de brotações de *P. aduncum* (PA) e *P. hispidinervum* (PH), após 45 dias de cultivo

Tratamentos	Nº gemas		Altura (cm)		
	PA	PH	PA	PH	
MS	50% sais	4,2 aA	1,4 cB	4,02 aA	1,04 bB
	75% sais	4,0 aA	2,0 bB	4,54 aA	1,05 bB
	100% sais	3,0 bA	2,2 bB	3,16 bA	1,10 bB
WPM	50% sais	3,2 bA	2,2 bB	3,52 bA	1,64 bB
	75% sais	3,8 aA	2,8 aB	4,44 aA	2,76 aB
	100% sais	4,6 aA	3,2 aB	4,90 aA	3,46 aA
Média	3,8 A	2,3 B	4,13 A	1,86 B	

Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ao testar os meios de cultura MS e WPM, Silva *et al.* (2011) também verificaram que microestacas de *P. hispidinervum*, quando cultivadas em meio de MS, apresentaram menor percentagem na formação de gemas e menor média de altura quando comparadas àquelas cultivadas em meio WPM.

Uma das consequências da alteração na concentração de sais durante o processo da micropropagação é a vitrificação. Tal fenômeno pode ocorrer devido à maior concentração salina, principalmente a de nitrato de amônia. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), a redução da concentração da fonte de nitrogênio na forma amoniacal tem sido utilizada para reduzir a vitrificação. Contudo, em nenhuma das concentrações dos meios MS e WPM utilizadas neste estudo foi constatada esta anormalidade.

Plantas ou explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas e requerem meios nutritivos compostos por minerais, vitaminas, fontes de energia e

reguladores de crescimento. A composição do meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de células e tecidos, sendo que os meios de cultura podem ser modificados de acordo com a necessidade de cada tipo de explante e a espécie com a qual se esteja trabalhando (Villa *et al.*, 2010).

5.3. Experimento III – Efeito de concentrações de BAP e Cinetina na indução de multibrotação em microestacas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Para *P. aduncum* as diferentes concentrações dos reguladores BAP e Cinetina foram significativas, tanto para número de brotações como para altura das brotações (Tabela 3).

Os melhores resultados para número de brotações nos tratamentos com BAP foram observados naqueles com concentrações de 0,01; 0,05 e 0,1 mg.L⁻¹, que apresentaram um elevado número de multibrotações por explante. Quanto à altura dos brotos desenvolvidos nestes tratamentos, a maior percentagem do total de brotos formados não atingiram 1,5 cm, portanto classificados como C1 (Tabela 3).

Com o uso Cinetina, o melhor resultado para número de brotações foi obtido na concentração de 0,50 mg.L⁻¹, que proporcionou cerca 12,7 brotações (Figura 8 D). Nesta concentração, do número de brotações obtidas, 97% não atingiram altura superior a 1,5 cm (Tabela 3). Os brotos deste tratamento passaram por processo de alongamento e meio de MS e encontram-se em processo de aclimatização (Figuras 8 G, 8 H e 8 I).

Para a espécie *P. hispidinervum* as diferenças nas concentrações dos reguladores para formação de brotos e altura foram significativas apenas quando se utilizou BAP. Porém, não foi observado o desenvolvimento de elevado número de brotações em nenhuma das concentrações testadas. Os melhores resultados para formação de brotos, com o uso de BAP foram obtidos quando as microestacas foram cultivadas na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ (2,9 brotos) e 0,01 mg.L⁻¹ (1,7 brotos). Nestas concentrações cerca de 80% brotos desenvolvidos atingiram alturas de até 1,5 cm (Tabela 4). Na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ ocorreu formação de calos nas microestacas inoculadas (Figura 8 E)

Para *P. hispidinervum*, o uso de Cinetina não proporcionou multibrotações em nenhuma das concentrações testadas, porém, ocasionou maior ocorrência de formação de calos nas microestacas inoculadas, em menor ou maior intensidade. Os calos

formados apresentaram aspecto mais compacto, vitrificado, com maior tamanho, impedindo a formação de multibrotações (Figura 8 F). Com relação à altura a maioria dos brotos desenvolvidos foi classificada como C1, não atingindo 1,5 cm de altura (Figura 8 C).

Para as duas espécies, a ausência de ambos os reguladores demonstraram similaridade no desenvolvimento dos brotos e uma regularidade na altura, com 100% dos brotos com altura superior a 3 cm (figura 8 A). Também observou-se que quanto maior a concentração das citocininas menor foi a altura atingida pelos brotos desenvolvidos (Tabelas 3 e 4).

Vários trabalhos relatam que o BAP favorece o aumento da taxa de multiplicação, mas diminui o tamanho dos brotos obtidos. Chaves *et al.* (2005) relatam que obtiveram maior taxa de multiplicação em microestacas de *Physalis peruviana* quando cultivadas com 0,3 mg.L⁻¹ de BAP. Porém, estas brotações apresentaram menor comprimento da parte aérea quando comparadas com brotações cultivadas em meio isento desta citocinina. Os autores destacam que concentrações elevadas de BAP aumentam a taxa de proliferação, no entanto, o tamanho das brotações tende a diminuir. Silva *et al* (2012), ao desenvolverem um protocolo para micropropagação de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, constataram que o uso de BAP na concentração de 3,0 mg.L⁻¹, ocasionou multibrotações em ambas as espécies, porém, na grande maioria vitrificadas. Pescador *et al.* (2000), trabalhando com *P. hispidinervum*, encontraram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho ao cultivarem segmentos nodais em meio de cultura livre de regulador vegetal ou em meio contendo BAP.

Tabela 3. Cultivo de microestacas de *P. aduncum* em diferentes concentrações de BAP e Cinetina.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Nº de brotos			% de brotos C 1			% de brotos C 2			% de brotos C 3		
	Regulador			Regulador			Regulador			Regulador		
	BAP	CIN	Média	BAP	CIN	Média	BAP	CIN	Média	BAP	CIN	Média
0,00	1,0 bA	1,0 cA	1,0 c	0,0 cA	0,0 cA	0,0 e	0,0 bA	0,0 cA	0,0 c	100,0 aA	100,0 aA	100,0 a
0,01	3,0 aA	1,4 cA	2,2 c	41,3 bA	9,1 cB	25,2 d	26,1 aA	30,0 aA	28,1 a	28,4 bB	60,2 bA	44,6 b
0,05	5,3 aA	1,6 cB	3,4 b	83,2 aA	15,4 cB	49,3 c	8,8 bA	18,8 aA	13,8 b	5,0 cB	65,7 bA	35,3 b
0,10	4,2 aA	1,6 cB	2,9 b	98,5 aA	52,8 bB	75,6 b	1,5 bB	15,5 aA	8,4 c	0,0 cB	37,4 cA	18,7 c
0,50	1,2 bB	12,7 aA	7,0 a	100,0 aA	97,0 aA	98,5 a	0,0 bA	2,7 cA	1,4 c	0,0 cA	0,2 dA	0,1 d
1,00	1,0 bB	6,1 bA	3,5 b	100,0 aA	98,6 aA	99,3 a	0,0 bA	0,0 cA	0,0 c	0,0 cA	1,3 dA	0,6 d
2,00	1,1 bA	1,5 cA	1,3 c	100,0 aA	100,0 aA	100,0 a	0,0 bA	0,0 cA	0,0 c	0,0 cA	0,0 dA	0,0 d
Média	2,4 A	4,1 A		74,7 A	53,2 B		5,2 A	9,5 A		19,1 B	37,9 A	

* Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

* C1: brotos com até 1,5 cm; C2: acima de 1,5 até 3 cm e C3: altura superior a 3 cm.

Tabela 4. Cultivo de microestacas de *P. hispidinervum* em diferentes concentrações de BAP e Cinetina.

Concentração (mg.L ⁻¹)	Nº de brotos			% de brotos C 1			% de brotos C 2			% de brotos C 3		
	Regulador			Regulador			Regulador			Regulador		
	BAP	CIN	Média	BAP	CIN	Média	BAP	CIN	Média	BAP	CIN	Média
0,00	1,0 bA	1,0 aA	1,0 b	0,0 cA	0,0 cA	0,0 c	0,0 bA	0,0 bA	0,0 b	100,0 aA	100,0 aA	100,0 a
0,01	1,7 aA	1,2 aA	1,5 a	78,3 aA	48,3 bB	63,3 b	21,6 aA	34,2 aA	27,9 a	0,0 bB	17,3 bA	8,6 a
0,05	1,3 bA	1,1 aA	1,4 b	48,3 bB	79,3 aA	63,8 b	51,6 bA	3,4 bB	27,5 a	0,0 bB	17,3 bA	8,6 a
0,10	1,1 bA	1,0 aA	1,4 b	100,0 aA	81,0 aA	90,5 a	0,0 bA	0,0 bA	0,0 b	0,0 bB	19,0 bA	9,5 a
0,50	1,2 bA	1,1 aA	1,4 b	100,0 aA	57,1 bB	78,5 a	0,0 bB	42,8 aA	21,4 a	0,0 bA	0,0 cA	0,0 a
1,00	2,9 aA	1,0 aB	1,5 a	88,3 aA	95,0 aA	61,6 b	6,6 bA	5,0 bA	5,8 b	5,0 bA	0,0 cA	2,5 a
2,00	1,1 bA	1,1 aA	1,4 b	100,0 aA	100,0 aA	100 a	0,0 bA	0,0 bA	0,0 b	0,0 bA	0,0 cA	0,0 a
Média	1,4 A	1,1 B		73,5 A	65,8 A		11,4 A	12,2 A		15,0 A	21,9 A	

* Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

* C1: brotos com até 1,5 cm; C2: acima de 1,5 até 3 cm; e C3: altura superior a 3 cm.

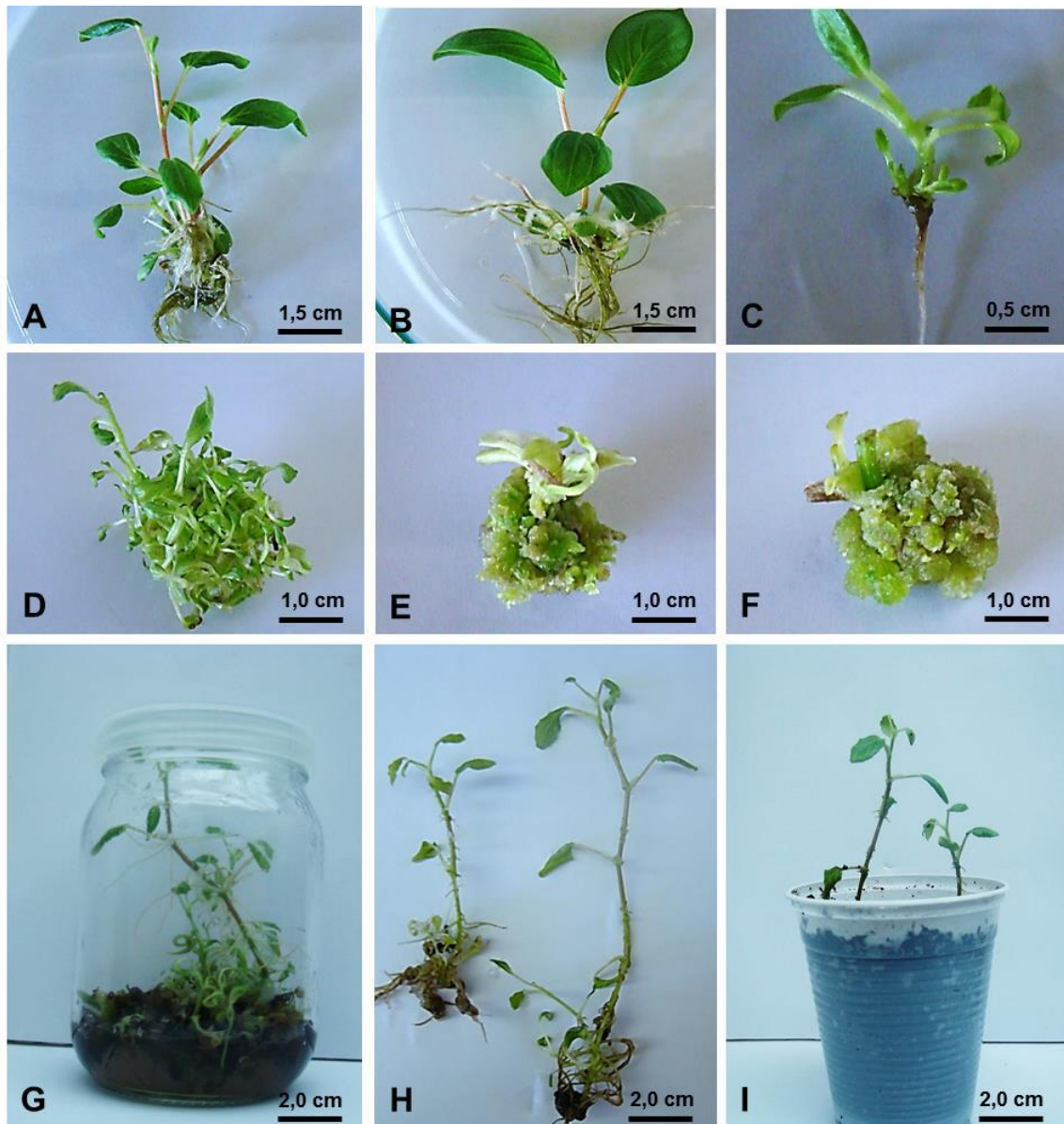


Figura 8. Desenvolvimento de microestacas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* em diferentes concentrações de citocininas e processo de alongamento dos brotos de *P. aduncum* provenientes do tratamento com $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cinetina. A. broto de *P. aduncum* classificação C3 (superior a 3 cm), B. broto de *P. aduncum* classificação C2 (acima de 1,5 até 3 cm), C. broto de *P. hispidinervum* classificação C1 (até 1,5 cm), D. multibrotações em *P. aduncum* em tratamento com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cinetina, E. aspecto de calo desenvolvido nas estacas de *P. hispidinervum* nos tratamentos com $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, F. aspecto de calo desenvolvido nas microestacas de *P. hispidinervum* nos tratamentos com Cinetina, G. brotos de *P. aduncum* em processo de alongamento, H. plantas de *P. aduncum* em processo de transferência para aclimatização, I. plantas de *P. aduncum* em processo de aclimatização.

5.4. Experimento IV – Calogênese e embriogênese somática em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

5.4.1. Etapa I – Indução de calos primários em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Após 60 dias de cultivo, verificou-se diferenças na formação de calos primários. O tratamento T4 (5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP) foi o que apresentou os melhores resultados na indução de calos em *P. aduncum*, com 88% de formação de calos. Para *P. hispidinervum* os melhores resultados foram obtidos nos tratamentos T3 e T4, ambos com 32% de formação de calos (Tabela 5).

Tabela 5. Formação de calos, em relação ao tempo e aos tratamentos utilizados para indução de calos em *P. aduncum* (PA) e *P. hispidinervum* (PH)

Tratamento	Tempo de incubação				Média
	30 dias		60 dias		
	PA	PH	PA	PH	
T0: 0 mg.L ⁻¹ de ANA + 0 mg.L ⁻¹ de BAP	0,0 bA	0,0 cA	0,0 dA	0,0 cA	0,0 d
T1: 5 mg.L ⁻¹ de ANA + 0 mg.L ⁻¹ de BAP	0,0 bA	0,0 cA	0,0 dA	0,0 cA	0,0 d
T2: 10 mg.L ⁻¹ de ANA + 0 mg.L ⁻¹ de BAP	0,0 bA	0,0 cA	0,0 dA	0,0 cA	0,0 d
T3: 0 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L ⁻¹ de BAP	0,0 bA	4,0 bA	60,0 bA	32,0 aB	24,0 b
T4: 5 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L ⁻¹ de BAP	32,0 aA	12,0 aA	88,0 aA	32,0 aB	41,0 a
T5: 10 mg.L ⁻¹ de ANA + 2,5mg.L ⁻¹ de BAP	0,0 bA	12,0 aA	24,0 cA	12,0 bA	12,0 c
Média (tem*esp)	5,3 A	4,3 A	28,6 A	12,6 B	
Média (temp)	5,0 B		20,6 A		

* Médias seguidas pela mesma letra (maiúscula para comparação horizontal e minúscula para vertical), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Com relação ao uso de BAP e ANA observou-se que estes reguladores foram eficazes na indução da calogênese primária nas duas espécies estudadas (Figuras 9 A e 9 B).

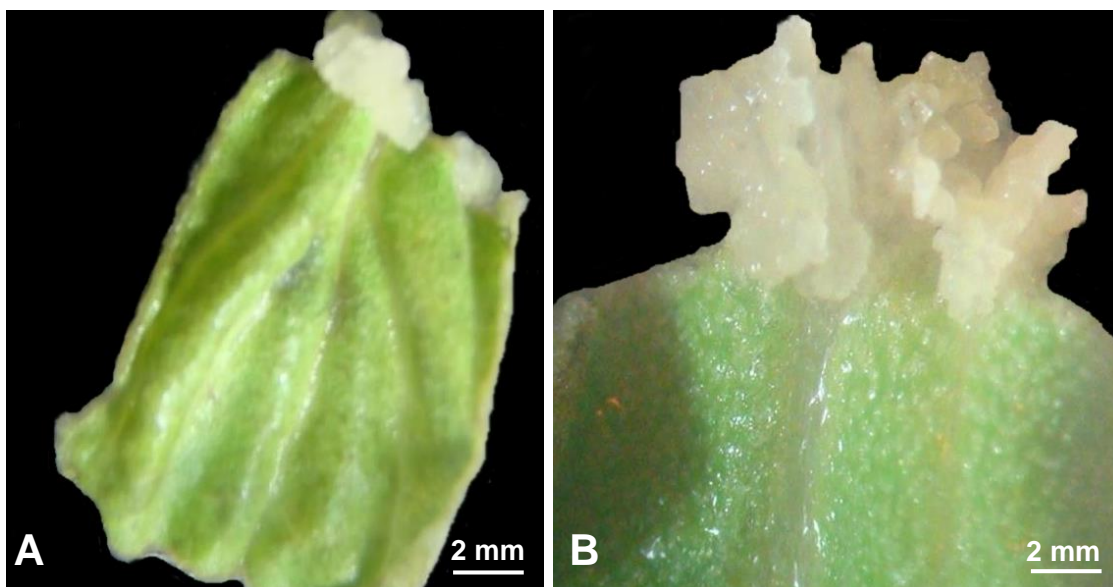


Figura 9. Calos desenvolvidos após 60 dias de cultivo no tratamento T4 (5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP). A. explante de *P. aduncum* (Barra 2 mm), B. explante de *P. hispidinervum*.

Costa *et al.* (2008) ao testarem a influência de auxinas (ANA, AIA, AIB e 2,4-D) na indução de calos primários em explantes foliares e entrenós de *P. hispidinervum*, constataram que a adição de auxina ANA nas concentrações de 2,5 e 5 mg.L⁻¹, possibilitou maior indução de calos e que o tipo de explante usado (foliar) teve forte influência sobre esta variável.

Com a finalidade de produzir moléculas biologicamente ativas Pereira *et al.* (2000) avaliaram a indução de calos em explantes foliares de *P. aduncum*, combinando diferentes concentrações de ANA e BAP, obtendo um êxito de 100% de formação de calos na combinação de 4,4 µM de BAP + 5,4 µM de ANA.

Trabalhos realizados com outras espécies também mostram a eficácia dos fitorreguladores ANA e BAP na indução de calos. Cerqueira (1999) obteve maior indução de calo em segmentos foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* Linn.) utilizando 2,0 mg.L⁻¹ de ANA combinado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, obtendo 100% da área do explante coberta por calo, assim como, Landa *et al.* (1999) que ao estudarem a indução de calos em segmentos foliares de plantas jovens de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) obtiveram resultados que indicaram que o uso de 5,37mM ANA + 1,1mM BAP + 500 mg.L⁻¹ de extrato de malte proporcionou a maior média de peso de matéria fresca de calos.

5.4.2. Etapa II – Indução de calos embriogênicos e embriões somáticos em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Os calos primários obtidos em meio de indução T4 (5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP), foram transferidos para o meio de cultura T5 (10 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5mg.L⁻¹ de BAP). Após 15 dias de incubação no escuro, verificou-se o início de oxidação dos calos e, sobre eles, a formação de calos embriogênicos. Cerca de 30 dias após o surgimento dos calos embriogênicos, começou a formação dos primeiros embriões somáticos (Figuras 10 A e 10 B).

A partir deste ensaio pode-se verificar que o tratamento com 10 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5mg.L⁻¹ de BAP foi eficaz na diferenciação dos calos primários em calos embriogênicos e na formação de embriões somáticos.

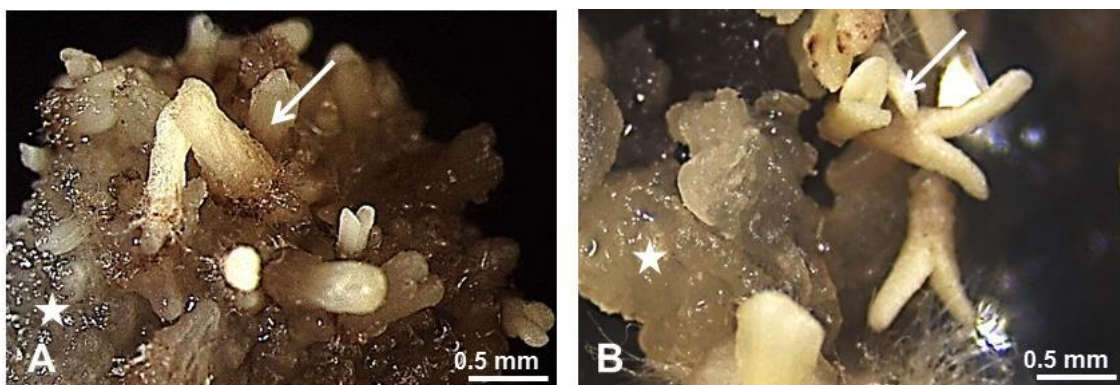


Figura 10. Aspecto dos embriões somáticos diferenciados sobre calos embriogênicos, após 45 dias da transferência do tratamento T4 (5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP) para o T5 (10 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5mg.L⁻¹ de BAP). A. *Piper aduncum*, B. *Piper hispidinervum*. Setas brancas apontam embriões somáticos, estrelas mostram regiões de calos embriogênicos.

Com relação à embriogênese somática, especificamente em espécies do gênero *Piper*, alguns autores relatam sucesso na obtenção de embriões somáticos; porém, utilizando-se outras auxinas para de indução da embriogênese. Joseph *et al.* (1996) obtiveram sucesso na formação de calos embriogênicos em *Piper nigrum* por meio da utilização de diferentes concentração de 2,4-D. Em outro estudo, Yusuf *et al.* (2001) conseguiram induzir a formação de calos embriogênicos em explantes foliares de *Piper colubrinum* utilizando também 2,4-D. Não existem relatos de êxito na indução de calos embriogênicos e diferenciação de embriões somáticos em explantes *P. aduncum* e *P. hispidinervum*.

5.4.3. Etapa III – Caracterização morfológica e diferenciação dos calos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Após 45 dias de cultivo dos explantes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* no escuro em tratamento com 5 mg.L^{-1} de ANA + $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, iniciou-se a formação dos calos primários nas regiões dos cortes localizados na altura da nervura central e ramificações vasculares (Figuras 11 A e 11 B). O calo primário caracteriza-se pelo formato nodular desuniforme, apresentando aspecto friável e coloração branca.

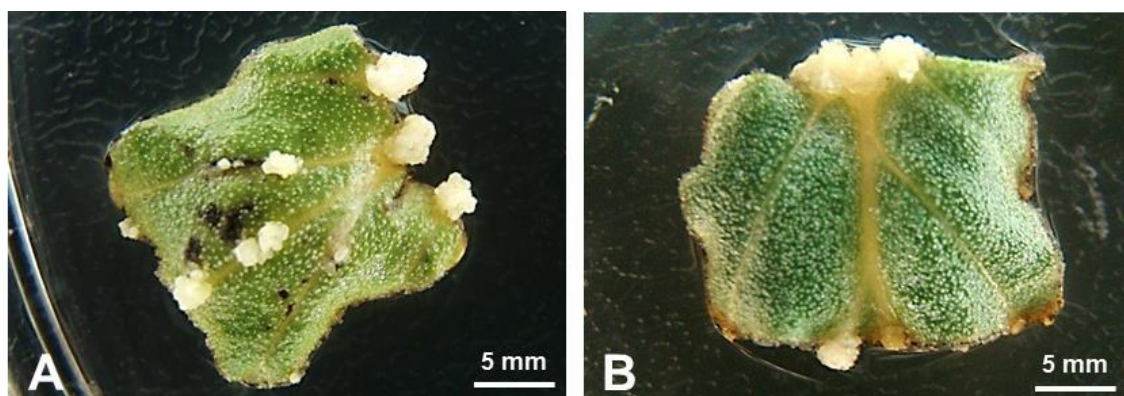


Figura 11. Formação dos calos primários após 45 dias em meio de cultura contendo 5 mg.L^{-1} de ANA + $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. A. *Piper aduncum*, B. *Piper hispidinervum*.

Os calos embriogênicos iniciaram suas formações 15 dias após a transferência dos calos primários para o tratamento com 10 mg.L^{-1} de ANA + $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP no escuro. Estes calos possuíam aspecto variável de translúcido a hialino, com formatos mais uniformes, podendo ser granulares ou em mórula (Figuras 12 A e 12 B).

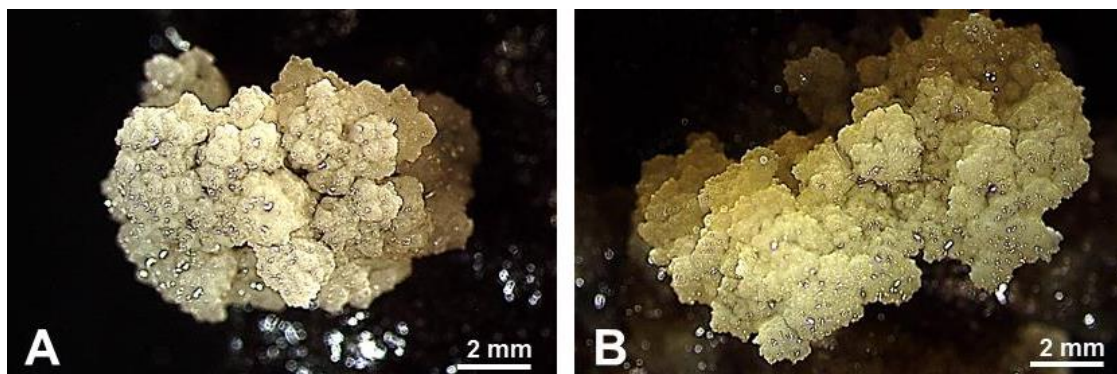


Figura 12. Aspecto da formação de calos embriogênicos em meio de cultura suplementado com 10 mg.L^{-1} de ANA + $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP. A. *Piper aduncum*, B. *Piper hispidinervum*.

Após 30 dias de permanência do material no tratamento com 10 mg.L^{-1} de ANA + $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP, surgiram os primeiros embriões somáticos. Estes embriões apresentaram desenvolvimento assincrônico com estádios variando de globular a cotiledonar, de coloração branca e aspecto denso e opaco, podendo ou não desenvolver tricomas (Figuras 13 A e 13 B).

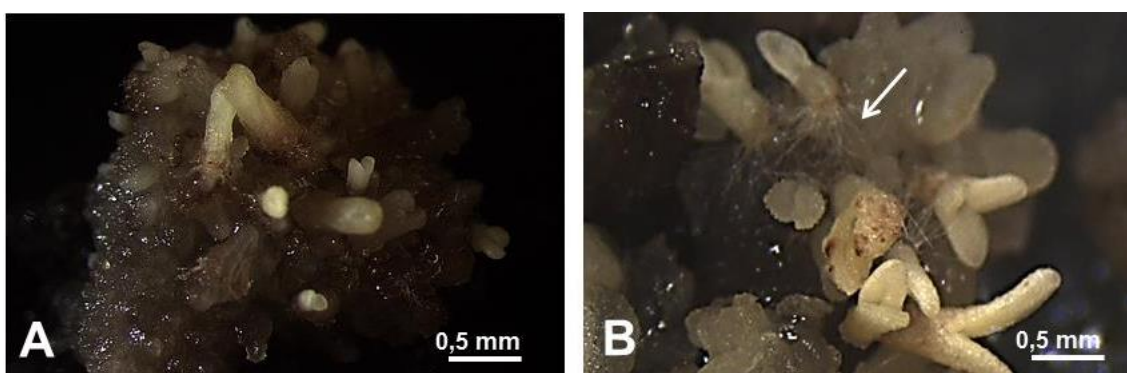


Figura 13. Detalhes de embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento. A. *Piper aduncum*, B. *Piper hispidinervum*. Seta indicando formação de tricomas na base do embrião.

A caracterização morfológica no processo da embriogênese somática é de fundamental importância no que diz respeito à identificação e diferenciação das fases de desenvolvimento celular compreendida da indução do calo primário até mesmo às fases de desenvolvimento do embrião somático. Sondahl *et al.* (1979) induziram a diferenciação de calos primários e embriogênicos de *Coffea arabica* cv. Bourbon e por meio de microscopia eletrônica de varredura caracterizaram os calos primários como constituídos de células alongadas e o tecido embriogênico formado por células esféricas e pequenas. Shoemaker *et al.* (1986) ao caracterizarem a embriogênese somática em *Gossypium hirsutum*, descrevem o calo primário como uma massa de células friáveis e sem atividade citoplasmática, e o calo embriogênico como uma massa hialina compacta, apresentando denso conteúdo citoplasmático. Ainda neste estudo identificaram os estádios globular e cordiforme dos embriões somáticos. Chen *et al.* (1988), em estudo de manutenção de plantas de cana-de-açúcar regeneradas de calos, caracterizam os calos

primários como massa mucilaginosa, os calos embriogênicos como células claras e globulares com tricomas e o embrião somático como projeções tubulares.

Os embriões somáticos só puderam ser definidos como tais, após a transferência dos mesmos para os meios de cultura com sais e vitaminas de MS livre de reguladores de crescimento e acrescentados de 30 g.L⁻¹ de sacarose, o que ocasionou na regeneração dos embriões somáticos em plantas, primeiramente com o surgimento de uma raiz axial apresentando região de coifa e zona pilífera, seguida do desenvolvimento da parte aérea (Figura 18 e 19).

5.4.4. Etapa IV – Estudos anatômicos da calogênese e da embriogênese somática em *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

5.4.4.1. Explante foliar e calo primário

A figura 14 mostra os cortes anatômicos em perspectiva transversal dos explantes foliares de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, nas regiões de intersecção do calo primário em estágio avançado de formação (cerca de 30 dias). Os explantes foliares em questão foram provenientes de folhas jovens inoculadas em meio de cultura com sais de MS adicionado de 5 mg.L⁻¹ de ANA + 2,5 mg.L⁻¹ de BAP.

Esta análise permitiu verificar em ambas as espécies a presença de epiderme múltipla na face adaxial (Figuras 14 A e 14 B). O mesofilo é dorsiventral, apresentando de uma a duas camadas de parênquima lacunoso e paliçádico (Figuras 14 A e 14 B)

O calo primário (Figuras 14 A e 14 B) aparece disposto sobre a face adaxial em ambas as espécies, porém não há como afirmar a origem da proliferação celular.

Baseado na teoria de que o procâmbio é um tecido meristemático responsável pela formação de tecidos vasculares e do câmbio, acredita-se que a formação de calo esteja intimamente relacionada a este meristema. Porém, eventualmente, pode ocorrer desdiferenciação parenquimática, embora a origem da maioria dos calos ocorra predominantemente, a partir de células procambiais. (Apezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2006).

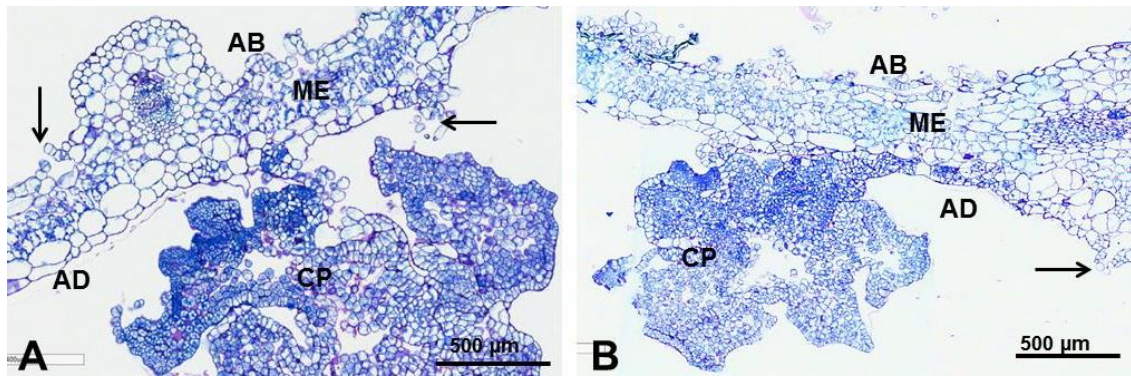


Figura 14. Corte transversal de folhas em regiões de intersecção de calos primários. A. *P. hispidinervum*, B. *P. aduncum*. AD= face adaxial, AB= face abaxial, ME= mesofilo, CP= calo primário, Seta indicando estômatos.

Nos cortes histológicos, foram observadas células parenquimáticas grandes, com 39 a 48 µm de diâmetro, vacuoladas, algumas das quais estavam em processo de dediferenciação evidenciado por meio de indícios de mitose (Figura 15). Os espaços intercelulares são reduzidos e a parede celular é mais espessa do que nas células dos demais tipos de calos, tendo cerca de 3,1 µm de espessura nas paredes de duas células contíguas. No bordo do calo primário, as células são menores, apresentam divisão celular, parede celular espessa, núcleo evidente e citoplasma denso (Figuras 15 A e 15 B).

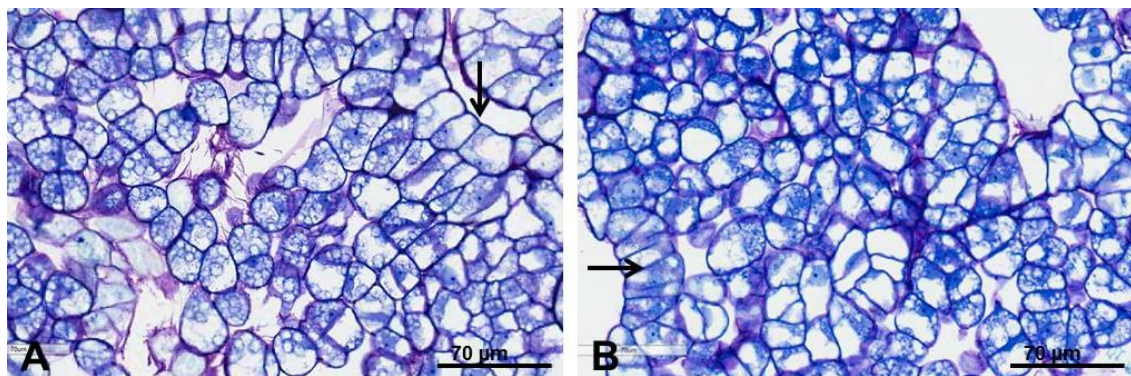


Figura 15. Corte histológico de calos primários. A. calos primários originados em folhas de *Piper aduncum*, B. *Piper hispidinervum*. Setas indicando os bordos dos calos.

5.4.4.2. Calos embriogênicos

Nas secções anatômicas foram observadas regiões meristemáticas com células pequenas, com 15 a 25 µm de diâmetro, isodiamétricas, com citoplasma denso, paredes celulares mais estreitas, com aproximadamente 0,9 µm e núcleo evidente. Várias células apresentaram dois núcleos num mesmo citoplasma, evidenciando a citocinese ainda não concluída no processo de divisão celular. Em algumas regiões, constatou-se o início da linearização das células, o que sugere a organização celular envolvida no processo de formação de embriões (Figuras 16 A e 16 B).

Características semelhantes foram observadas por Pádua *et al.* (2010), com calos embriogênicos de *Coffea arabica* variedade ‘Catiguá’ e por Nogueira *et al.* (2007) na análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de *Byrsonima intermedia*. Tomes (1985), utilizando ANA para a indução dos calos embriogênicos de *Carya illinoensis*, também verificou nestes calos uma morfologia celular isodiamétrica. Segundo Appezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro (2006), tal formato é característico de células meristemáticas.

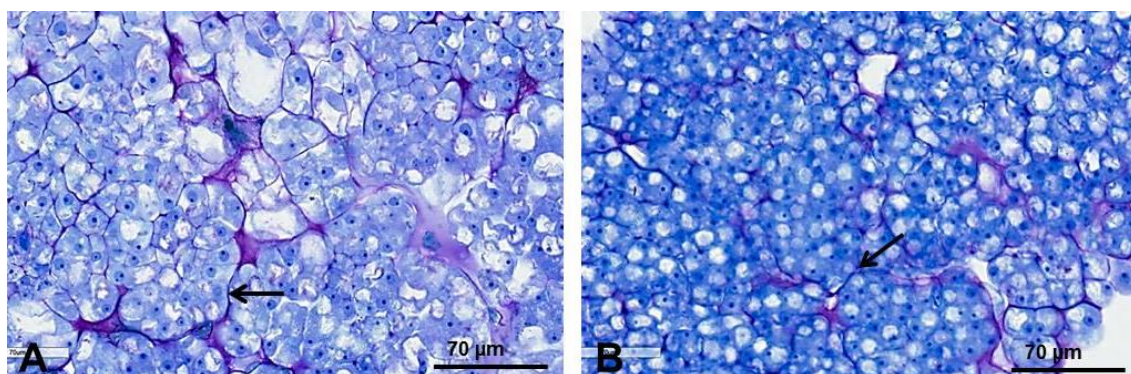


Figura 16. Corte histológico de calos embriogênicos. A. calos embriogênicos originados em folhas de *P. aduncum*, B. *P. hispidinervum*. Setas indicando processo de linearização de células.

5.4.4.3. Embriões somáticos

A Figura 17 ilustra anatomicamente embriões somáticos no estágio cotiledonar produzidos em processo assincrônico com o mesmo período de tempo de cultivo dos embriões somáticos citados anteriormente na caracterização morfológica (30 dias).

Nas Figuras 17 A e 17 B, compondo a protoderme, foram identificadas células externas, justapostas, com núcleo evidente, apresentando formato tabular. Abaixo destas, foram observadas algumas camadas de células com núcleo evidente e com diâmetro maior,

que caracterizam um meristema fundamental. No centro há uma região vascular com células alongadas e núcleo evidente, que compõem o procâmbio, algumas mais internas têm parede mais espessas e constituem os elementos de vaso. Constituindo a camada basal dos embriões, nota-se a formação do ápice radicular, uma camada de células que se mostram com núcleo evidente e formato isodiamétrico, sendo menores do que as células do interior do embrião (Figuras 17 A e 17B).

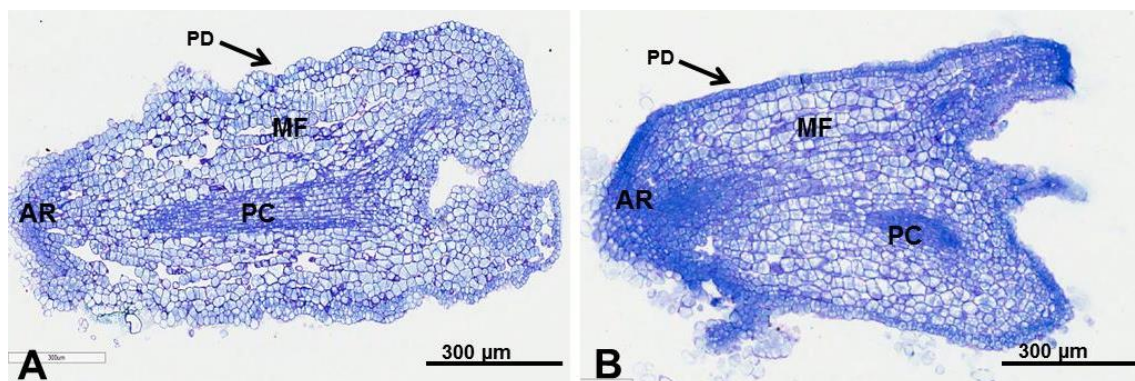


Figura 17. Corte histológico de embriões somáticos em estágio cotiledonar. A. *P. aduncum*, B. *P. hispidinervum*. PD= protoderme, MF= meristema fundamental, PC= procâmbio, AR= ápice radicular.

5.4.5. Etapa V – Regeneração dos embriões somáticos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*

Após 15 dias de inoculação em meio de cultura com sais e vitaminas de MS desprovido de reguladores, os embriões somáticos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* começaram a se desenvolver (Figuras 18 A e 19 A). Inicialmente ocorreu o surgimento de uma raiz axial apresentando área de zona pilífera e coifa (Figura 18 B e 19 B), seguido do desenvolvimento da parte aérea (Figura 19 C e 20 C).

Após 45 dias de cultivo em meio de crescimento, as plantas já apresentavam raiz e partes aéreas bem desenvolvidas (Figura 18 D e 19 D). A partir deste estágio, as plantas foram retiradas das placas de *Petri* e transferidas para frascos com capacidade de 250 ml para melhor crescimento da planta. Algumas plantas de *P. aduncum* apresentaram desenvolvimento de calo sobre os tecidos (Figura 18 D). Isto ocorreu provavelmente devido a resíduos de reguladores de crescimento acumulados sobre os tecidos do embrião somático durante a diferenciação.

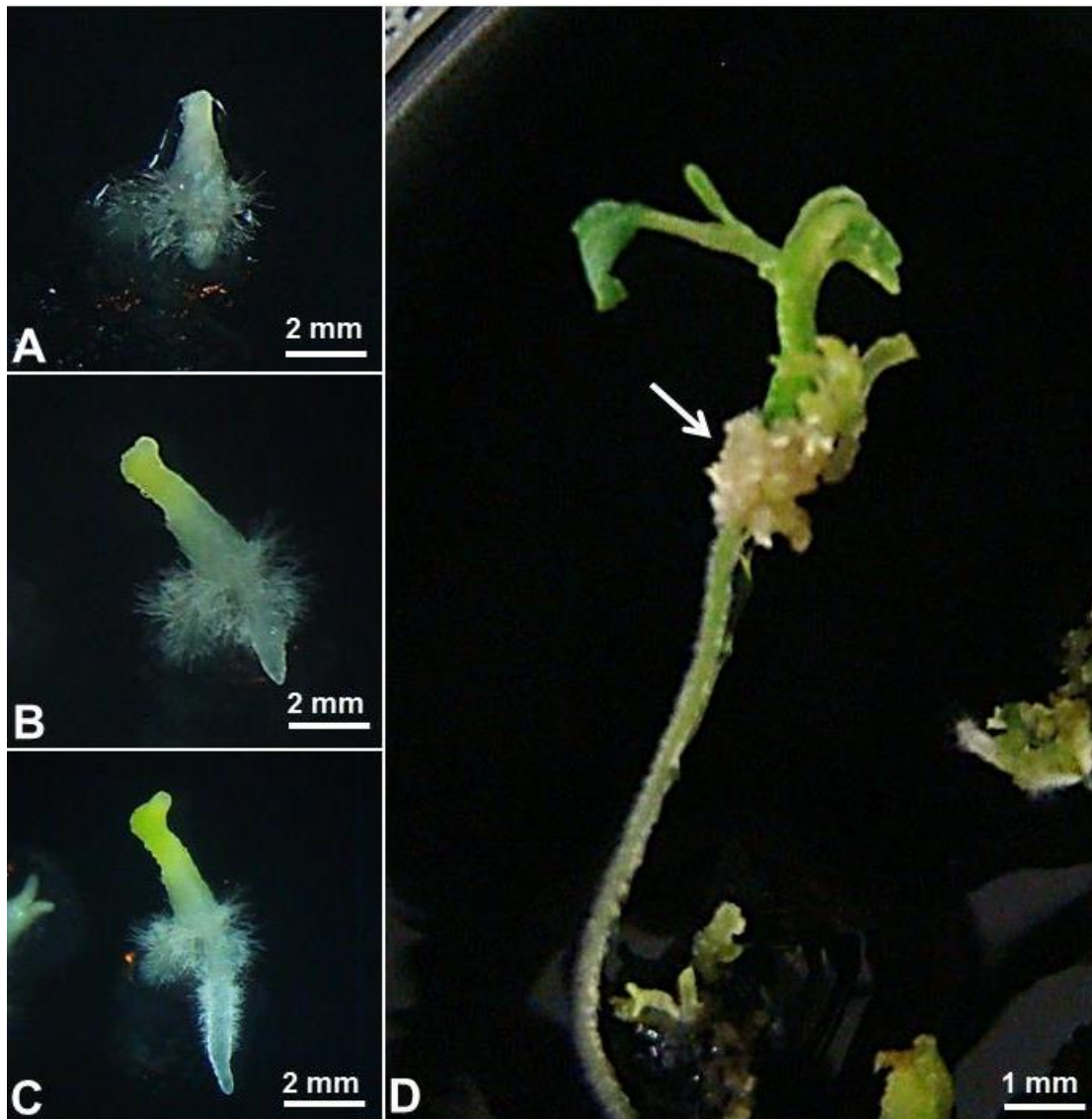


Figura 18. Estádios de regeneração dos embriões de *P. aduncum*. A. embrião somático recém-inoculado, B. início da regeneração com surgimento do ápice radicular e início do desenvolvimento da parte aérea, C. desenvolvimento da parte aérea e surgimento da zone pilífera, após 15 dias de cultivo, D. planta completa apresentando raiz e parte aérea bem desenvolvidas. Seta indicando área de formação de calo.

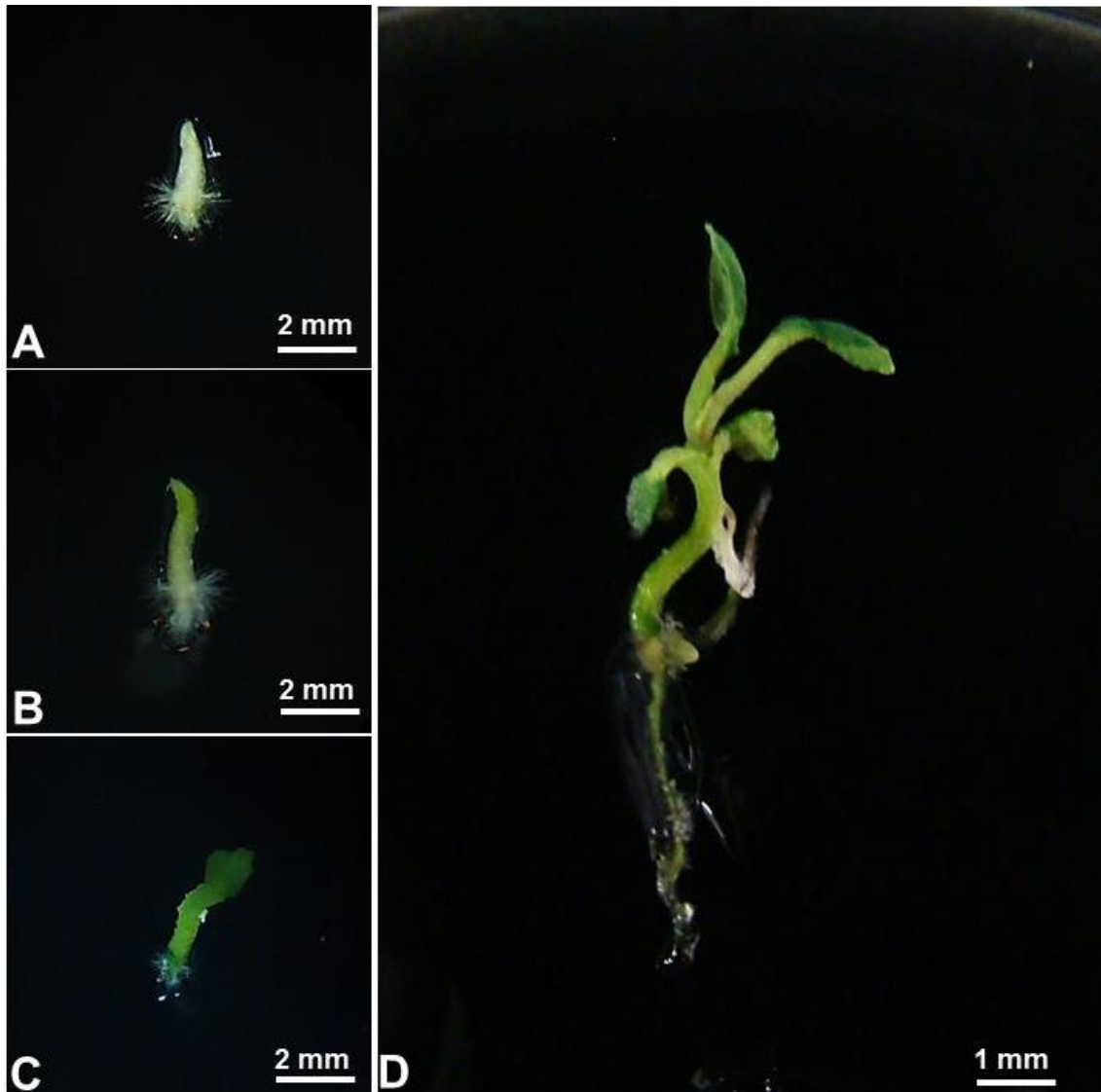


Figura 19. Estádios da regeneração dos embriões somáticos de *P. hispidinervum*. A. embrião somático recém-inoculado, B. início da regeneração com surgimento do ápice radicular e início do desenvolvimento da parte aérea, C. desenvolvimento da parte aérea e surgimento da zona pilífera após, 15 dias de cultivo D. planta completa apresentando raiz e parte aérea bem desenvolvidas.

5.4.6. Etapa VI – Aclimatização das plantas regeneradas de *P. hispidinervum*

Após 50 dias (a contar do início da regeneração), as plantas de *P. hispidinervum* já apresentavam vigor e condições adequadas, tais como, sistema radicular bem desenvolvido e espessura do caule e desenvolvimento de gemas laterais ideais para fase

de aclimatização para adaptação às condições de umidade e temperatura pós-cultivo *in vitro* (Figura 20).



Figura 20. Plantas regeneradas por embriogênese somática de *P.hispidinervum* em fase de aclimatização em estufa incubadora.

As plantas transferidas para casa de vegetação, previamente aclimatizadas em estufa incubadora, apresentaram uma taxa de 100% de sobrevivência e ainda continuam em processo de acompanhamento do crescimento em casa de vegetação (Figura 21).



Figura 21. Plantas de *P. hispidinervum* obtidas por embriogênese somática, em condições de casa de vegetação.

5.5. Análise da fidelidade genômica por citometria de fluxo em plantas regeneradas de *P. hispidinervum*

A análise de folhas jovens de *P. hispidinervum* resultou em picos G1 de DNA afilados, o que indicam boa qualidade de dados e, como consequência, alta confiabilidade dos resultados apresentados. Histogramas representativos das análises podem ser visualizados na Figura 22.

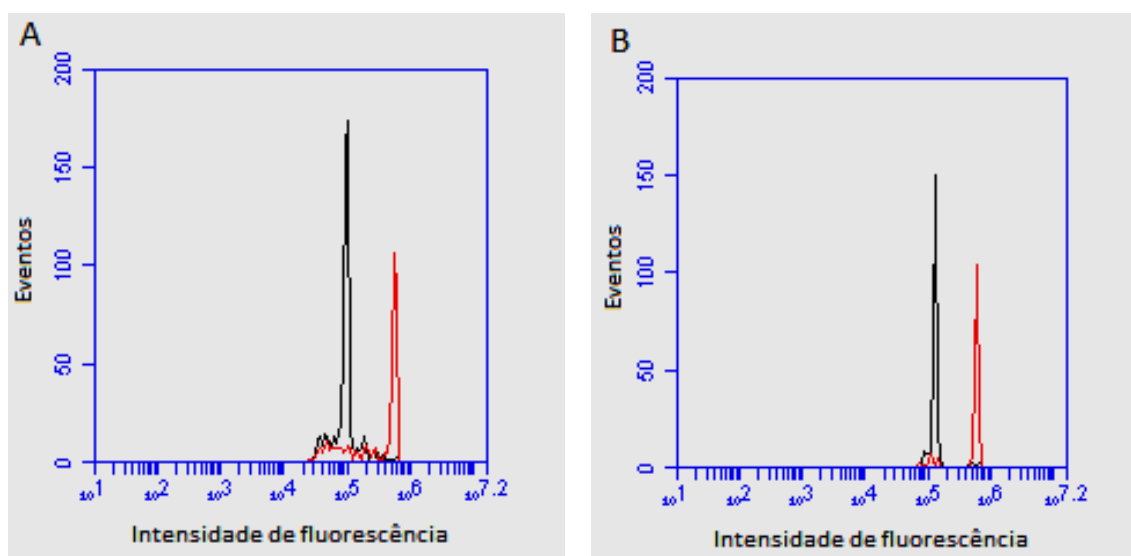


Figura 22. Histogramas relativos à análise por citometria de fluxo da quantidade de DNA em *P. hispidinervum*. O primeiro pico corresponde a *Piper* e o segundo pico corresponde ao padrão de referência ervilha. A. plantas regeneradas via embriogênese somática, B. plantas cultivadas em casa-de-vegetação.

Em relação especificamente ao tamanho do genoma de plantas de *P. hispidinervum* provenientes de embriogênese somática e as de casa de vegetação, observou-se em média o conteúdo estimado de, $1,8329 \pm 0,02$ pg e $1,8666 \pm 0,05$ pg respectivamente. Os resultados indicaram que o tamanho do genoma entre as plantas testadas não diferiram significativamente pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 6).

A quantificação de DNA para espécies de *Piper* já havia sido realizada por Samuel *et al* (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). De acordo com os autores, as espécies silvestres tendem a ter maior quantidade de DNA que as espécies cultivadas. Contudo, até o presente momento, não há relatos na literatura de quantificação de DNA nuclear em *Piper* por meio da técnica de citometria de fluxo.

Tabela 6. Conteúdo de DNA relativo (pg) entre plantas *in vitro* derivadas da embriogênese somática e plantas cultivadas em casa de vegetação de *Piper hispidinervum*.

Plantas	Média do pico	Conteúdo de DNA nuclear (pg/2C)	Genoma 1C (Mpb)	CV(%)
Emb. Somática	126,19 ^x	1,8329 ± 0,02 a ^y	891,88 ^z	4,7 ^v
Casa-de-vegetação	123,32	1,8666 ± 0,05 a	912,76	4,6

^x Calculado a partir da média do pico G0/G1 de *P. hispidinervum* em relação ao padrão de referência externo *Pisum sativum*. ^y Médias seguidas por mesma letra, pertencem ao mesmo grupo, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ^z Média do tamanho do genoma 1C, onde 1 pg DNA = 978 Mpb (Dolezel *et al.*, 2003). ^v Média do coeficiente de variação do pico G0/G1

Atualmente, a citometria de fluxo tem sido utilizada para fazer distinção entre regenerantes obtidos pelas diferentes técnicas de cultivo *in vitro*. Nenhuma variação no conteúdo de DNA foi encontrada em plantas de *Olea* sp., *Passiflora* spp. e *Lathyrus* spp. regeneradas e propagadas *in vitro* (Brito *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Ochatt *et al.*, 2013).

Porém, há relatos de diferenças significativas na quantidade de DNA entre plantas cultivadas em campo e de embriogênese somática, como relatado por Acanda *et al.* (2013) que obtiveram coeficiente de variação de 5,6% na quantidade de DNA de videira (*Vitis vinifera* L. cv. Mencía) obtidas de embriogênese somática.

Vários autores têm demonstrado a importância dos coeficientes de variação dos picos G1 para boas estimativas da quantidade de DNA, em trabalhos com citometria de fluxo. Marie & Brown (1993) propuseram coeficientes de variação de 1 a 2%, para resultados de alta qualidade, e em torno de 3%, para resultados de rotina. Galbraith *et al.* (2002) definiram o valor de 5% para os coeficientes de variação, como critério de aceitação das estimativas de quantidade de DNA.

Os coeficientes de variação observados neste trabalho ficaram inferiores a 5% para as plantas obtidas por embriogênese somática. Esses resultados são importantes, uma vez que gera confiabilidade nas estimativas de quantidade de DNA obtidas, o que leva à conclusão sobre a não existência de instabilidade genômica nas plantas obtidas por embriogênese somática.

5.6. Experimento VI – Conservação *in vitro* de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* por imersão em óleo mineral (OM)

Após 30 dias, as microestacas de *P. aduncum* submersas em óleo mineral (OM) apresentaram 100% de sobrevivência e, aquelas que foram submersas em água alcançaram 50% de sobrevivência. Em *P. hispidinervum*, o tratamento com óleo mineral (OM) respondeu com uma taxa de 80% de sobrevivência das estacas e 30% no tratamento com água (Figura 23).

Em ambos os casos, foram consideradas como microestacas vivas, aquelas que apresentaram os mesmos aspectos mantidos desde o momento da inoculação, tais como: coloração verde e ausência de oxidação (Figuras 24 A e 24B). As estacas consideradas mortas foram aquelas que perderam a coloração verde e oxidaram totalmente (Figura 25 C). Para ambas as espécies a tratamento testemunha (cultivo somente em meio de cultura) respondeu com 100% de sobrevivência e desenvolvimento das estacas inoculadas (Figura 24 D).

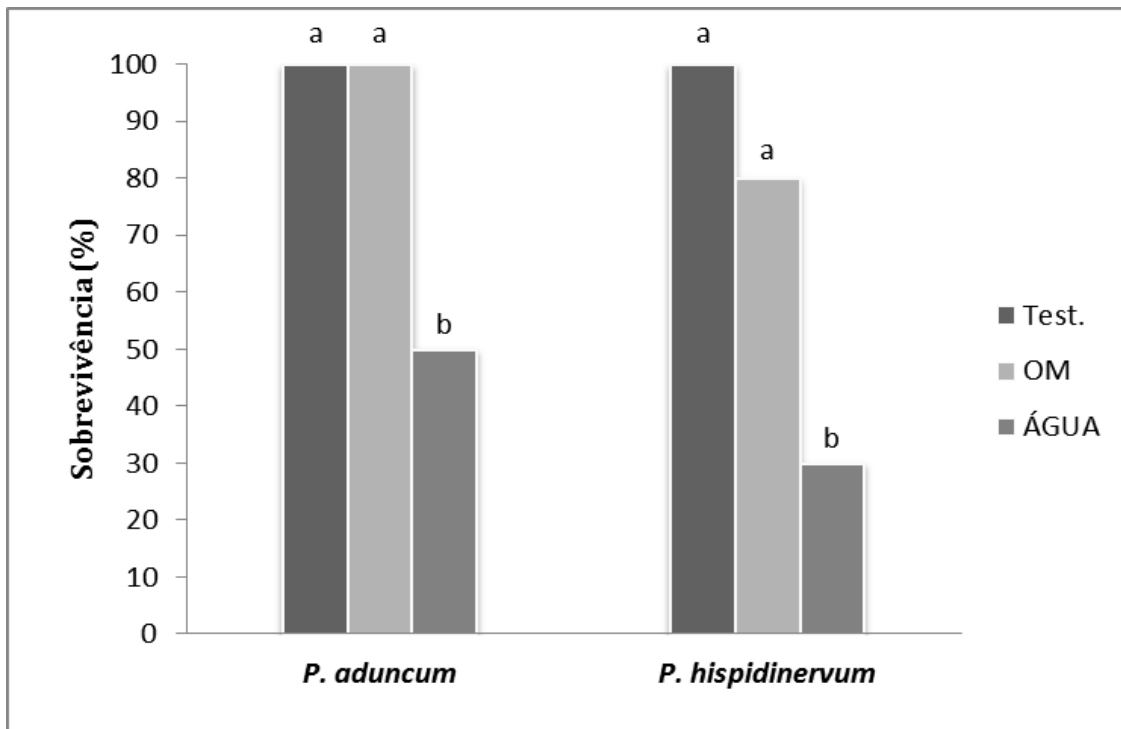


Figura 23: Sobrevivência (%) de microestacas de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* em ensaio de conservação em óleo mineral (OM), água e em tratamento controle (MS), 30 dias após a inoculação.

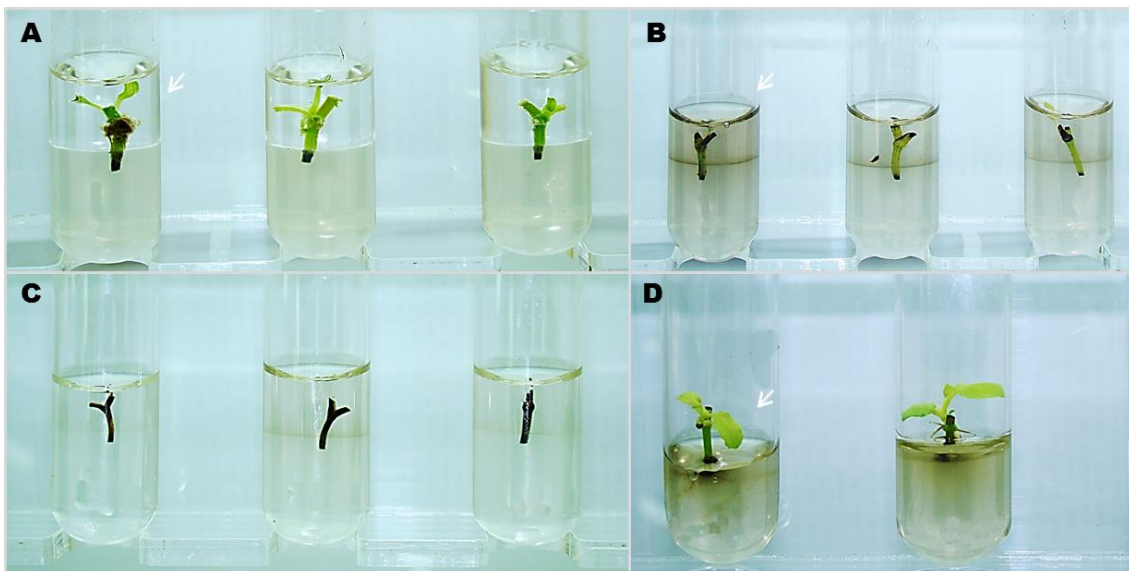


Figura 24. Aspecto das microestacas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* após 30 dias de cultivo. A. explantes conservados por meio de imersão em óleo mineral (OM), B. explantes conservados em água considerados vivos, C. explantes conservados em água considerados mortos, D. testemunhas vivas em processo de desenvolvimento. Seta branca: *P. hispidinervum*

A fim de se verificar o desenvolvimento das microestacas sobreviventes na etapa de 30 dias, foi realizada a transferência para meio de crescimento com sais e nutrientes de MS. Apenas estacas de *P. aduncum* apresentaram sobrevivência e desenvolvimento de parte aérea. As plantas sobreviventes do tratamento em OM (Figura 25 B) foram retiradas da condição *in vitro* e aclimatizadas para posterior teste de sobrevivência em campo (Figura 25 C). As estacas de *P. hispidinervum* não apresentaram desenvolvimento no meio de crescimento.

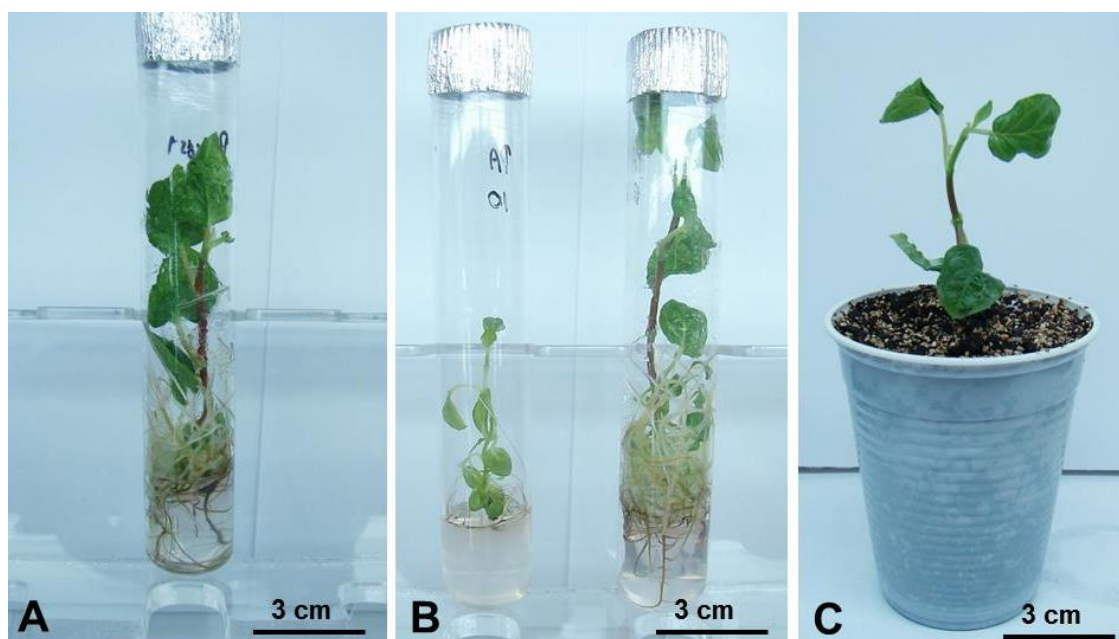


Figura 25. Plantas de *Piper aduncum* regeneradas provenientes do tratamento de conservação em OM. A. testemunha, B. plantas regeneradas após tratamento de conservação em óleo mineral (OM), C. planta regenerada do tratamento de conservação em óleo mineral (OM) em condições de aclimatização.

As taxas de sobrevivência após 180 dias de cultivo apresentaram diferenças significativas entre as duas espécies (Figura 26). As microestacas de *P. aduncum* submersas em óleo mineral (OM) tiveram 40% de sobrevivência (Figura 27 A), o que não diferenciou significativamente com relação à testemunha (Figura 27 B). Já aquelas que foram submersas em água não sobreviveram. Em *P. hispidinervum* a taxa de sobrevivência das estacas foi 0% para o tratamento com óleo mineral (OM) e água (Figura 27 C).

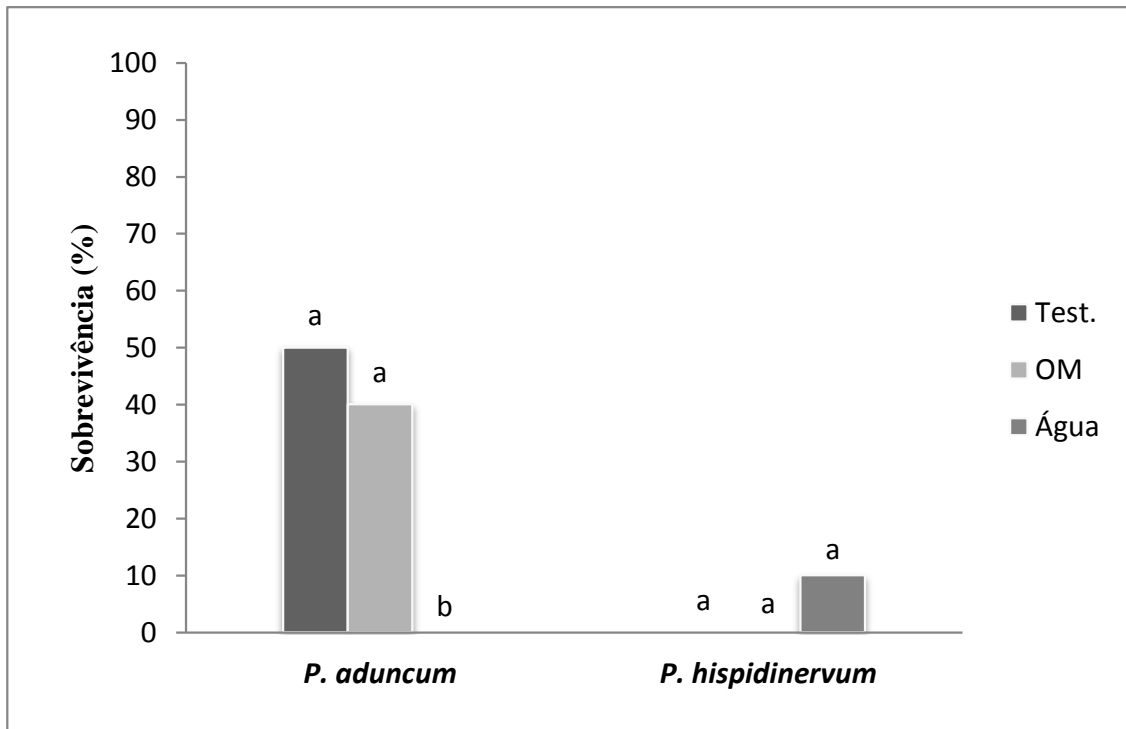


Figura 26: Taxa de sobrevivência (%) de microestacas de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* em ensaio de conservação em óleo mineral (OM), água e em tratamento controle (MS), 180 dias após a inoculação.

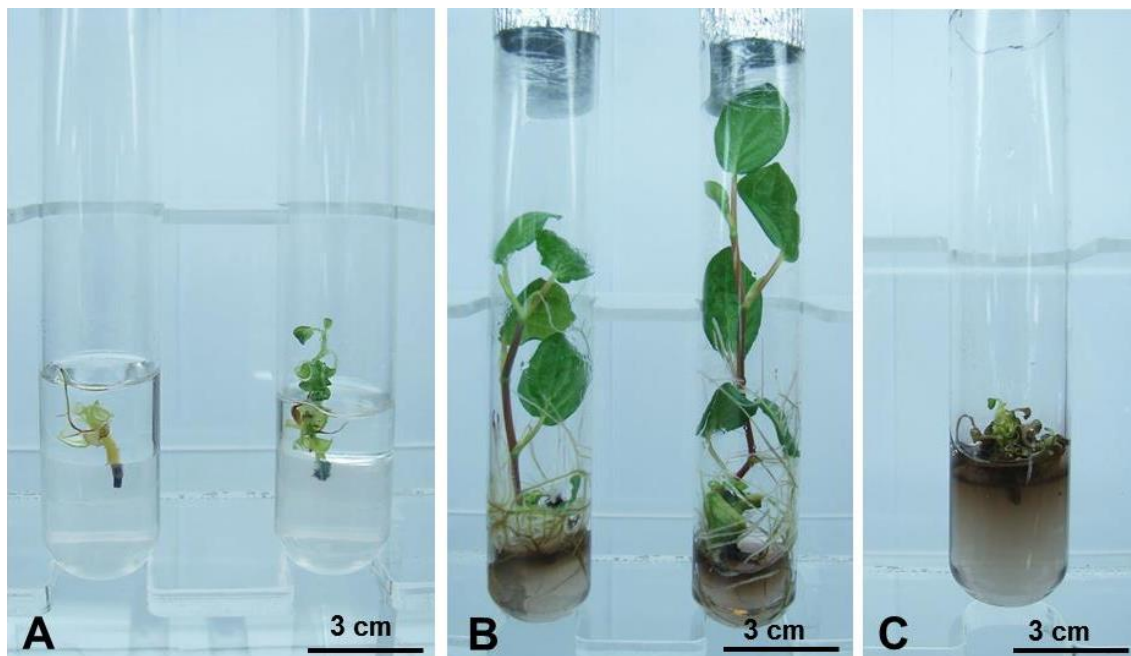


Figura 27. Aspecto das microestacas sobreviventes após 180 dias de cultivo. A. explantes de *Piper aduncum* em óleo mineral (OM), B. Testemunhas de *Piper aduncum*, C. explante de *Piper hispidinervum* conservado em água.

Caplin (1959), pela primeira vez, e posteriormente Augereau *et al.* (1986) relataram o armazenamento de tecidos vegetais em óleo mineral (OM) como uma das mais bem sucedidas técnicas alternativas ao armazenamento criogênico e com baixo custo-benefício para os laboratórios, e sem a necessidade de quaisquer equipamentos sofisticados (Engelmann, 1997). Assim vários métodos pelos quais o crescimento lento pode ser induzido, a redução do nível de oxigênio em culturas de (OM) tem sido defendida por ser um método simples e de baixo custo especialmente para espécies tropicais (Mannonen *et al.* 1990).

Sharma *et al.* (2012) desenvolveram um protocolo de crescimento lento para conservação a médio prazo com imersão em óleo mineral (MO). Utilizando segmentos nodais de *Bacopa monnieri* conseguiram manter o subcultivo neste tratamento de 6 a 24 meses e as plantas regeneradas nesse meio de conservação foram estabelecidas em campo com sucesso.

Baseado nos resultados obtidos neste estudo foi possível verificar que *P. aduncum* é mais apta à conservação a médio prazo por imersão em óleo mineral (MO) que *P. Hispidinervum*. Porém são necessários mais estudos a fim de se ajustar alguns parâmetros, tais como, quantidade de óleo e tamanho da microestaca, para que se possa prolongar o tempo de conservação do material vegetal.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram chegar às conclusões descritas a seguir:

- As sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* apresentam taxas de germinação semelhantes quando inoculados em meios de cultura com sais de MS ou WPM;
- A temperatura de 25 °C é ideal para germinação de sementes de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, pois é a que proporciona a mais alta percentagem de germinação dentro do menor espaço de tempo para ambas as espécies de *Piper* estudadas;
- As concentrações dos sais nos meios de MS e WPM podem influenciar diretamente no processo de micropropagação de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* por microestaquia, no que diz respeito à altura e número de gemas;
- O uso das citocininas BAP (0,01; 0,05 e 0,1 mg.L⁻¹) e Cinetina (0,50 mg.L⁻¹) é eficaz no processo de multibrotações, principalmente em *P. aduncum*, auxiliando na obtenção de número elevado de mudas no processo de micropropagação;
- A combinação de ANA e BAP nas respectivas concentrações de 5 mg.L⁻¹ e 2,5 mg.L⁻¹ adicionados no meio de cultura, foi a melhor na indução de calos primários em explantes foliares de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*;
- A elevação da concentração de ANA de 5 mg.L⁻¹ para 10 mg.L⁻¹ durante a manutenção dos calos primário promove a diferenciação dos calos primários em calos embriogênicos e em embriões somáticos;
- Morfologicamente os calos primários de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* caracterizam-se pelo formato nodular desuniforme, apresentando aspecto friável na cor branca. Os calos embriogênicos possuem aspecto que pode variar de translúcido a hialino, com formatos mais uniformes, podendo ser granulares ou em mórula. Os embriões somáticos apresentam desenvolvimento assíncrono, com estádios que podem variar de globular a cotiledonar com coloração branca e aspecto denso e opaco, podendo ou não desenvolver tricomas;

- Anatomicamente os calos primários de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* apresentam células parenquimáticas grandes, vacuoladas, espaços intercelulares reduzidos e paredes celulares mais espessas. Os calos embriogênicos apresentam regiões meristemáticas com células pequenas, isodiamétricas, com citoplasma denso, paredes celulares mais estreitas e núcleo evidente. Os embriões somáticos apresentam apenas um conjunto de células uniestratificadas compondo protoderme, camadas celulares com núcleo evidente e diâmetro maior formando o meristema fundamental e células alongadas com núcleo evidente compondo o procâmbio;
- Os embriões somáticos de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* podem se regenerar facilmente em meio de cultura com sais e vitaminas de MS, mas assim como ocorre na germinação das sementes a regeneração só ocorre sobre condições de luz;
- As plantas regeneradas de *Piper hispidinervum* não apresentam dificuldades de adaptação às condições de temperatura e umidade durante o processo de aclimatização;
- O conteúdo médio estimado de DNA de *P. hispidinervum* provenientes de embriogênese somática e de casa de vegetação ($1,8329 \pm 0,02$ pg e $1,8666 \pm 0,05$ pg) com coeficiente de variação abaixo de 5% leva à conclusão sobre a não existência de instabilidade genômica nas plantas obtidas por embriogênese somática;
- A conservação em óleo Mineral (MO) é uma técnica capaz de conservar microestacas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* a médio prazo e, *P. aduncum* é mais apta a este tipo de conservação.
- É necessário a realização de mais testes de conservação utilizando óleo mineral (OM) a fim de se ajustar alguns parâmetros, tais como, quantidade de óleo e tamanho da estaca, para que se possa prolongar o tempo de conservação do material vegetal de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACANDA, Y.; PRADO, M. J.; GONZÁLEZ, M. V.; REY, M. Somatic embryogenesis from stamen filaments in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Mencía): changes in ploidy level and nuclear DNA content. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v.49, p.276-284, 2013.

AHMED, O.; CHOKRI, B.; NOUREDDINE, D.; MOHAMED, M.; MOKHTAR, T. Regeneration and molecular analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plantlets using RAPD markers. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.5, p.813-820, 2009.

ALMEIDA, M. C. **Banco de sementes e simulação de clareiras na germinação de pimentalonga (*Piper hispidinervum* C. DC.)**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade Federal do Acre. Rio Branco. 1999.

ALMEIDA, F. A. C.; GOLDFARB, A. C.; GOUVEIA, J. P. G. Avaliação de extratos vegetais e métodos de aplicação no controle de *Sitophilus spp.* **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.1, n.1, p.13-20, 1999.

ALMEIDA, R. R. P.; SOUTO, R. N. P.; BASTOS, C. N.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S. Chemical variation in *Piper aduncum* and biological properties of its dillapiol-rich essential oil. **Chemistry & Biodiversity**, v.6, n.9, p.1427-1434, 2009.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia Vegetal**. Viçosa - Editora UFV, p.438, 2006.

ARAÚJO, L. G.; PRABHU, A. S. Progresso da brusone nas folhas e características agronômicas nas gerações avançadas de somaclones aromáticos da cultivar de arroz IAC 47. **Fitopatol. bras.**, v.26, n.3, p.603-613, 2001.

AUGEREAU, J.M.; COURTOIS, D.; PETIARD, V. Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil overlayer. **Plant Cell Reports**, v.5, n.5, p.372-376, 1986.

BANDONI, A. L.; Czepak, M. P.; Os recursos vegetais aromáticos no Brasil:: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. 1. ed. Vitória: Edufes, 2008.

BARBIERI, R.L. Conservação e uso de recursos genéticos vegetais. In: FREITAS, L.B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

BARBOSA, N. M. L.; CUNHA, A. P.; REINHARDT, D. H.; BARROS, P. G.; SANTOS, A. N. L. Indução de alterações morfológicas e anatômicas em folhas de abacaxizeiro ‘pérola’ pelo ácido 2-(3-clorofenoxi) propiônico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v.25, n.3, p.386-389, 2003.

BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.5, p.555-557. 2004.

BERGO, C. L.; SILVA, R. C.; OHLSON, O. C.; BIASI, L. A.; PANOBIANCO, M. Luz e temperatura na germinação de sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) e pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*). **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.3, p.170-176, 2010.

BERKEET, S. A. *In vitro* preservation of *Asparagus officinalis*. **Biologia Plantarum**, v.43, n.2, p.179-183, 2000.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2.ed. New York: Plenum Press, p. 445, 1994.

BRITO, G.; LOPES, T.; LOUREIRO, J.; RODRIGUEZ, E.; SANTOS, C. Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers. **Trees**, v.24, n.4, p.23–732, 2010.

BUTENKO, R. G.; SHEMINA, Z. B.; FROLOVA, L. V. Induced organogenesis and characteristics of plants produced in tobacco tissue culture. **Genetika**, v.3, p.29-39, 1967.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimatização de plantas: abordagens recentes. Brasília: Embrapa-CNPq, (**ABCTP notícias**, 25), p.12, 1996.

CAPLIN, S. M. Mineral oil overlay for conservation of plant tissue cultures. **American Journal of Botany**. p.324-329, 1959.

CERQUEIRA, E. S. **Propagação e calogênese *in vitro* em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.), uma planta medicinal**. 81 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

CHAN, J. L., SAÉNZ, L., TALAVERA, C.; HORNING, R., ROBERT, M. and OROPEZA, C. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**. p.515–521, 1998.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.6, p.1281-1287, 2005.

CHEN, W. H.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; COCKING, E. C. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. **Journal of experimental botany**, v.39, n.2, p.251-261, 1988.

COSTA, F. H. S.; LOUREIRO, T. S.; PEREIRA, J. E. S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência e Agronegócio**, v.39, n.2, p.269-274, 2008.

DALPONTE, F.; VALLE, J. A. B.; VALLE, R. C. S. C. Uso de adsorventes de compostos fenólicos e diferentes explantes na produção de massa celular. **Revista Dynamis**, v.15, n.2, p.12-17, 2009.

DIAS, L.A.S.; KAGEYAMA, P.Y. Variação genética em espécies arbóreas e conseqüências para o melhoramento florestal. **Agrotropica**, v.3, n.3, p.119-127, 1982.

DOLEZEL, J.; BARTOS J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. **Cytometry**, n.51, p.127–128, 2003.

DOLEZEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. Alemanha, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2007.

EHRENDORFER, F. Adaptive significance of major taxonomic characters and morphological trends in angiosperms. In: HEYWOOD, V.H. (Ed.). **Taxonomy and ecology**. London: Academic Press, p.317-327, 1973.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.112, p.9-18, 1997.

EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; MEDINA-FILHO, H. P. Somaclonal and gametoclonal variation. **American Journal Botanical**, v.71, n.6, p.759-774, 1984.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. 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**, v.31, n.1, p.113-120, 2007.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L., CATANI, V.; LIMA, M. S. D.; ALÉCIO, M. R. Toxicidade do óleo de *Piper aduncum* L. a adultos de *Ceratomyia tingomarianus* Bechyne (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.3, p.485-489, 2005.

FERREIRA, D. F.; Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. **Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria**, São Carlos, v.45, p.255-258, 2000.

FERREIRA, G.F.; BORGHETTI, F. Germinação do Básico ao Aplicado. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2004.

FERREIRA, M. E. Melhoramento genético de arroz: impactos da genômica. In: A.,B., GIUDICE, M. & SEDIYAMA, T. (Eds.) *Melhoramento genômico*. Viçosa - MG, Editora Universidade Federal de Viçosa. p. 73-129, 2003.

FIGUEIREDO, C. J. J.; SILVA, M. H. S.; CARVALHEIRO, B. C.; PEREIRA, W. M. A.; CHAVES, A. L. F. Utilização de técnicas operacionais para otimização dos processos de corte e colheita de *Piper aduncum* L. **Ingepro**, v. 2, n.3, p.37-45, 2010.

FIGUEIREDO, C. J.; SILVA, M. H. L.; MOREIRO, F. C. Aplicação de redes neurais artificiais em processo de destilação de óleo essencial. **Engevista**, v15, n.1, p.36-42, 2012.

GALBRAITH, D.W.; LAMBERT, G.; MACAS, J.; DOLEZEL, J. Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. In: ROBINSON, J.; AZMI, A.; TUTOIS, S. (Ed.). *Current Protocols in Cytometry*. New York: John Wiley, 365p, 2002.

GONÇALVES, S.; ROMANO, A. *In vitro* minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum*. **Biologia Plantarum**, v.51, n.4, p.795-798, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Embrapa-SPI/CNPH, Brasília, v.1, p.183-260, 1998.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Apostila de biotecnologia. Florianópolis, SC. **CCA/UFSC**, p.41, 2006.

HEYWOOD, V.H. **Flowering Plants of the World**. Oxford University Press. London p. 38-40. 1979.

HOYT, E. Conservação dos parentes silvestres das plantas cultivadas. Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana, 1992.

ISLAM, M. D. T.; LEUNUFNA, E.; DEMBELE, D.P.; KELLER, E. R. J. *In vitro* Conservation of Four mint (*Mentha* spp.) Accessions. *Plant Tissue Culture*, Dhaka, v.13, n.1, p.37-46, 2003.

JARAMILLO, M.A. & MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, v.88, n.4, p.706-716, 2001.

JIMÉNEZ, V. M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. **Plant Growth Regulation**, v.47, p.91-110, 2005.

JOSEPH, B.; JOSEPH, D.; PHILIP, V. J. Plant regeneration from somatic embryos in black pepper. **Plant cell, tissue and organ culture**, v.47, n.1, p.87-90, 1996.

KLEIN, A.; FELIPPE, G. M. Efeito da luz na germinação de sementes de ervas invasoras. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.26, n.7, p.955-966, 1991.

KONAN, K.E.; DURANT-GASSELIN, T.; KOUADIO, Y.J.; FLORI, A.; RIVAL, A.; DUVAL, Y.; PANNETIER, C. *In vitro* conservation of oil palm somatic embryo for 20 years on a hormone-free culture medium: characteristics of the embryogenic cultures, derived plantlets and adult palms. **Plant Cell Reports**, v.29, n.1, p.1-13, 2010.

LANDA, F. D. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O.; & BUENO-FILHO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). 120 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras. 1999.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal Variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v.60, p.197-214, 1981.

LEMOS, E. E. P. de; FERREIRA, M. de S.; ALENCAR, L. M. C. de; RAMALHO NETO, C. E.; Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.10, p.1359-1364, 2002.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; MELO, B. A.; RODRIGUES, V. G.; GUIMARÃES, P. L. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**, Manaus, v.39, n.2, p.377-382, 2009.

LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot- tip culture. **International Plant Propagators' Society Combined Proceedings of Annual**, v. 30, p. 421-427, 1980.

LOBATO, A. K. S.; SANTOS, D. G. C.; CASTRO, D. S.; TORRES, G. I. O. P. S.; NETO, C. F. O.; SILVA, M. H. L. Avaliação dos Efeitos da Temperatura e da Restrição Hídrica sobre a Germinação de Sementes de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.297-299, 2007.

LOBATO, A. K. S.; SANTOS, D. G. C.; OLIVEIRA, F. C.; GOUVEA, D. D. S.; TORRES, G. I. O. S.; LIMA JÚNIOR, J. A.; NETO, C. F. O.; SILVA, M. H. L. 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**, v.5, n.2, p.915-917, 2007.

LOUREIRO, J.; SANTOS, C. Aplicação da citometria de fluxo ao estudo do genoma vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, p.18-29, 2002.

LOYOLA-VARGAS V. M.; FUENTES-CERDA C. F. J.; MONFORTE-GONZÁLEZ M.; MÉNDEZ-ZEEL M.; ROJAS-HERRERA R.; MIJANGOS-CORTES J. Coffee tissue culture as a new model for the study of somaclonal variation. In: 18th **International Scientific Colloquium on Coffee**. ASIC, Helsinki. p.302-307, 1999.

MADON, M.; CLYDE, M. M.; HASHIM, H.; MOHD YOSUF, J.; MAT, H.; SARATHA, S. Polyploidy induction of oil palm through colchicine and oryzalin treatments. **Journal of Oil Palm Research**, v.17, p.110-123, 2005.

MANNONEN, L.; TOIVONEN, L.; KAUPPIENEN, V. Effects of long-term preservation on growth and productivity of *Panax ginseng* and *Catharanthus roseus* cell cultures. **Plant Cell Reports**, v.9, n.4, p.173-177, 1990.

MARCOS FILHO, J. **Germinação de sementes**. 1º Semana de atualização em produção de sementes. Piracicaba: FEALQ, p.11-39, 1986.

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

MAYER, A.M., POLJAKOFF-MAYBER, A. The germination of seeds. New York: The McMillan Company, 1980.

MERKLE, S. A.; PARROTT, W. A.; FLINN, B. S. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: THORPE, T.A. (Ed.). *In vitro* embryogenesis in plants. **Dordrecht: Kluwer Academics**, p.155-203, 1995.

MICHAUX-FERRIÈRE N.; CARRON M. P. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: The importance of the timing of subculturing. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.19, p.243-256, 1996.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Diversidade Brasileira**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. acessado em: 28.abr.2013.

MIRANDA, E. M. Caracterização e avaliação produtiva de uma população nativa de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) no seringal cachoeira. **Acta Amazonica**, v.32, n.1, p.9-20, 2002.

MOREL, G. Producing vírus-free cymbidiums. **America Orchid Society Bulletin**, v.44, p.623-627, 1960.

MOURA, E. F.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; JÚNIOR SÁ, A. Q.; CARVALHO, M. Somatic embryogenesis in macaw palm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. **Scientia Horticulturae**, v.119, p.447-454, 2009.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 25, p.135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NASSAR, A. H. Slow Growth Storage of Encapsulated Germoplasm of *Coffea Arabica* L. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.5, n.4, p. 517-520, 2003.

NEE, M. Piperaceae. In: Smith, N.; Mori, S.A.; Henderson, A.; Stevenson, D.W. & Heald, S. **Flowering plants of the neotropics**. Princeton University press. p.296-297. 2004.

NEGREIROS, J. R.S.; MIQUELONI, D. P. Teor de dilapiol em função do tipo de biomassa aérea em populações de *Piper aduncum*. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v.56, n.1, p.73-79, 2013

NISTOR, A.; CHIRU, N.; KARÁCSONYI, D. Variation of minitubers production from callus regenerated plants of different popato varieties. **Studia Universitatis**, v.19, n.2, p.303-307, 2009.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; PORTO, J. M. P.; NICIOLI, P. M.; STEIN, V. C.; DEUNER, S.; ALVES, E. Análise ultra-estrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.48-50, 2007.

NUNES, J. D.; TORRES, G. A.; DAVIDE, L. S.; SALGADO C. C. Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.7, p.1049-1052, 2007.

OCHATT, S. J.; CONREUX, C.; JACAS, L. Flow cytometry distinction between species and between landraces within *Lathyrus* species and assessment of true-to-type-ness of *in vitro* regenerants. **Plant Systematics and Evolution**, v.299, n.1, p.75-85, 2013.

OLIVEIRA, J. V.; VENDRAMIM, J. D. Repelência de óleos essenciais e pós-vegetais sobre adultos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) em Sementes de Feijoeiro. **Anais da Sociedade de Entomologia Brasileira**, v.28, n.3, p. 549-555, 1999.

PÁDUA, M. S.; LIVRAMENTO, K. G.; PAIVA, L. V.; CASTRO, A. H. F.; ALVES, E. Comparação de características embriogênicas e não embriogênicas de calos de *Coffea arabica* cv. Catiguá. **CONGRESSO BRASILEIRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA**, Lavras, 2010.

PANIS, B.; LAMBARD, M. Status of Cryopreservation Technologies in Plants (crops and forest trees) In.: RUANE, J.; SONNINO, A. (Ed.). **The role of biotechnology and protecting agricultural genetic resources**. Rome: FAO, p.61-78, 2006.

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; CARLOS, R. N.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C. Callus Culture of *Piper aduncum* for the Production of Bioactive Micromolecules. In: Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants 569 (pp. 41-45), 2000.

PEREIRA, A. R.; CARVALHO, S. P.; PASQUAL, M.; SANTOS, F. C. Embriogênese somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaiá Cerrado: efeito de citocinina e ácido giberélico. **Ciência Agrotécnica**, v.31, n.2, p.332-336, 2007.

PÉREZ-NUÑEZ, M. T.; CHAN, J. L.; SAÉNZ, L.; GONZALEZ, T.; VERDEIL, J. L.; OROPEZA, C. Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* L. plumule explants. **In vitro Cellular and Developmental Biology –Plant** v.42, 37-43, 2006.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBELO, R. A.; GIOTTO, C. R.; WENDHAUSEN JR., R.; LARGURA, G. E.; TAVARES, L. B. B. Biotecnologia da *Piper hispidinervum* - Pimenta longa. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 15, p. 18-23, 2000.

RAFAEL, M. S.; HEREIRA-ROJAS, W. J.; ROPER, J. J.; NUNOMURA, S. M.; TADEI, W. P. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. **Genetics and Molecular Research**, v.7, n.3, p.772-781, 2008.

RAZDAN, M.K. Introduction to plant tissue culture. 2ª ed. Enfield: Science Publishers. p.287-306, 2003.

ROCHA, S.F.R. & MING, L.C. *Piper hispidinervum*: a sustainable source of safrole. P.479-481. In: J. Janick (ed.), Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA. 1999.

RODRIGUES, L. R.; OLIVEIRA, J. M. S.; MARIATH, J. E. A. Anatomia vegetal aplicada ao estudo de sistemas androgênicos *in vitro*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.2, n.3-4, p.159-167, 2004.

ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC) Mac Leish).**118 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2004.

SÁ, C. P.; PIMENTEL F. A. **Viabilidade financeira da exploração da pimenta longa em sistemas de cultivo racional e extrativismo no Acre.** (Embrapa Acre. Comunicado técnico, 136). Rio Branco, 2 p., 2001.

SAMUEL, R. Chromosome numbers in *Piper*. **Kew Bulletin**, 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, 1986.

SANTIAGO, E. J. A.; PINTO, J. E. B. P.; CASTRO, E. M.; LAMEIRA, O. A.; CONCEIÇÃO, H. E. O; GALIVANES, M. L. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.5, p.1035-1042, 2001.

SANTOS, C. C. C.; RODRIGUES, P. H. V. Variação Somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar *pacovan*. **Bragantia**, Campinas, v.63, n.2, p.201-205, 2004.

SANTOS, M. D. M. **Micropropagação do abacaxizeiro ornamental [*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindley) Coppens & Leal] e avaliação da fidelidade genotípica dos propágulos.** 127 f. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Departamento de Botânica, 127p, 2008.

SCHEFFER, M. C.; MING, L. C.; ARAÚJO, A. J. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. In: QUEIRÓZ, M. A.; GODERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro.** Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semiárido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

SHARMA, N.; SATSANGI, R.; PANDEY, R.; SINGH, R.; KAUSHIK, N.; TYAGI, R. K. *In vitro* conservation of *Bacopa monnieri* (L.) using mineral oil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.111, n.3, p.291-301, 2012.

SHOEMAKER, R. C.; COUCHE, L. J.; GALBRAITH, D. W. Characterization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Plant Cell Reports**, v.5, n.3, p.178-181, 1986.

SILVA, M.H.L. Tecnologias Para o Desenvolvimento Agroindustrial de *Piper aduncum* L. 78f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2004.

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

SILVA, A. C. P. R.; OLIVEIRA, M. N. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre.** (Embrapa Acre. Boletim de Pesquisa, 23). Rio Branco, 13 p., 2000.

SILVA, C. V.; DE OLIVEIRA, L. S.; LORIATO, V. A. P.; DA SILVA, L. C.; DE CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. C.. Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passion fruit species, *P. cincinnata* Masters. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.107, n.1, p.407-416, 2011.

SILVA, T. L. **Micropropagação, Indução da calogênese e estratégias de conservação *ex situ* de *Piper aduncum* L. E *Piper hispidinervum* C. DC. por técnicas de crescimento mínimo e temperaturas e criogênicas.** 152 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

SILVA, T. L.; BALZON, T. A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. A rapid *in vitro* protocol for propagation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum*, two species from

Amazon region with multipurpose uses. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.89, p.15539-15546, 2012.

SILVA, T. L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. *In vitro* conservation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* under slow-growth conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.4, p.384-389, 2011.

SONDAHL, M. R.; SALISBURY, J. L.; SHARP, W. R. SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v.94, n.2, p.185-188, 1979.

SOUSA, M. M. M.; LÉDO, F. J. S.; PIMENTEL, F. A. Efeito da adubação e do calcário na produção de matéria seca e de óleo essencial de pimenta-longa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.3, p.405-409, 2001.

SRISAWAT, T.; KANCHANAPOOM, K.; PATTANAPANYASAT, K.; SRIKUL, S.; CHUTHAMMATHAT, W. Flow cytometry analysis of oil palm: a preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration. **Songklanakarian J. Sci. Technol.**, v.27, n.3, p.645-652, 2005.

STEINMAACHER, D. A.; KROHN, N. G.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; CLEMENT, C. R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. **Annals of Botany**, Oxford, p.1-11, 2007.

SUGIMOTO, K.; MIYAKE, H.; TAKEOKA, Y. Somaclonal variation in regenerants derived from anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant. Prod. Sci.**, v.2, n.1, p.71-76, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Ed. Artmed, p. 719, 2004.

TEBBS, M.C. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World 1. Review of characters and taxonomy of *Piper* section *Macrostachys*. **Bulletin of the Natural History (Botany)** v.19, n.1, p.117-158, 1989.

TEIXEIRA, J. B.; SONDAHLL, M. R. e KIRB, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.34, p.227-233, 1993.

TERMIGNONI, R. R. Cultura de Tecidos Vegetais. Editora UFRGS, Porto Alegre, 182 p., 2005.

TING, N.; ZAKI, N. M.; ROSLI, R.; LOW, E. L.; ITHNIN, M.; CHEAH, S.; TAN, S.; SINGH, R. SSR mining in oil palm EST database: application in oil palm germplasm diversity studies. **Journal of Genetics**, v.89, n.2, p.135-145, 2010.

TITON, M.; XAVIER, A; OTONI, W. C.; MOTOIKE, S. Y. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.31, n.3, p.417-426, 2007.

TOMES, D. T. Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millets. In: BRIGHT, S. W.; JONES, M. G. K. (Ed.) Advances in agricultural biotechnology, cereal tissue and cell culture. Boston, p.175-203, 1985.

TORRES, A.C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. Retrospectiva da cultura de tecidos de plantas. . In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Embrapa-SPI/CNPH, Brasília, v.1, p. 11-19, 1998.

VIEIRA, I. C. G.; SILVA, J. M. C.; TOLEDO, P. M. Estratégias para evitar a perda de biodiversidade na Amazônia. **Estudos Avançados**, v.19, n.54, p.153-164, 2005.

VIEIRA, R. F.; SILVA, S. R. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: Resultados da 1ª reunião técnica. EMBRAPA/IBAMA, CNPq, Brasília, 184p., 2002.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, v.17, n.2, p.11-42, 2000.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; SOUZA, A. G; VILELA, X. M. S. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. **Scientia Agraria**. v.11, n.2, p.109-117, 2010.

VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P.; DYACHOK, J.; FILONOVA, L. Developmental pathways of somatic embryogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, n.3, p.233-249, 2002.

WADT, L. H. O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC.) visando seu uso e conservação**. 95 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo “ESALQ”. Piracicaba. 2001.

WADT, L. H. O.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética e sistema de acasalamento de *Piper hispidinervum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.2, p.151-157, 2004.

WITHERS, L. A.; ENGLEMAN, F. *In vitro* conservation of plant genetic resources. In.: ALTMAN, A.; COLWELL, R. R. (Ed.). Agricultural biotechnology. New York: Marcel Dekker, p.57-88, 1998.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas. Embrapa-SPI/CNPH. Brasília, v.1, p.297-330, 1998.

YUNCKER, T.G. The Piperaceae of Brazil. I. *Piper*-Group I, II, III, IV. **Hoehnea**, v.2, p.19-366, 1972.

YUSUF, A.; TYAGI, R. K.; MALIK, S. K. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf segments of *Piper colubrinum*. **Plant cell, tissue and organ culture**, v.65, n.3, p.255-258, 2001.

ZACARONI, Lidiany Mendonça *et al.* Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazonica**, Manaus, v.39, n.1, 2009.