

SIMONE DE ALENCAR MACIEL



**ANATOMIA FOLIAR DE PIMENTA LONGA E PIMENTA DE MACACO
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

RIO BRANCO

2012

SIMONE DE ALENCAR MACIEL

**ANATOMIA FOLIAR DE PIMENTA LONGA E PIMENTA DE MACACO
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo C. P. F. Júnior
Co-orientadora: Dra. Andréa Raposo

RIO BRANCO

2012

©MACIEL, S. A., 2012.

MACIEL, Simone de Alencar. **Anatomia foliar de pimenta longa e pimenta de macaco em diferentes condições de cultivo**. Rio Branco, 2012. 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal do Acre, 2012.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

- M152a Maciel, Simone de Alencar, 1983-
Anatomia foliar de pimenta longa e pimenta de macaco em diferentes condições de cultivo / Simone de Alencar Maciel. – 2012.
80f.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal. Rio Branco, 2012.
Inclui Referências bibliográficas.
Orientador: Prof. Dr. Paulo C. P. F. Júnior.
Co-orientador: Dr^a. Andréa Raposo.
1. Pimenta – Análise foliar. 2. Pimenta – Fisiologia vegetal. 3. Plantas – Propagação in vitro. 4. Tecidos vegetais – Cultura e meios de cultura. I. Título.

CDD. 581.0724

SIMONE DE ALENCAR MACIEL

**ANATOMIA FOLIAR DE PIMENTA LONGA E PIMENTA DE MACACO
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal do Acre, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia.

APROVADA em 06 de julho de 2012

Profa. Dra. Cândida Elisa Manfio

UFAC

Dra. Patrícia Silva Flores

Embrapa Acre

Dra. Andréa Raposo
Embrapa Acre
Co-orientadora

RIO BRANCO - AC

2012

Aos meus queridos pais Noemia e Pedro, pelo incentivo,
força, compreensão e por acreditarem na minha vitória.
A minha irmã Ângela, pelo apoio moral, afeto e carinho
que foram essenciais nessa caminhada.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pela vida, força em momentos de fraqueza e desânimo, por sempre guiar meus passos para a realização de mais um sonho.

Ao meu orientador, Dr. Paulo César Poeta Fermino Júnior pela confiança, amizade e pela orientação durante esse tempo.

A minha co-orientadora Dra. Andréa Raposo, pela amizade, compreensão, confiança, conhecimentos e oportunidades concedidas.

A Universidade Federal do Acre, especialmente ao Curso de Pós-graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização do mestrado e continuidade da minha formação acadêmica.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Acre, pela oportunidade de desenvolver as atividades do projeto e utilizar suas instalações. Em especial a toda a equipe do Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LABMOL), pelo apoio e amizade.

Ao pesquisador Dr. Jonny E. Scherwinski-Pereira da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), pela oportunidade de realizar as análises em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) no Laboratório de Bioimagem. Especialmente a analista Ana Cristina Gomes pelo suporte técnico e generosidade durante as análises.

A minha grande amiga Janiffe Oliveira pela lealdade e companheirismo durante várias fases da minha vida, sobretudo, pela recepção, dedicação e ajuda durante a execução dos trabalhos na Embrapa CENARGEN.

A CAPES pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo.

A FUNTAC pelo apoio financeiro proporcionado para a execução do projeto da dissertação.

Aos amigos do programa de pós-graduação David Aquino, Dayse Aragão, Elva Soares, Fabiana Costa, Irene Ferro, Joyce Barbosa e Oscar Nestor, por tudo que compartilhamos nesta fase, alegrias, dúvidas, força de vontade, conhecimento e solidariedade.

Aos membros da banca examinadora Dra. Candida Manfio e Dra. Patrícia Flores pela análise crítica deste trabalho, bem como pelas valiosas sugestões apresentadas.

Enfim, a todos que não foram citados mais que contribuíram para a realização deste trabalho, concretização de um sonho e finalização de mais uma importante etapa da minha vida.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

As espécies *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*, conhecidas popularmente como pimenta longa e pimenta de macaco, respectivamente, apresentam compostos metabólicos secundários como safrol e dilapiol em seus óleos essenciais. Devido ao interesse do mercado químico, a produção de mudas em larga escala tem sido requerida por meio da técnica de cultura de tecidos de vegetais. Porém, a alta mortalidade de plantas durante a transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, em consequência de desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas, tem criado obstáculos para o uso generalizado dessa técnica. O trabalho teve como objetivo comparar aspectos anatômicos, relacionados a estruturas fisiológicas das folhas de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. Os experimentos e análises foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre, Laboratório de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Acre e no Laboratório de Bioimagem da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Como fonte de material vegetal foram utilizadas folhas sadias do segundo e terceiro nós, desenvolvidas em três condições de cultivo: *in vitro*, *in vivo* e *ex vitro* (aclimatização). A observação em microscopia de luz ocorreu através da preparação de lâminas temporárias e permanentes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as variáveis analisadas foram: densidade e dimensões dos estômatos; espessuras das estruturas da lâmina foliar e do mesofilo. Os tratamentos foram constituídos por oito repetições (campos visuais no microscópio), e cada repetição constituída por secções histológicas de três indivíduos. As variáveis foram avaliadas após 60 dias, de acordo com as condições de cultivo. As folhas das espécies estudadas apresentaram epiderme múltipla e mesofilo dorsiventral. São anfihipoestomática na espécie *P. hispidinervum* e hipoestomática para a espécie *P. aduncum*, sendo os estômatos caracterizados na sua maioria como tetracíticos. A espessura da epiderme e hipoderme das folhas de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* foi maior no período da aclimatização. A lâmina foliar e o mesofilo foram mais espessos na condição do cultivo *ex vitro*, quando comparadas ao cultivo *in vitro* e *in vivo*. Em ambas as espécies, o aumento da densidade estomática foi observado na condição

de cultivo *in vitro*. Diferentes ambientes (*in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*) promovem a plasticidade das estruturas celulares da lâmina foliar das espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum*, proporcionando maior sobrevivência de plantas micropropagadas na fase de aclimatização.

Palavras-chave: *Piper hispidinervum*. *Piper aduncum*. Micropropagação. Variação estrutural. Condição de cultivo. Anatomia. Folhas.

ABSTRACT

Piper aduncum and *hispidinervum*, popularly known as long pepper and spiked pepper respectively, are rich in secondary metabolic compounds, such as safrole and dillapiole in their essential oils. Due to chemical company market interest, plant propagation on a large scale has been requested through plant tissue culture technique. However, the high mortality of plants during the transition from *in vitro* environment for *ex vitro* as a result of anatomical, morphological and physiological disorders created obstacles to the widespread use of this technique. The objective of the study was to compare anatomical and physiological structures related to the leaves of *P. hispidinervum* and *P. aduncum* propagated *in vitro* and *in vivo* during acclimatization. The experiments and analyses were conducted at the Laboratory of Morphology and Molecular Biology at Embrapa Acre, Plant Tissue Laboratory in Federal University of Acre and Bioimagem Laboratory of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF. Healthy leaves of the second and third nodes were used and developed in three culture conditions: *in vitro*, *in vivo* and *ex vitro* (acclimatization) for anatomical studies, which involve descriptions and morphometry. The experimental design was completely randomized, and the variables were following: density and size of stomata, thickness of leaf and mesophyll structures through the preparation of temporary and permanent blades for observation under light microscopy. The treatments consisted of eight repetitions (visual fields under a microscope), and each replicate consisting of histological sections from three plants. The variables were evaluated after 60 days under culture conditions. The leaves of both species have multiple epidermis and dorsiventral mesophyll. Anfihipoestomatic leaves are found in *P. hispidinervum* and hypostomatic in *P. aduncum*. Stomatal type of stomata is mostly characterized as tetracytic. The thickness of the epidermis and hypodermis of both *P. hispidinervum* and *P. aduncum* was higher in acclimatization condition. The leaf blade and mesophyll were thicker on *ex vitro* condition compared to *in vitro* and *in vivo* conditions. In both species the stomatal density increasing was observed in *in vitro* condition. Different

environments (*in vitro*, *ex vitro* and *in vivo*) promote the plasticity of cellular structures in leaves of *P. hispidinervum* and *P. aduncum*, providing greater survival of micropropagated plants during the acclimatization.

Keywords: *Piper hispidinervum*. *Piper aduncum*. Micropropagation. Structural variation. Culture condition. Anatomy. Leaves.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1 – Espécie *Piper hispidinervum*. A e B. Aspecto de folhas e espigas do Banco de Germoplasma da Embrapa Acre 21
- Figura 2 – Espécie *Piper aduncum*. A e B. Aspecto de folhas e espigas do Banco de Germoplasma da Embrapa Acre 23
- Figura 3 – Diferentes condições de cultivo utilizadas para as espécies no presente estudo. A e B. Cultivo *in vitro*; C e D. Cultivo *ex vitro*; E. Cultivo *in vivo*; F, G e H. Secção na região do terço médio da folha em aproximadamente 0,5 cm², metodologia utilizada em todas as condições de cultivo para análises anatômicas 37
- Figura 4 – Epiderme em vista frontal, da face adaxial de *Piper hispidinervum*. A. Fotomicrografia da epiderme evidenciando a base do tricoma tector, tricoma glandular e estômatos do cultivo *in vitro*; B. Eletromicrografia de varredura mostrando estômato na epiderme adaxial em cultivo *in vitro*; C. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro* evidenciando a base do tricoma tector; D. Eletromicrografia de varredura do cultivo *ex vitro*; E. Fotomicrografia do cultivo *in vivo* com tricoma glandular; F. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vivo* aspecto geral de tricomas. Legenda: tricoma glandular (tg), estômato (e), base do tricoma tector (bt), tricoma tector (tt) 43
- Figura 5 – Epiderme em vista frontal, da face abaxial de *P. hispidinervum*. A. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; B. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vitro*; C. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; D. Eletromicrografia de varredura do cultivo *ex vitro*; E. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; F. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vivo*. Legenda: tricoma glandular (tg), estômato (e), base do tricoma tector (bt), tricoma tector (tt) 44
- Figura 6 – Tricomas em vista frontal, da face adaxial das folhas de *P. hispidinervum*. A e B. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; C. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vitro*; D e E. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; F. Eletromicrografia de

- varredura do cultivo *ex vitro*; G. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; H. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vivo*.
 Legenda: tricoma tector (tt), tricoma glandular (tg) e estômato (e) 45
- Figura 7 – Tricomas em vista frontal, da face abaxial das folhas de *P. hispidinervum*. A e B. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; C. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vitro*; D e E. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; F. Eletromicrografia de varredura do cultivo *ex vitro*; G e H. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; I. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vivo*.
 Legenda: base do tricoma tector (bt), tricoma tector (tt), tricoma glandular (tg) e estômato (e) 46
- Figura 8 – Epiderme em vista frontal, da face adaxial da folha de *Piper aduncum*. A. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; B. Eletromicrografia do cultivo *in vitro*; C. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; D. Eletromicrografia do cultivo *ex vitro*; E. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; F. Eletromicrografia do cultivo *in vivo*. Legenda: tricoma glandular (tg), estômato (e), base do tricoma tector (bt) e tricoma tector (tt) 48
- Figura 9 – Epiderme em vista frontal, da face abaxial da folha de *P. aduncum*. A. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; B. Eletromicrografia do cultivo *in vitro*; C. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; D. Eletromicrografia do cultivo *ex vitro*; E. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; F. Eletromicrografia do cultivo *in vivo*. Legenda: base do tricoma tector (bt), tricoma tector (tt), tricoma glandular (tg) e estômato (e)..... 49
- Figura 10 – Tricomas em vista frontal, da face adaxial folha de *P. aduncum*. A e B. Fotomicrografia do cultivo *in vitro* evidenciando tricoma tector e glandular; C. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vitro*; D e E. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; F. Eletromicrografia de varredura do cultivo *ex vitro*; G e H. Fotomicrografia do cultivo *in vivo* mostrando tricomas tectores sobre a nervura secundária da folha e tricoma glandular; I. Eletromicrografia do cultivo *in vivo*. Legenda: tricoma tector (tt) e tricoma glandular (tg) 50

- Figura 11 – Tricomas em vista frontal, da face abaxial da folha de *P. aduncum*. A. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; B e C. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vitro*; D. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; E. Eletromicrografia de varredura do cultivo *ex vitro*; F. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; G e H. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vivo*.
 Legenda: base do tricoma tector (bt), tricoma tector (tt), tricoma glandular (tg) e estômato (e) 51
- Figura 12 – Secção transversal da lâmina foliar de *P. hispidinervum*. A e B. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; C e D. Eletromicrografia de varredura e fotomicrografia do cultivo *ex vitro*, respectivamente; E. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*. Legenda: epiderme adaxial (ead), hipoderme adaxial (had), parênquima paliçádico (pp), parênquima esponjoso (pe), feixe vascular (fv), células oleíferas (co), hipoderme abaxial (hab) e epiderme abaxial (eab) 54
- Figura 13 – : Secção transversal da lâmina foliar de *P. aduncum*. A. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; B. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; C e D. Fotomicrografia e eletromicrografia de varredura do cultivo *in vivo*. Legenda: tricoma glandular (tg), epiderme adaxial (ead), hipoderme adaxial (had), parênquima paliçádico (pp), parênquima esponjoso (pe), feixe vascular (fv), células oleíferas (co), hipoderme abaxial (hab) e epiderme abaxial (eab) 59
- Figura 14 – Secção paradérmica evidenciando os estômatos, da face adaxial (A-F) e abaxial (G-M) de folhas de *P. hispidinervum* obtidas de plantas submetidas à condição *in vitro* (A, D, G e J); *ex vitro* (B, E, H e L) e *in vivo* (C, F, I e M) 61
- Figura 15 – Secção paradérmica evidenciando os estômatos, da face abaxial, das folhas de *P. aduncum* obtidas de plantas submetidas ao cultivo *in vitro* (A e B); cultivo *ex vitro*; (C e D) e cultivo *in vivo* (E e F) 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espessura da epiderme (EP AD e EP AB) e hipoderme (HIP AD e HIP AB) da face adaxial e abaxial, respectivamente em μm , de <i>Piper hispidinervum</i> sob diferentes condições de cultivo	52
Tabela 2 – Espessura da epiderme (EP AD e EP AB) e hipoderme (HIP AD e HIP AB) da face adaxial e abaxial, respectivamente em μm , de <i>Piper aduncum</i> sob diferentes condições de cultivo	53
Tabela 3 – Espessura da lâmina foliar, mesofilo, parênquima paliçádico (PP) e parênquima esponjoso (PE), em μm , de <i>Piper hispidinervum</i> sob diferentes condições de cultivo	56
Tabela 4 – Espessura da lâmina foliar, mesofilo, parênquima paliçádico (PP) e parênquima esponjoso (PE), em μm , de <i>Piper aduncum</i> sob diferentes condições de cultivo	58
Tabela 5 – Densidade estomática em est/mm^2 e dimensão estomática em comprimento (CCG) e largura (LCG) das células-guarda, comprimento (CP) e largura do poro (LP), em μm , na face adaxial das folhas de <i>Piper hispidinervum</i> sob diferentes condições de cultivo	63
Tabela 6 – Densidade estomática em est/mm^2 e dimensão estomática em comprimento (CCG) e largura (LCG) das células-guarda, comprimento (CP) e largura do poro (LP), em μm , na face abaxial das folhas de <i>Piper hispidinervum</i> sob diferentes condições de cultivo	64
Tabela 7 – Densidade estomática em est/mm^2 e dimensão estomática em comprimento (CCG) e largura (LCG) das células-guarda, comprimento (CP) e largura do poro (LP), em μm , na face abaxial das folhas de <i>Piper aduncum</i> sob diferentes condições de cultivo	65

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ágar – Agente geleificante
MS – Meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962)

LISTA DE SIGLAS

- CENARGEN – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LABMOL – Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular
UFAC – Universidade Federal do Acre

LISTA DE SÍMBOLOS

- atm – atmosfera
® – marca registrada
μm – micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 FAMÍLIA PIPERACEAE	20
2.2 PIMENTA LONGA	20
2.3 PIMENTA DE MACACO	23
2.4 ANATOMIA FOLIAR	25
2.5 MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO	35
3.1.1 Cultivo <i>in vitro</i>	35
3.1.2 Cultivo <i>ex vitro</i> : aclimatização das plântulas de <i>P. hispidinervum</i> e <i>P. aduncum</i>	36
3.1.3 Cultivo <i>in vivo</i>	36
3.2 ANATOMIA DA LÂMINA FOLIAR	32
3.2.1 Espessura dos tecidos da lâmina foliar e mesofilo	38
3.2.1.1 Preparação do material vegetal para microscopia óptica	38
3.2.2. Classificação e distribuição dos estômatos	38
3.2.3 Densidade e dimensão estomática	39
3.2.3.1 Preparação do material vegetal para microscopia óptica	39
3.2.3.2 Preparação do material para microscopia eletrônica de varredura	40
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 ANATOMIA DA LÂMINA FOLIAR	41
4.1.1 Espessura dos tecidos da lâmina foliar e mesofilo	51
4.1.2 Classificação e distribuição dos estômatos	60
4.1.3 Densidade e dimensão estomática	62
5 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma ampla biodiversidade em sua fauna e flora, destacando-se a floresta Amazônica por apresentar grande variedade de espécies vegetais com potencial para a produção de compostos secundários, que podem ser utilizados como matéria-prima na fabricação de vários produtos pelas indústrias químicas (NUNES, 2004; FAZOLIN et al., 2007). A maioria dessas espécies é formada por ervas e arbustos de consistência herbácea com distribuição pantropical (SANTIAGO et al., 2001).

Essa floresta Amazônica é constituída por muitas espécies com valor comercial, fato que tem intensificado o interesse dos países desenvolvidos pela sua biodiversidade, visando à obtenção de substâncias fitoquímicas. Ações antrópicas sobre os ambientes naturais, principalmente qualquer atividade humana não sustentável, podem afetar a abundância relativa das espécies e, dessa forma, levá-las à extinção (MENDONÇA-HAGLER, 2001). Sendo, necessário que se tenha uma preocupação no sentido da sua conservação da floresta e na produção sustentável, evitando assim uma possível extinção (WADT, 2001; VIEIRA et al., 2005; REIS et al., 2007).

Dentre as espécies com potencial econômico, já foram identificadas mais de uma dezena do gênero *Piper*, todas fornecedoras de óleos essenciais (FAZOLIN et al., 2007), presentes em estruturas especiais de secreção das plantas que podem ser extraídos por arraste de vapor de água. Pertencentes a esse gênero, a pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC) e a pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.) são valorizadas e muito utilizadas pela indústria de cosmético e bioinseticida, por apresentarem compostos secundários do metabolismo. Embora esses compostos apresentem comprovada atividade carcinogênica *in vitro*, são de grande importância para o avanço tecnológico, especialmente, fármacos, bioinseticidas e fixadores de aroma (ROSA et al., 2000). Além disso, atuam como um mecanismo de defesa para o vegetal, com funções variadas, incluindo a proteção contra a herbivoria e o ataque de microorganismos patogênicos (SÁ; PIMENTEL, 2001).

A pimenta longa apresenta altos níveis do éter fenílico, o safrol, podendo ser facilmente extraído por hidrodestilação das folhas e ramos finos. Os principais subprodutos obtidos a partir do safrol são a heliotropina, amplamente utilizados como fragrância, e o butóxido de piperonila, um ingrediente essencial para

inseticidas biodegradáveis à base de piretrum (BERGO, 2010). A pimenta de macaco vem despertando interesse econômico pelas indústrias farmacêuticas, devido à presença do éter fenílico, o dilapiol, o qual é responsável pelas atividades fungicidas, inseticidas e pelo efeito antibiótico (SOUSA et al., 2008).

Considerando esses aspectos, a pimenta longa e pimenta de macaco apresentam boas características para a produção comercial, para tanto, a cultura de tecidos tem sido requerida para a produção em larga escala. A propagação *in vitro* permite a produção de um elevado número de plantas, em curto espaço de tempo e de alta qualidade genética e fitossanitária (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Entretanto, a alta mortalidade de plantas durante a transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, em consequência de desordens anatômicas, tem criado obstáculos para o uso generalizado dessa técnica em plantas (BARBOZA et al., 2006).

A anatomia vegetal tem sido uma ferramenta importante no sucesso das técnicas de micropropagação, uma vez que contribui para a identificação das estruturas para o sucesso da propagação, a qual depende da competência dos tecidos vegetais escolhidos para a regeneração *in vitro* (SILVA et al., 2005). Diversos estudos têm caracterizado histologicamente os processos de morfogênese *in vitro*. De acordo com Lombardi et al. (2007), para o completo uso da ferramenta de micropropagação, faz-se necessário a compreensão dos aspectos histológicos e morfológicos. Os estudos histológicos são fundamentais não apenas para confirmar a rota morfogênica estabelecida, mas também para determinar os tipos celulares aos quais derivam os brotos micropropagados (MACIEL et al., 2010).

No cultivo *in vitro* as plantas crescem sob condições controladas de redução das trocas gasosas, alta umidade do ar (PARK et al., 2004), baixa irradiância e uso de açúcares como fonte de energia (SAHER et al., 2004). Nestas condições, a planta pode apresentar alterações anatômicas e morfológicas. Com isso, ocorrem reduções no tamanho dos órgãos, dificuldade no mecanismo de fechamento dos estômatos e adaptações no período de aclimatização, acarretando um número elevado de perdas de plantas na transferência para as condições *ex vitro* (BIASI, 2003; BOUQUET; TORREGROSA, 2003). De acordo com Reeve e Sherman (1993), o termo adaptação na anatomia vegetal é utilizado para descrever caracteres anatômicos associados a determinadas condições ambientais.

Neste sentido, são necessários estudos com a finalidade de descrever as variações estruturais das folhas de espécies micropropagadas, de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* em diferentes condições de ambiente (*in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*), para fundamentar o sucesso da micropropagação dessas espécies, bem como detectar as possíveis alterações provenientes da utilização dessa técnica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA PIPERACEAE

A família Piperaceae possui larga distribuição no mundo, apresentando cerca de 10 a 20 gêneros com aproximadamente 1400 espécies, que estão disseminadas em todas as regiões tropicais. No Brasil, essa família está representada por cinco gêneros *Piper*, *Peperomia*, *Potomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis* (BARROSO et al., 2002; SOUZA; LORENZI, 2005). O gênero *Piper* apresenta um número próximo a 700 espécies, das quais mais de 170 ocorrem no Brasil (YUNCKER, 1972).

A maioria das espécies do gênero *Piper* destaca-se pelo emprego da medicina popular e por sua vasta importância econômica devido ao acúmulo de compostos secundários de grande utilidade para a indústria farmacêutica e agrícola (SILVA; MACHADO, 1999; PARMAR et al., 1997). A espécie mais importante desse gênero é *Piper nigrum* (Pimenta-do-Reino), que vem sendo estudada desde 1819 quando foi isolada a piperina, o princípio pungente¹ dessa espécie, usada em tratamentos de epilepsia (SENGUPTA; RAY, 1987). Várias outras espécies também apresentaram compostos químicos de interesse farmacológico, como é o caso das espécies *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*.

2.2 PIMENTA LONGA

A espécie *Piper hispidinervum* C. DC é conhecida popularmente como pimenta longa, sendo pertencente à família Piperaceae. É uma planta arbustiva e aromática (YUNCKER, 1972). Está distribuída na região do Estado do Acre e em áreas de fronteiras da Bolívia e do Peru (PIMENTEL et al., 1998; OLIVEIRA, 1998). Essa espécie pode alcançar até 7 metros de altura. Suas folhas são oblongo-lanceoladas ou oblonga-elípticas, apresentando pontuações glandulares. As inflorescências são espigas alongadas, em forma de pedúnculo curto (Figura 1) (YUNCKER, 1972; SILVA; OLIVEIRA, 2000).

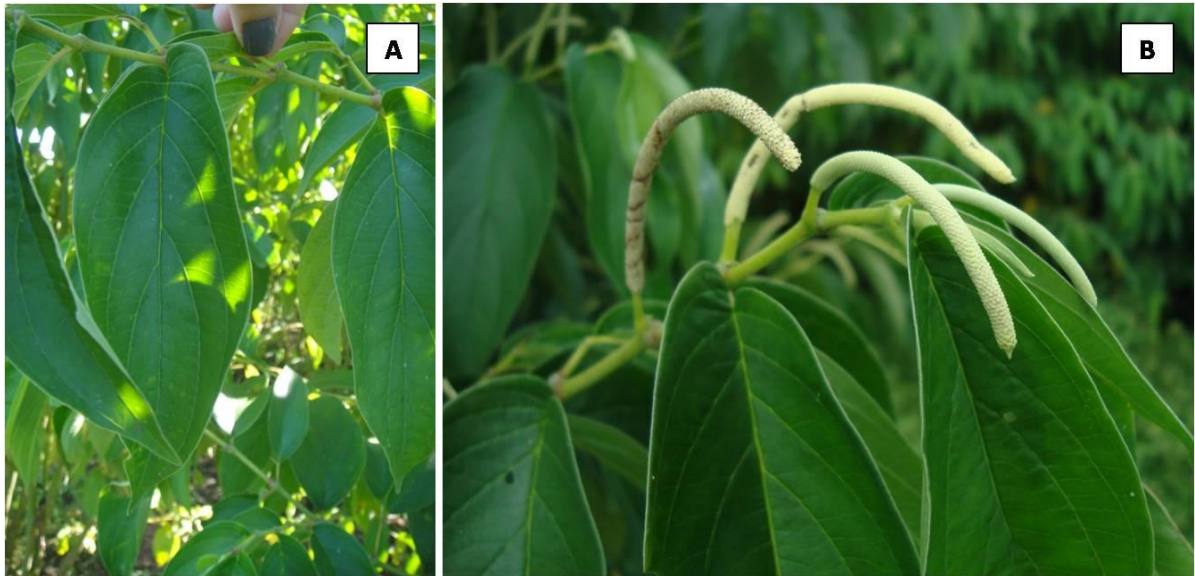


FIGURA 1 – *Piper hispidinervum*. A e B. Aspecto de folhas e espigas do Banco de Germoplasma da Embrapa Acre

É uma espécie antrópica considerada pioneira pela resistência às adversidades climáticas. Sua ocorrência é típica de ambientes abertos com incidência direta de luz. Em condições de clima natural, as sementes apresentam baixa longevidade e o pico de produção ocorre nos meses de janeiro/fevereiro e junho/julho (ALMEIDA, 1999).

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

No Brasil, até poucos anos atrás, o safrol era extraído da canela de sassafrás (*Ocotea pretiosa*), uma Lauraceae nativa da Mata Atlântica, com alta densidade de indivíduos no Vale do Itajaí, SC. A descoberta do óleo de sassafrás extraído desta espécie ocorreu em 1939, quando foi evidenciado que, pela destilação da madeira dessa árvore, obtinha-se um óleo essencial contendo concentrações de até 84% de safrol (ROCHA; MING, 1999).

A descoberta da pimenta longa como uma planta promissora para a obtenção de safrol ocorreu na década de 1970, por meio do programa de triagem de plantas

aromáticas da Amazônia, coordenado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Porém, somente na década de 1990, após a proibição do corte da canela de sassafrás, a espécie começou a ser mais estudada, despertando o interesse para sua exploração comercial (WADT, 2001).

A pimenta longa possui um óleo essencial rico em safrol, sendo sua extração renovável, já que é obtido a partir de partes aéreas e ramos finos. A grande vantagem de se utilizar a pimenta longa está associada ao fato desta espécie possuir alta capacidade de rebrota após o corte, sendo possível realizar diversos cortes ao longo dos anos, caracterizando um sistema de produção não destrutivo e ambientalmente correto. O safrol, embora apresente atividades carcinogênicas *in vitro*, é de grande importância no setor científico/tecnológico como precursor de uma variedade de compostos, como fármacos, inseticidas biodegradáveis (piretróides naturais), fixadores de perfume (heliotropina) e, mais recentemente, de drogas antitrombóticas (SALVARO, 2010). Comumente, os óleos essenciais são produzidos e secretados por glândulas especiais, sendo armazenados em cavidades existentes entre as células (WADT, 2001).

O safrol é um líquido levemente amarelo de odor característico, insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos, tais como etanol, clorofórmio e éter etílico (PESCADOR et al., 2000). É um composto natural de distribuição ampla no reino vegetal, no entanto, encontra-se armazenado em quantidades apreciáveis em espécies das famílias *Aristolochiaceae*, *Lauraceae* e *Piperaceae* (COSTA, 2000).

Vários trabalhos referem-se ao alto teor de safrol encontrado em pimenta longa (PIMENTEL et al., 1998; SILVA; OLIVEIRA, 2000; FAZOLIN et al., 2005). O teor médio para produção do óleo essencial varia entre 3 a 4% em relação à matéria seca. A concentração do composto safrol tem variação de 87 a 97% (NUNES et al., 2007; SILVA; OLIVEIRA, 2000).

O consumo mundial de safrol excede 3.000 toneladas ao ano, e os únicos produtores mundiais são a China e o Vietnã. Estes países obtêm o safrol a partir da extração do óleo essencial da espécie *Cinnamomum camphora*. Tendo em vista que estes países utilizam o mesmo mecanismo para a obtenção do safrol como era feito no Brasil com a canela sassafrás, a espécie *Cinnamomum camphora* sofre risco de extinção e desaparecimento, devido ao uso indiscriminado, com sérios prejuízos ao mercado consumidor de safrol (PIMENTEL et al., 1998; PIMENTEL; PINHEIRO, 2000).

Sá et al. (2004) citam que há uma preocupação mundial em relação à produção de safrol, visto que os atuais países produtores, China e Vietnã, correm sérios riscos de não poderem atender a médio e longo prazo essa demanda, devido ao mecanismo de extração predatória. A vantagem da pimenta longa está no fato de que o safrol é extraído principalmente das folhas e ramos secundários, não sendo necessária a destruição da planta (MIRANDA, 2002).

2.3 PIMENTA DE MACACO

Piper aduncum L. é conhecida popularmente como pimenta de macaco, sendo pertencente à família Piperaceae. É uma planta arbustiva, distribuída por toda a Floresta Amazônica (LORENZI; MATOS, 2002).

A pimenta de macaco possui porte arbustivo, medindo cerca de 2,0 metros de altura. As folhas podem ser elípticas ou lanceoladas, com base redonda, ásperas na face adaxial e pubescentes nas faces abaxial e adaxial. As espigas são regularmente curvadas, com pedúnculos curtos (Figura 2) (VIANNA; AKISUE, 1997).

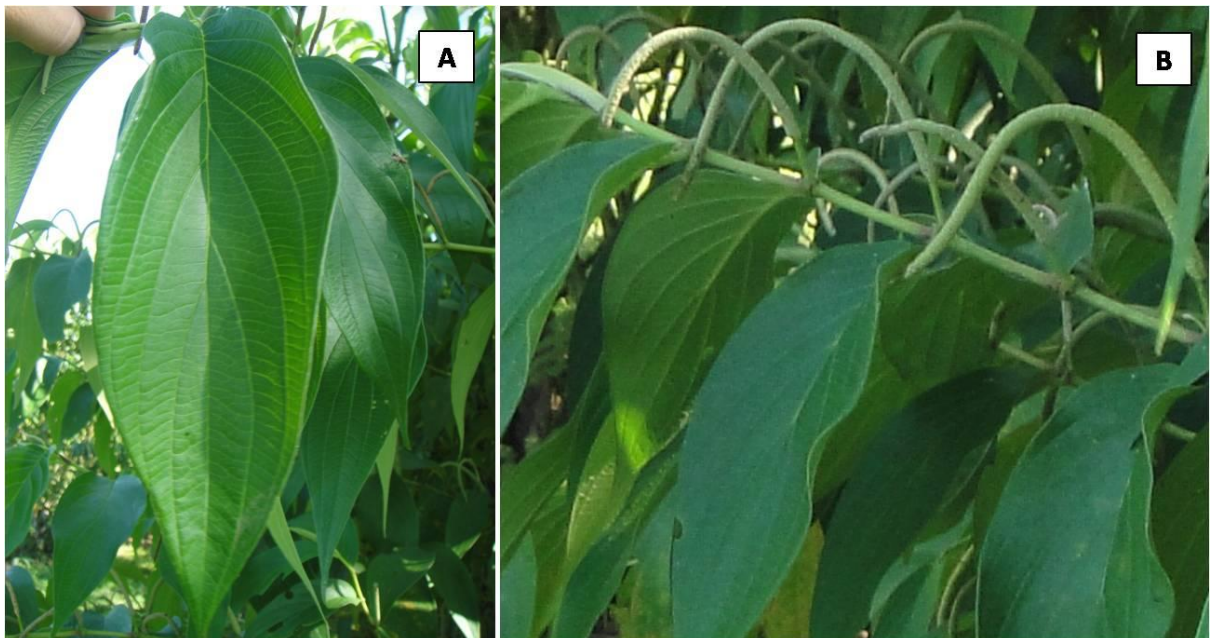


FIGURA 2 – *Piper aduncum*. A e B. Aspecto de folhas e espigas do Banco de Germoplasma da Embrapa Acre

Esta espécie é considerada uma planta oportunista que invade áreas desflorestadas após exploração de madeira, de alta rusticidade e elevada resistência

às mudanças climáticas (SOUSA et al., 2008). É considerada umbrófila, sendo encontrada em várias formações florestais, preferencialmente em solos com elevado teor de matéria orgânica e umidade (LORENIZI; MATOS, 2002).

Apresenta grande importância ecológica, por possuir elevado potencial na recomposição de áreas degradadas, promovendo uma maior regeneração natural e densidade relativa ao longo do tempo (ALVARENGA et al., 2006). Apresenta menor importância econômica do que a pimenta longa, mas possui grande potencial para a produção de inseticida e sinérgico. Seu óleo essencial é rico em dilapiol, com teor de 31,5 a 91,1%, sendo extraído da parte aérea da planta, demonstrando ser bastante promissor na agricultura e na medicina. Segundo Sousa et al. (2008), o óleo de *P. aduncum* pertence à classe dos agentes xenobióticos de baixa toxicidade.

Esse componente químico é efetivo contra os fungos *Colletotrichum musae*, causador da antracnose em frutos de banana (BASTOS; ALBUQUERQUE, 2004); *Trichophyton mentagrophytes*, causador da dermatose em mamíferos e *Magnaporthe grisea*, que causa danos em arroz e trigo (GUERRINI et al., 2009). Além disso, apresenta ação inseticida sobre *Cerotoma tingomarianus* Bechné, causador de desfolhamento severo no feijopeiro; *Tenebrio molitor* L. que infesta farinhas, rações e grãos quebrados ou anteriormente danificados (FAZOLIN et al., 2005; 2007) e *Callosobruchus maculatus* (Fabr.), considerado a praga mais importante do feijão caupi, armazenado em regiões tropicais e subtropicais (PEREIRA et al., 2008).

Silva et al. (2007) relatam que o uso de extratos aquosos de folhas e raízes de *P. aduncum* apresentaram forte atividade inseticida contra *Aetalion* sp.. Esta praga conhecida popularmente como cigarrinha dos pomares, causa importantes prejuízos econômicos na Amazônia, por sugarem a seiva de caules, raízes, ramos, folhas e frutos, ocasionando o definhamento da planta atacada.

Além do controle de pragas, o chá das folhas de *P. aduncum* é muito utilizado na medicina popular (FENNER et al. 2006; SOUZA; FELFILI, 2006). Em levantamento etnobotânico de espécies medicinais utilizadas no Estado de Minas Gerais, Rodrigues e Carvalho (2001) citam que o chá das folhas desta espécie é utilizado como adstringente, anti-hemorrágico e cicatrizante, além de ser utilizado contra diarreias e inflamações do útero. Em um artigo de revisão a sobre o uso de plantas medicinais no bioma cerrado, Vieira e Martins (2000) citam que o chá do caule e das folhas é utilizado no controle da queda de cabelos e como anestésico.

Segundo Mesquita et al. (2005) e Oliveira et al. (2006), as diferenças no ambiente de desenvolvimento, tais como, temperatura, pluviosidade, altitude, intensidade e direção do vento, luminosidade, dentre outras, podem levar ao surgimento de diferentes quimiotipos de *P. aduncum* distribuídos em todo o mundo. Para Guerrini et al. (2009), esse aparente polimorfismo químico pode ter sido causado por identificações botânicas errôneas ou diferentes tempos de coletas.

Wadt et al. (2004) observaram que a diversidade genética representada na Coleção de Germoplasma de pimenta longa da Embrapa Acre foi elevada, sendo diferentes geneticamente as espécies *P. aduncum* e *P. hispidinervum*. Por outro lado, Nunes et al. (2007), trabalhando com acessos dessas duas espécies, também pertencentes à Coleção de Germoplasma da Embrapa Acre, verificaram pela análise de cariótipos, que não há diferenças entre as duas espécies. Com isso concluíram que se trata de uma única espécie, sendo *P. hispidinervum* uma variedade de *P. aduncum*, com distribuição geográfica restrita.

O interesse econômico por *P. aduncum* se deu mais em função da acentuada semelhança botânica com a espécie *P. hispidinervum*. Segundo Fazolin et al. (2006) as diferenças entre elas se concentram nas características foliares. A *P. aduncum* possui folhas elípticas ou lanceoladas com base redonda, ásperas na face adaxial e pubescentes nas faces abaxiais e adaxial, o que não ocorre com *P. hispidinervum*.

2.4 ANATOMIA FOLIAR

O estudo da anatomia foliar é de grande importância para a avaliação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Tais resultados anatômicos auxiliam nos estudos do balanço hídrico e da capacidade fotossintética, uma vez que as folhas constituem o aparato fotossintético, e são responsáveis pela formação de carboidratos que são alocados para os órgãos vegetativos e reprodutivos da planta (BASTOS et al., 2002).

A lâmina foliar, de modo geral, apresenta duas superfícies, sendo a face adaxial (superior) e face abaxial (inferior). A epiderme é um tecido de revestimento contínuo com distribuição em toda a extensão da folha. Nas diferentes espécies, o número de camadas que formam a epiderme foliar pode variar de uni a multisseriada. Sua variação também se refere à forma das células, a sua estrutura, o arranjo dos estômatos, a morfologia e arranjo dos tricomas (MENEZES et al., 2003).

A epiderme apresenta células desprovidas de espaços intercelulares e nas espécies *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* apresentam uma subcamada denominada hipoderme que em corte transversal possui células oleíferas em formato esférico, diferentes das demais células epidérmicas. As células oleíferas são estruturas especiais de secreção que em espécies do gênero *Piper* tem a função de armazenamento de óleos essenciais (NASCIMENTO; VILHENA-POTIGUARA, 1999). Os tricomas também estão dispostos na epiderme e evitam o excesso de transpiração e ataque de insetos, e os estômatos são necessários para as trocas gasosas, sendo fundamentais à fotossíntese (APPEZZATO-DA-GLORIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2004). A cutícula apresenta deposição de ceras para evitar a transpiração pelas células epidérmicas (CASTRO et al., 2009).

O mesofilo compreende a região anatômica sob a epiderme, é entremeado pelos feixes vasculares, sendo formado principalmente por parênquima clorofiliano (SOUZA, 2003). O clorênquima é um tecido parenquimático com grande capacidade fotossintética, constituído de cloroplastos e rico em espaços intercelulares. O mesofilo pode ser uniforme ou apresentar diferenciação em parênquima paliçádico e esponjoso (RODRIGUES et al., 2010; CASTRO et al., 2009).

A anatomia vegetal tem sido uma ferramenta importante para a validação do sucesso das técnicas de micropropagação, uma vez que depende das estruturas escolhidas e da competência dos tecidos vegetais para o sucesso da regeneração *in vitro* (SILVA et al., 2005). Trabalhos envolvendo aspectos histológicos e morfológicos facilitam a compreensão das etapas da micropropagação, não somente na rota morfogênica formada, como também na determinação de estruturas histológicas presente no tecido (LOMBARDI et al., 2007).

Sistemas de micropropagação são ferramentas biotecnológicas para obtenção de mudas em grande escala (FILA et al., 1998). No entanto, há poucos estudos sobre o controle ambiental *in vitro* para maximizar a taxa de sobrevivência na etapa de aclimatização (BUCH, 2005). Há hipóteses de que altas concentrações de carboidratos e nutrientes no meio de cultura podem aumentar a área foliar das plântulas (ZARRABEITIA et al., 1997), promovendo um aumento na densidade estomática (SALISBUR; ROSS, 1992). De acordo com Shangguan et al. (1999) e Srinivasa-Rao et al. (2000), a área foliar e os estômatos são considerados os principais responsáveis pelo decréscimo da atividade fotossintética.

O estabelecimento de um protocolo de micropropagação é dependente de uma série de fatores bióticos e abióticos que afetam direta ou indiretamente a adaptação dos propágulos nas condições *ex vitro*, uma vez que as plântulas se desenvolvem em condições heterotróficas. A transição de estádios fisiológicos das plântulas (heterotróficas para autotróficas) pode ocasionar perdas elevadas de indivíduos, inviabilizando o processo de micropropagação. Por essa razão, é comum submeter as plântulas a uma exposição gradativa às condições externas, onde são controladas a luminosidade e a umidade relativa (BATAGIN et al., 2009). As folhas das plantas cultivadas *in vitro* são geralmente finas, tenras, fotossinteticamente pouco ativas e com maior densidade estomática, e por isso mal adaptadas às condições *ex vitro* (SUTTER, 1998).

Segundo Cid (2001), os componentes orgânicos do meio de cultura são importantes, principalmente a sacarose, fazendo-se indispensável e garantindo uma maior permanência do explante no cultivo *in vitro*. Mosaleeyanon et al. (2004) afirmam que plantas crescidas sob condição heterotrófica possuem pouca habilidade fotossintética. A concentração de sacarose é um fator importante a ser determinado e ajustado, de acordo com o tipo de explante e as condições de cultivo (SANTOS, 2007).

De acordo com Taiz e Zeiger (2009), as folhas, são órgãos de extrema importância às plantas, por serem os principais responsáveis pela captação de luz, fixação de gás carbônico (CO₂) atmosférico e subsequente produção de assimilados (via fotossíntese). Além disso, por meio da transpiração, as folhas regulam a temperatura e mantêm a planta em equilíbrio com o ambiente. Em conjunto, as trocas gasosas estão relacionadas ao crescimento vegetativo e reprodutivo da planta. Os brotos desenvolvidos *in vitro* estão expostos a um microambiente controlado, organizado para gerar estresse mínimo, mas com ótimas condições para a multiplicação (HAZARIKA, 2006). O modo heterotrófico de nutrição e a falta de mecanismos de controle de perda de água estabelecem plantas vulneráveis ao choque no transplante para a casa de vegetação (*ex vitro*) ou campo (LAMHANEDI et al., 2003). O cultivo *in vitro* pode causar alterações anatômicas, morfológicas e fisiológicas nas plantas, prejudicando a aclimatização das plantas micropropagadas (CALVETE et al., 2002; ALBARELLO et al., 2001).

As folhas desenvolvidas *in vitro* apresentam o mesófilo e o sistema vascular extremamente simplificado quando comparados com as folhas desenvolvidas em

casa de vegetação (HAZARIKA, 2006). As mudanças anatômicas que ocorrem na aclimatização são mais evidentes em folhas que se desenvolvem após o período de cultivo *in vitro*, ou seja, na casa de vegetação (*ex vitro*), como descrito para folhas de bananeiras aclimatizadas *ex vitro* (COSTA et al., 2009).

Nas condições de cultivo *in vitro*, a intensidade luminosa é muito inferior, quando comparada com a da casa de vegetação. Uma vez que as mudas são transplantadas, elas experimentam maior intensidade luminosa, e conseqüentemente, maior atividade fotossintética. Nesse sentido, mudanças estruturais na lâmina foliar podem ser vistas como resposta às condições ambientais novas. O desenvolvimento do parênquima paliçádico em múltiplas camadas, com células longas, possibilita maior capacidade fotossintética quando sujeitas à maior luminosidade (OGUCHI et al., 2003). Isso ocorre porque aumenta a superfície da membrana plasmática possibilitando proximidade de maior número de cloroplastos, levando a maior difusão de gás carbônico, pois esta é mais rápida na fase gasosa do que na líquida (OGUCHI et al., 2003).

Segundo Vogelmann et al. (1993), a forma colunar das células do parênquima paliçádico facilita a penetração de luz no parênquima esponjoso. As células em paliçada atuam como guia de luz, transmitindo-a através dos vacúolos tubiformes e dos espaços de ar intercelulares (TERASHIMA; INOUE, 1985).

O parênquima esponjoso de folhas desenvolvidas *in vitro* apresenta espaços intercelulares mais desenvolvidos quando comparados com folhas *ex vitro* (KHAN et al., 2003; HAZARIKA, 2006). De acordo com Lee et al. (1990), folhas desenvolvidas em menor luminosidade são mais delgadas, com reduzido número de camadas paliçádicas e, proporcionalmente, com mais parênquima esponjoso.

O complexo estomático é uma estrutura epidérmica responsável pelas trocas gasosas e de vapor de água entre a planta e o meio. Ocorre principalmente nas folhas. É constituído pelas células anexas ou subsidiárias, pelas células-guarda ou oclusoras e pelo poro estomático (RODRIGUES et al., 2010).

Os estômatos em plantas cultivadas *in vitro* estão relacionados significativamente com a capacidade de fotossíntese e o processo de aclimatização (IACONO; MARTINELLI, 1998). Pospíšilová et al. (1999) citam que os estômatos de plantas sob este sistema de cultivo são malformados, mais arredondados, reduzidos em número e inábeis para a função, tornando as plantas mais suscetíveis à desidratação na fase de aclimatização.

Estudos estruturais morfológicos e anatômicos aliados a testes histoquímicos em folhas de espécies com potencial econômico poderão contribuir para a caracterização ecofisiológica dessas espécies (FANK-DE-CARVALHO; GRACIANO-RIBEIRO, 2005).

2.5 MICROPROPAGAÇÃO VEGETAL

A micropropagação é considerada de grande importância na cultura de tecidos, pela praticidade na obtenção do material vegetal (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A maioria das espécies apresenta potencialidades para a regeneração *in vitro*, desde que as exigências nutricionais, hormonais e ambientais sejam satisfatórias (PIZA; PINHO, 2002).

Um dos princípios básicos da cultura de tecidos é a totipotencialidade das células, que nada mais é do que a capacidade de uma célula originar um novo indivíduo, por conter toda a informação genética necessária para a regeneração completa de outra planta (CID, 2001).

A tecnologia do cultivo *in vitro*, apoiada por um trabalho sistemático de seleção de características desejáveis, pode contribuir para a obtenção de plantas de qualidade garantida e em menor tempo em relação aos métodos tradicionais de propagação (TORREJÓN, 1997).

A micropropagação destina-se, principalmente, àquelas espécies de difícil propagação. É uma importante estratégia para o melhoramento, clonagem e multiplicação de plantas em larga escala, e para obtenção de plantas livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e genética (VILLALOBOS; THORPE, 1991). De acordo com França (2003) a regeneração *in vitro* por meio da cultura de brotos, é uma ferramenta especialmente vantajosa para obtenção de clones que mantenham todas as características da planta mãe a qual permite a preservação de genótipos produtores de compostos medicinais, possibilitando explantes assépticos, ou seja, livres de contaminação, para aplicação de técnicas de regeneração por cultura de tecidos e transformação genética (CABRAL et al., 2003)

Esta técnica tem vantagens sobre a propagação convencional para a grande maioria das plantas propagadas vegetativamente, tais como: pode ser usada como alternativa aos métodos convencionais de propagação vegetativa com o objetivo de aumentar a taxa da multiplicação; grandes quantidades de plantas podem ser

obtidas a partir de uma única fonte de explante ou qualquer outro tecido da planta potencialmente responsivo; na retirada dos explantes, a planta original não é destruída no processo, um fator de considerável importância em se tratando da raridade da planta; maior número de plantas obtidas em um espaço de tempo mais curto; propagação contínua ao longo do ano; custo baixo, uma vez estabelecido e otimizado o protocolo de micropropagação; armazenamento a longo prazo de germoplasma, além da possibilidade de troca e intercâmbio entre as instituições de pesquisas (GUEDES, 2008). Com a utilização dos métodos de micropropagação, o produtor pode ter acesso a plantas de alta qualidade genética de produtividade uniforme, com isso promover impacto no mercado de plantas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para a fundamentação dos métodos de micropropagação é necessária: a seleção dos explantes adequados, estabelecendo-se condições de desinfestação; o estabelecimento de condições físicas e fisiológicas de desenvolvimento dos explantes, e o enraizamento das partes aéreas formadas após subcultivos sucessivos, formando a planta completa (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990). Entretanto, o sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de fatores que vão desde a coleta e manipulação da planta matriz até a aclimatização e plantio no campo das novas plantas (BOMFIM, 2006).

Segundo Pasqual et al. (2001), a micropropagação em condições laboratoriais envolve as seguintes etapas: seleção do material (1), estabelecimento (2), multiplicação (3), alongamento e enraizamento (4) e aclimatização (5).

A primeira etapa, considerada a fase inicial do cultivo *in vitro*, é caracterizada pela preparação das plantas matrizes, destinadas ao fornecimento dos explantes primários para o cultivo *in vitro* (WILLADINO; CAMARA, 2005). De modo geral, os melhores explantes são aqueles obtidos a partir de plantas matrizes sadias, vigorosas, isentas de qualquer tipo de estresse e em pleno crescimento vegetativo.

Podem ser selecionados vários tipos de explantes para iniciar a propagação *in vitro* de uma planta já que, teoricamente, qualquer tecido vegetal apresenta totipotência de suas células. Na prática, os explantes mais usados são os que possuem maior proporção de tecido meristemático ou que apresentam maior capacidade de expressar a totipotência (TORRES et al., 1998).

Na planta matriz, os melhores explantes primários são aqueles localizados próximos à região apical, com intensa atividade meristemática (PASQUAL et al.,

2001). Esses tecidos meristemáticos possuem maior estabilidade na regeneração de plantas, não havendo necessidade de formação de calo (LAMEIRA et al., 2000).

A segunda etapa, segundo Torres et al. (1998), engloba os seguintes processos: coleta, desinfestação, isolamento e cultivo dos explantes em meio de cultura sob condições assépticas.

A desinfestação dos explantes é um fator bastante importante na introdução da cultura *in vitro*. Se esta etapa não for realizada de forma adequada, todo o processo fica comprometido pela ocorrência de contaminações por fungos e/ou bactérias. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é bastante utilizado para desinfestações e sua concentração pode variar de 0,25 a 2,5% v/v, dependendo do material vegetal e do período pelo qual o tecido é exposto, sendo que diferentes partes de uma planta apresentam respostas variadas quanto à sensibilidade das soluções desinfestantes (GEORGE, 1993).

A remoção das soluções desinfestantes do tecido vegetal normalmente é feita através de sucessivas lavagens com água destilada ou deionizada, e autoclavada. Tombolato e Costa (1998) elucidam que a maneira mais usual de realizar a desinfestação (esterilização) do explante de plantas ornamentais é através da lavagem em álcool (70%), por um minuto, seguida de imersão em solução de hipoclorito de cálcio ou de sódio (1 a 2%), por cinco a quinze minutos, adicionando gotas de detergente, com 2 ou 3 lavagens sucessivas em água destilada e esterilizada.

O isolamento dos explantes é efetuado somente em câmara de fluxo laminar, com a máxima higiene e assepsia, tanto do ambiente e do explante, como também da pessoa que está realizando a tarefa. A manipulação correta do explante nesta fase determina a sua sobrevivência. Satisfeita essa condição, o explante é isolado e, posteriormente, transferido para um meio de cultura (TORRES et al., 1998). Um fator determinante da sobrevivência dos explantes durante os estágios iniciais é o fornecimento adequado de nutrientes. Este deve conter em sua composição sais e vitaminas necessárias ao desenvolvimento da planta durante essa fase (OLIVEIRA, 2009).

Diversos meios de cultura podem ser utilizados no início do cultivo, porém, o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e suas modificações têm apresentado bons resultados para diversas espécies. Fitorreguladores (citocininas, auxinas e giberelinas) também são aplicados ao meio, com o objetivo de suprir as possíveis

deficiências de teores endógenos de hormônios e de estimular o alongamento e a multiplicação dos explantes (TORRES et al., 1998).

A terceira etapa da micropropagação é caracterizada pela multiplicação de propágulos, através de sucessivos subcultivos em meio próprio de multiplicação. As partes aéreas formadas ou são subdivididas em partes menores, ou são isoladas das demais para a formação de novos explantes. Embora o objetivo principal seja produzir o maior número possível de plantas no menor espaço de tempo, alguns aspectos qualitativos devem ser considerados, como a qualidade e a homogeneidade das partes aéreas produzidas (BOMFIM, 2006).

De acordo com Tombolato e Costa (1998), dos macronutrientes minerais existentes, o nitrogênio é o mais estudado nos meios de cultura. Torres et al. (1998) afirmam que, na fase de multiplicação, a fonte de nitrogênio e o balanço entre os íons nitrato e amônia são os aspectos que têm requerido maior atenção. Os fitorreguladores de maior uso nesta fase, segundo Pasqual et al. (2001), são as citocininas, as auxinas e as giberelinas. Sendo as citocininas de maior utilização, devido ao seu efeito na quebra de dominância apical e na proliferação de gemas axilares.

As condições ambientais da sala de crescimento são consideradas de grande importância para o melhor desenvolvimento das plantas. Principalmente no quesito luminosidade e temperatura, tendo em vista que a fase de multiplicação é considerada a mais longa de todo o processo (PASQUAL et al., 2001; OLIVEIRA, 2009).

A manutenção correta dos explantes é responsável pela qualidade e uniformidade das mudas obtidas no final da fase de multiplicação. Os aspectos mais importantes, nesse sentido, são o número e a frequência das subculturas, o tipo e o tamanho dos explantes e os cuidados na repicagem (TORRES et al., 1998).

Na quarta etapa, as partes aéreas obtidas na multiplicação são transferidas para meio de alongamento e enraizamento. O objetivo desta etapa é a promoção do alongamento das brotações e a formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, para permitir o posterior transplante para o meio externo (BOMFIM, 2006).

O alongamento é uma fase necessária e preparatória para o enraizamento das brotações. Seu uso, no entanto, só se justifica quando as brotações oriundas da multiplicação são muito pequenas. Os métodos mais adotados para promover o

alongamento são: adição de ácido giberélico (GA₃), redução da concentração de citocininas, estiolamento, remoção de folhas, uso do meio de duas fases e emprego de inibidores de ação do etileno (PASQUAL et al., 2001).

O enraizamento *in vitro* ocorre sob condições controladas, com brotações pequenas e alto percentual de enraizamento. Apesar das vantagens, esse método possui uma limitação principal, que é a dificuldade de indução de um sistema radicular adventício, eficiente na absorção de água e nutrientes, após as plantas serem transferidas para os substratos (BOMFIM, 2006; PASQUAL et al., 2001).

A quinta etapa consiste na aclimatização das plântulas micropropagadas, onde ocorre a transferência das plântulas obtidas *in vitro* para outro tipo de condições de ambiente e substrato, visando à adaptação gradativa das plântulas (MOREIRA, 2001). Essa etapa é fundamental dentro do programa da cultura de tecidos, pois em alguns casos pode ser um fator limitante no processo de micropropagação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

As folhas de plantas micropropagadas apresentam pouca quantidade de ceras epicuticulares, cutícula mais fina, menor quantidade de clorofila e baixa funcionalidade dos estômatos sob condições de baixa umidade relativa do ar (SUTTER, 1998). As raízes apresentam pouca funcionalidade na absorção de água e nutrientes. Geralmente são quebradiças, e morrem ao serem transferidas para o solo, devido a baixas conexões vasculares que se formam entre as raízes e as brotações (GEORGE, 1996).

A etapa de aclimatização exige que as plantas produzam novas raízes em substratos porosos, com condições físicas e nutricionais adequadas (PEDROTTI; VOLTOLINI, 2001). Como estratégias adaptativas, as plantas aclimatizadas devem desenvolver mecanismos de controle da transpiração e condutância estomática (DIAZ-PEREZ et al., 1995; POSPISILOVÁ et al., 1999), ativar os mecanismos de controle de perda de água pelas células (SUTTER, 1998) e aumentar a taxa fotossintética em condições de atmosfera mais rica em CO₂ (VANTELGEN et al., 1992).

Segundo Hararika (2003) um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas não consegue sobreviver à transferência brusca do ambiente *in vitro* para o campo. A mudança de um ambiente protegido, estéril, com açúcares e com umidade saturada, para um ambiente não-estéril, sem açúcares e com reduzida umidade, tem resultado na perda de plantas, baixa taxa de crescimento e período

prolongado na obtenção de plantas completamente aclimatizadas (SOUZA JÚNIOR; BARBOZA et al., 2001).

De acordo com Sutter (1998), quando transferidas para a aclimatização, plantas enraizadas *in vitro* são submetidas a uma condição de alta transpiração, que associada à alta condutividade hídrica, provoca baixa funcionalidade ou ausência de controle sobre o fechamento dos estômatos. Além disso, as raízes produzidas *in vitro* são fracas e pouco funcionais, devendo ser substituídas o mais rápido possível, fato este que só irá ocorrer mantendo-se a planta com baixa transpiração (PIERIK, 1990). Segundo MacClelland (1990), as raízes formadas *in vitro* são pouco funcionais, por não apresentarem pêlos radiculares, além de propiciarem pouca conexão vascular com a parte aérea das plantas, resultando numa restrita transferência de água e nutrientes para a parte aérea, comprometendo o crescimento.

Estudos são necessários para otimizar o processo de aclimatização, o qual consiste em modificações morfológicas, anatômicas e fisiológicas das plantas contribuindo para diminuir a possibilidade de estresse, para que as mesmas possam sobreviver e crescer vigorosamente em um novo ambiente (BRAINERD; FUCHIMGAMI, 1981; GRATAPAGLIA; MACHADO, 1998; CARVALHO et al., 1999; HARARIKA, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e análises anatômicas foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LABMOL), da Embrapa Acre e no Laboratório de Tecidos Vegetais da Universidade Federal do Acre (UFAC). A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada no Laboratório de Bioimagem da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF.

3.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para a realização dos experimentos, utilizou-se como fonte de material vegetal folhas saudáveis, do segundo e terceiro nós, das espécies *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum* desenvolvidas em três condições de cultivo: cultivo *in vitro*, cultivo *ex vitro* (aclimatização) e cultivo *in vivo* para os estudos anatômicos.

3.1.1 Cultivo *in vitro*

Sementes de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos, seguidas de tríplice lavagem em água esterilizada e autoclavada. O meio de cultura básico utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 6 g.L⁻¹ de Ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,2 antes da adição do Ágar e da autoclavagem, realizada por 15 minutos a 121 °C e 1,3 atm de pressão. As sementes foram inoculadas em frascos de 250 mL contendo 30 mL de meio, cada frasco foi constituído por 5 sementes, vedados com filme plástico transparente (Figura 3).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de 25±2 °C, dispondo de lâmpadas fluorescentes e radiação ativa fotossintética de 30 µmol.m⁻².s⁻¹, expostas a fotoperíodo de 16 horas de luz.

Após 60 dias de cultivo *in vitro*, para os estudos anatômicos, realizou-se a retirada aleatória de plântulas com posterior coleta de suas folhas a partir do 2º e 3º nós. As plântulas retiradas foram seccionadas na base (próximo ao colo) para a inoculação em meio de enraizamento. O enraizamento das plântulas formadas *in vitro* foi realizado em meio de cultura de MS, suplementado com 15 g.L⁻¹ de sacarose e 1,5 g.L⁻¹ de carvão ativado por um período de 30 dias.

3.1.2 Cultivo *ex vitro*: aclimatização das plântulas de *P. hispidinervum* e *P. aduncum*

O enraizamento das plântulas formadas *in vitro* foi realizado em frascos de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura MS e suplementado com $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de carvão ativado por um período de 30 dias. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,2$ antes da adição do Ágar e da autoclavagem, realizada por 15 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e $1,3 \text{ atm}$ de pressão.

Após este período, as plântulas enraizadas *in vitro* foram retiradas dos frascos e lavadas em água corrente para eliminar o excesso do meio de cultura aderido nas raízes. Em seguida, as plântulas foram transferidas para a casa de vegetação tecnológica e acondicionadas em tubetes plásticos (6,5 cm de diâmetro x 14 cm de altura) contendo substrato plantmax[®], e distribuídas aleatoriamente de forma que todas pudessem receber a mesma irradiância. No período de 45 dias foi realizado o transplântio das plantas para sacos plásticos de 1 kg contendo solo esterilizado (Figura 3).

As plantas foram mantidas em casa de vegetação tecnológica suspensas cerca de 0,5 m do solo, sendo mantidas em telados cobertos, sem redução da radiação solar. A irrigação foi feita por nebulização com ajuda de microaspersores, distantes aproximadamente 1,2 m de altura, de onde foram acondicionados os tubetes e sacos plásticos, com vazão nominal de 60 L/H/m^2 e controlados por um temporizador digital (*Timer*), com umidade relativa de 80% e temperatura média de $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Após 60 dias de aclimatização, foi realizada a retirada aleatória de plântulas com posterior coleta de suas folhas a partir do 2^o e 3^o nós, para os estudos anatômicos.

3.1.3 Cultivo *in vivo*

As plantas cultivadas *in vivo* de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* foram plantadas por semeadura e mantidas a campo no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Acre desde 1995 (Figura 3), sendo que anualmente são realizadas adubações, podas e renovação das plantas antigas.

As folhas obtidas do 2º e 3º nós dessas plantas foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos com hidratação interna e transportadas até o laboratório onde foram mantidas em geladeira.

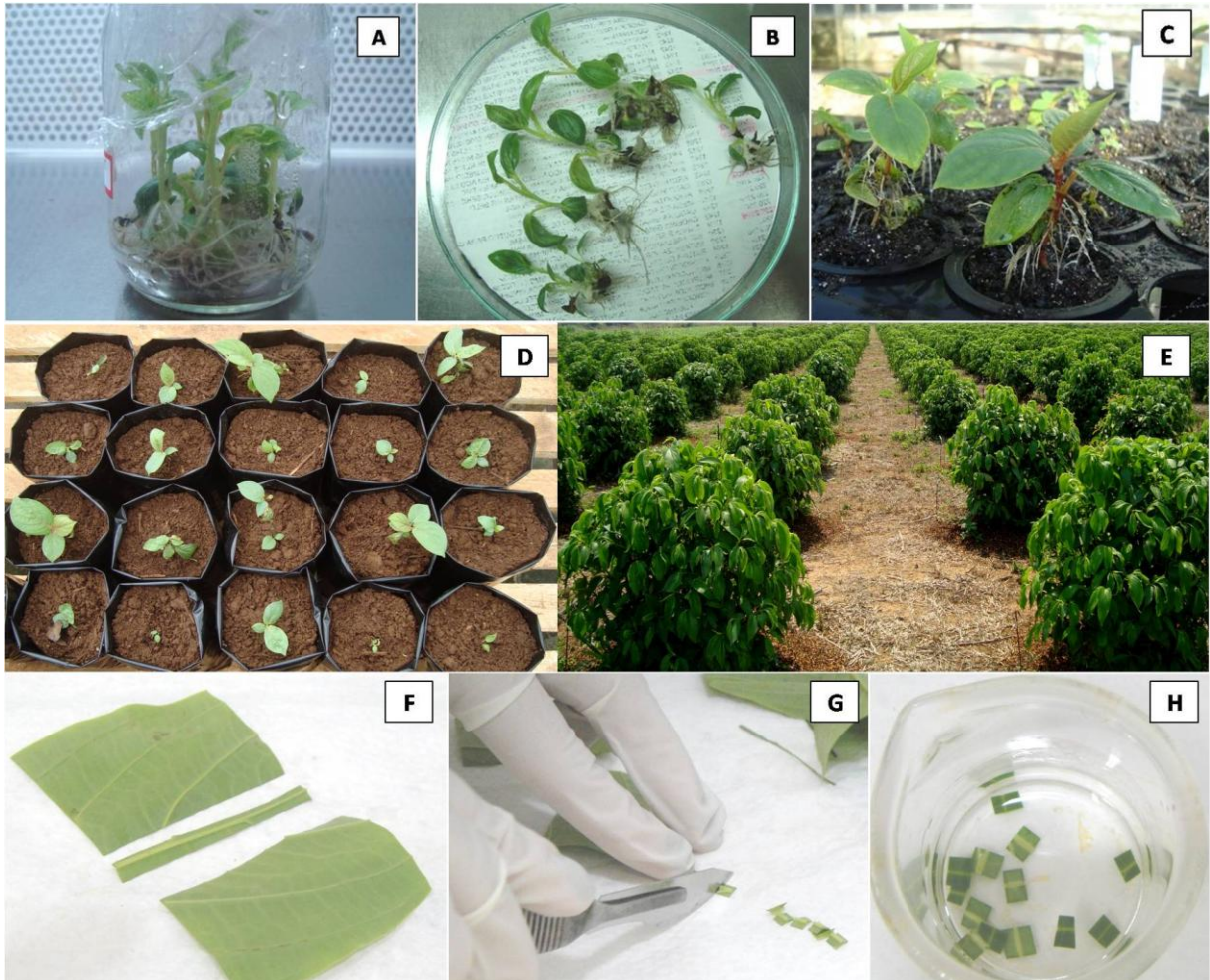


FIGURA 3: Diferentes condições de cultivo utilizadas para as espécies no presente estudo. A e B. Cultivo *in vitro*; C e D. Cultivo *ex vitro*; E. Cultivo *in vivo*; F, G e H. Secção na região do terço médio da folha em aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$, metodologia utilizada em todas as condições de cultivo para análises anatômicas

3.2 ANATOMIA DA LÂMINA FOLIAR

Para as análises anatômicas da lâmina foliar foram retiradas três folhas de cada um dos tratamentos: *in vitro*, *ex vitro* (aclimatização) e *in vivo* das espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum* e observados 30 campos visuais, considerando a lente ocular do microscópio óptico (Olympus CH30), a partir do terço médio do limbo.

3.2.1 Espessura dos tecidos da lâmina foliar e mesofilo

As imagens das lâminas permanentes obtidas a partir de secções transversais da lâmina foliar foram projetadas em folha de papel, com auxílio de câmara clara (Opton) acoplada em microscópio óptico (Olympus CH30). Os contornos de abrangência das células epidérmicas e hipodérmicas, parênquimas paliçádico e esponjoso, constituintes da lâmina foliar, foram demarcados. Foi verificada também a presença de tricomas nas células epidérmicas. As medições foram aferidas com escala micrométrica, de modo a apresentar os resultados em micrômetros (μm).

3.2.1.1 Preparação do material vegetal para microscopia óptica

Para confecção de lâminas permanentes, o protocolo foi ajustado para cada espécie (*P. hispidinervum* e *P. aduncum*). O material coletado foi fixado em FAA 55 para folhas de *P. hispidinervum* e FAA 50 para folhas de *P. aduncum* (formaldeído, ácido acético, etanol 55% e 50%) por 48 horas. Nas primeiras 24 horas o material permaneceu no vácuo para completa retirada de bolhas de ar dos espaços intercelulares, e posteriormente foi conservado em etanol 70% sob refrigeração (JOHANSEN, 1940). Os segmentos foliares foram desidratados em série etílica e isopropílica (80%, 90% e 100%I e 100%II) gradual por 30 minutos, e incluídos em parafina. Os blocos foram seccionados em micrótomo de rotação (Leica RM 2125 RT) com espessura de 10 μm . As secções foram fixadas sobre lâminas, utilizando-se o adesivo de Bissing (BISSING, 1974), e distendidas sobre chapa aquecedora (50 °C). Após a secagem das lâminas foi realizada a coloração com safranina/fast-green (JOHANSEN, 1940), e posteriormente, a montagem lâmina-lamínula com bálsamo do Canadá.

3.2.2 Classificação e distribuição dos estômatos

Através das observações em microscópio óptico da marca Olympus CH30, foi verificada a distribuição dos estômatos nas faces adaxial e abaxial de folhas de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*, sendo estas classificadas como epi, hipo ou anfiestomáticas. Além da distribuição, foi também classificado o tipo de estrutura dos

estômatos em folhas de plantas submetidas a diferentes ambientes (*in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*).

3.2.3 Densidade e dimensão estomática

A contagem do número de estômatos por área (mm^2) foi realizada em microscópio óptico, utilizando lâminas preparadas para observações em vista frontal da superfície epidérmica, considerando-se apenas as zonas intercostais. As imagens foram projetadas, com auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio óptico, sobre área delimitada conhecida ($100 \times 100 \mu\text{m}$).

A determinação das dimensões das células-guarda foi feita considerando o comprimento (eixo longitudinal, entre os dois pólos da célula) e largura (eixo transversal, na porção média da célula), quando em vista frontal da superfície epidérmica. Para a mensuração das dimensões do poro também foram considerados o eixo longitudinal e o transversal. Para as medições, as imagens foram projetadas, com auxílio de câmara clara acoplada ao microscópio óptico (Olympus CH30), sobre o papel e aferidas em escala micrométrica, de modo a apresentarem os resultados em micrômetros.

3.2.3.1 Preparação do material vegetal para microscopia óptica

Para a mensuração dos estômatos, foram preparadas lâminas temporárias através de secções paradérmicas à mão livre, com auxílio de lâmina de barbear. Para a *P. hispidinervum* foram visualizadas a epiderme adaxial e abaxial e para a *P. aduncum* foi visualizada apenas a epiderme abaxial, devido à frequência dos estômatos na face adaxial ser rara, portanto, inviável a análise nesta face. Em seguida, as secções foram submetidas à diafanização com hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) e uma lavagem em água destilada.

O preparo do material vegetal para fotomicrografia foi realizado a partir da técnica de dissociação da epiderme adaxial e abaxial das folhas. Os cortes frescos foram colocados em frasco de vidro fechado contendo uma mistura de peróxido de hidrogênio 30% e ácido acético glacial 1:1 (v/v), e incubados em estufa a 60 °C, por 48 horas. Após esse tempo, os cortes passaram por uma sequência de 10 lavagens em água destilada, 15 minutos cada, foram lavados em etanol 50%, corados durante

24 horas em safranina 1% em etanol 50% e lavados 3 vezes em etanol 30%. As epidermes já dissociadas foram montadas entre lâmina e lamínula com glicerina 50%, e vedadas com esmalte incolor (KRAUS; ARDUIN, 1997; FRANKLIN, 1945).

3.2.3.2 Preparação do material para microscopia eletrônica de varredura

As eletromicrografias dos estômatos e tricomas das espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum* foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (Zeiss DSM 962) do Laboratório de Bioimagem da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF.

As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2, por 48 horas, lavadas por 3 vezes em tampão fosfato de sódio 0,1M. Em seguida realizou-se uma pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% por 2 horas, novamente lavado por 3 vezes em tampão fosfato de sódio e lavado uma vez em água destilada, ambos por 5 minutos. O material foi desidratado em série etílica lenta e gradual por 2 vezes de 15 minutos, e conservado em etanol 70% sob refrigeração. Em seguida, foram processadas em secador de ponto crítico, fixadas em suportes metálicos (stubs) com fita adesiva dupla face de carbono e metalizadas com película de ouro.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado para cada uma das condições de cultivo em ambas as espécies. Avaliaram-se parâmetros morfométricos anatômicos nas três condições de cultivo (tratamentos). Os tratamentos foram constituídos por oito repetições (campos visuais no microscópio), e cada repetição foi constituída por secções histológicas de três indivíduos.

Os dados foram submetidos aos procedimentos de detecção de *Outliers* pelo teste de Grubbs (1969). As médias foram submetidas ao teste de normalidade dos resíduos (SHAPIRO; WILK, 1965) e teste de homogeneidade (BARTLETT, 1937). Os dados das variáveis que não atenderam a um ou ambos os pressupostos foram transformados para normalização dos resíduos e/ou homogeneização das variâncias. As médias foram comparadas pelo teste Tukey (1949) a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANATOMIA DA LÂMINA FOLIAR

A folha de *P. hispidinervum* em vista frontal apresenta células epidérmicas irregulares e ligeiramente curva com diferença no tamanho, sendo maiores na face adaxial e menores na face abaxial (Figuras 4 e 5). Nascimento e Vilhena-Potiguara (1999) trabalhando com a espécie *Piper hispidinervum* observaram células epidérmicas com paredes retas ou ligeiramente curvas. Segundo Alquini et al. (2003), a sinuosidade da parede anticlinal está relacionada com o ambiente em que a folha se desenvolve. De acordo com Albiero et al. (2005a), a epiderme da face adaxial e abaxial da espécie *P. crassinervium*, quando analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), é constituída por células cúbicas e retangulares, cobertas com cutícula fina de aspecto liso. O mesmo foi observado em *P. hispidinervum* sob os diferentes tipos de ambiente avaliados.

No presente estudo, verificou-se que em corte transversal a epiderme da espécie *P. hispidinervum* possui parede periclinal externa e interna do tipo convexa na face adaxial nos sistemas de cultivos.

Sob a epiderme existe uma ou duas camadas celulares, caracterizada como hipoderme, onde pode ocorrer idioblastos oleíferos. Essa camada celular múltipla também foi definida como hipoderme em *Piper* L. ssp. (YUNCKER, 1972), *P. aduncum* L. (VIANNA; AKISUE, 1997), *P. hispidinervum* C. DC. (NASCIMENTO; VILHENA-POTIGUARA, 1999) e *P. hispidum* Sw. (ALBIERO et al., 2006). Segundo Fahn (1990), a hipoderme é o tecido que se situa sob a epiderme, sendo composta por um ou mais estratos específicos de células estruturalmente diferenciadas da epiderme. Souza et al. (2004), em estudo ontogênico da folhas de *P. diospyrifolium* analisaram a existência de divisões periclinais na protoderme, formando uma epiderme adaxial multisseriada. Em *P. gaudichaudianum*, Albiero et al. (2005b) verificaram a presença de uma ou duas camadas subepidérmicas em ambas as superfícies foliares, porém, não realizaram estudo ontogênico dessas camadas.

Nos três cultivos testados em *P. hispidinervum* verificou-se a presença de tricomas do tipo tector e glandular, nas faces adaxial e abaxial da folha (Figuras 6 e

7). Os tricomas tectores variaram entre unicelulares e multicelulares, ambos unisseriados, sendo dependentes das condições de cultivo. Os tricomas tectores do cultivo *in vitro* são menores com relação aos tricomas observados nas folhas das plantas submetidas as condições cultivo *ex vitro* e *in vivo*, sendo predominantes na nervura principal da folha. Os tricomas glandulares são mais abundantes na face abaxial e raros na face adaxial do cultivo *in vitro*. Em *Piper regnelli* var. *regnelli*, Silva e Machado (1999) destacaram a ocorrência de dois tipos de tricomas, ambos secretores, denominados pelas autoras de glândula perolada e tricoma saculiforme. Em *Piper regnelli* var. *pallescens* ocorrem tricomas glandulares capitados em ambas as faces, raros tricomas tectores pluricelulares, unisseriados e de extremidade afilada, estes últimos sob as nervuras (PESSINI et al., 2003).

Segundo Barboza et al. (2006), na superfície da epiderme de plantas cultivadas *in vitro* de abacaxi da cv. Pérola, os tricomas glandulares são uma forma de adaptação morfológica e ainda assim podem atuar na restrição da perda de água pelas folhas, por meio da regulação da temperatura pela reflexão da luz, além de poderem secretar substâncias que protegem as folhas contra parasitas e predadores.

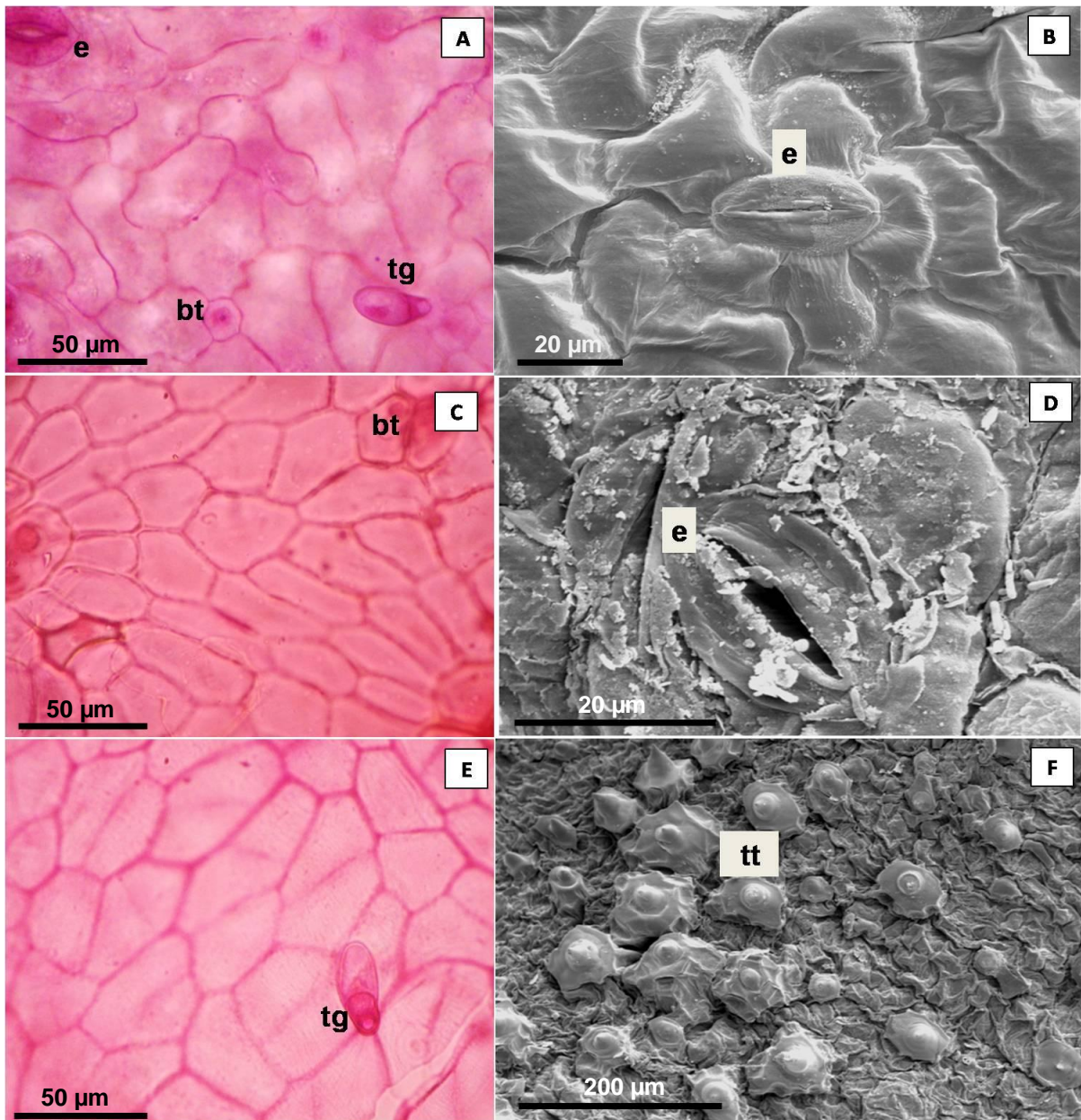


FIGURA 4: Epiderme em vista frontal, da face adaxial de *Piper hispidinervum*. A. Fotomicrografia da epiderme evidenciando a base do tricoma tector, tricoma glandular e estômatos do cultivo *in vitro*; B. Eletromicrografia de varredura mostrando estômato na epiderme adaxial em cultivo *in vitro*; C. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro* evidenciando a base do tricoma tector; D. Eletromicrografia de varredura do cultivo *ex vitro*; E. Fotomicrografia do cultivo *in vivo* com tricoma glandular; F. Eletromicrografia de varredurada do cultivo *in vivo* aspecto geral de tricomas. Legenda: tricoma glandular (tg), estômato (e), base do tricoma tector (bt), tricoma tector (tt)

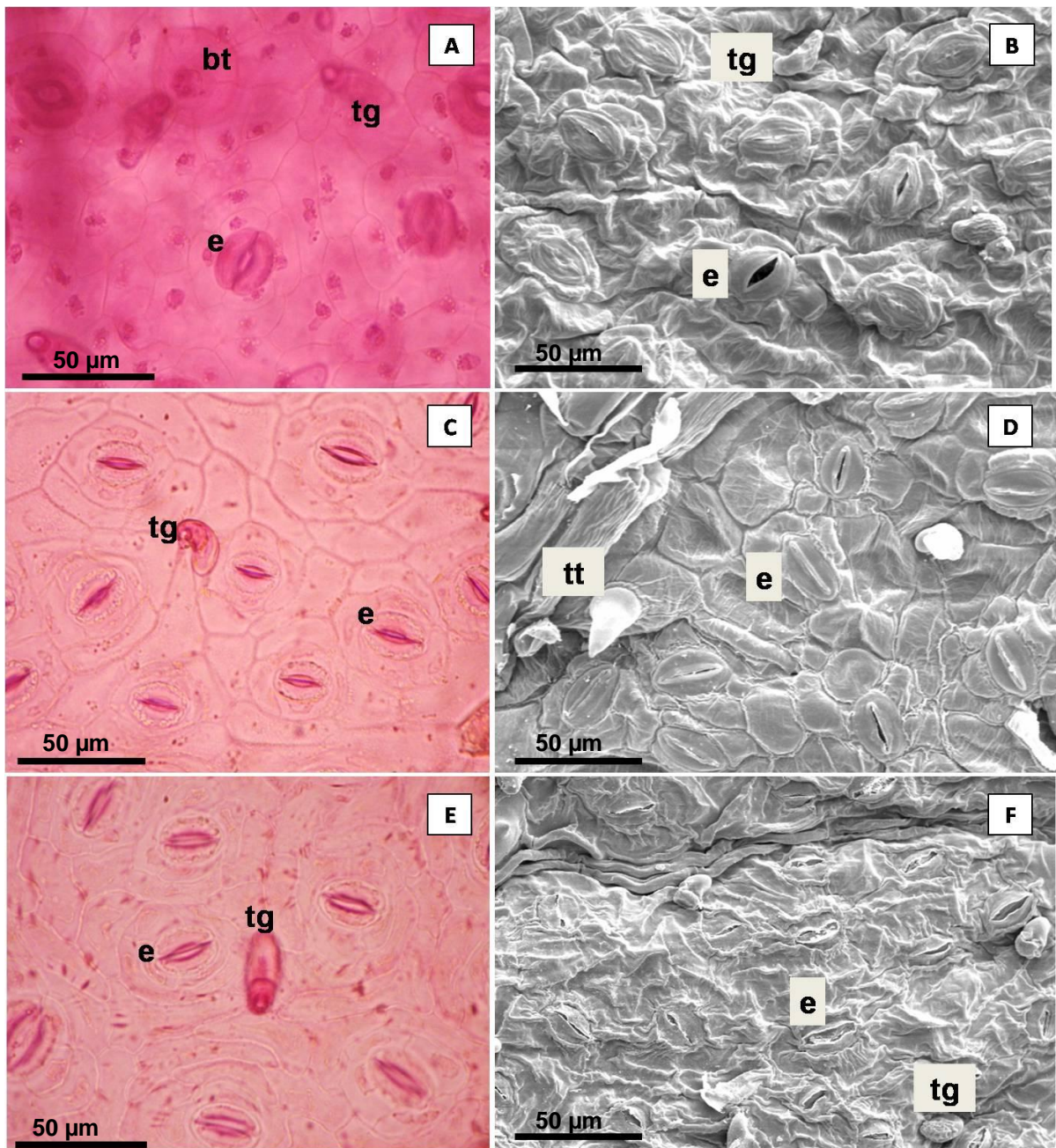


FIGURA 5: Epiderme em vista frontal, da face abaxial de *P. hispidinervum*. A. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; B. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vitro*; C. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; D. Eletromicrografia de varredura do cultivo *ex vitro*; E. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; F. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vivo*. Legenda: tricoma glandular (tg), estômato (e), base do tricoma tector (bt), tricoma tector (tt)

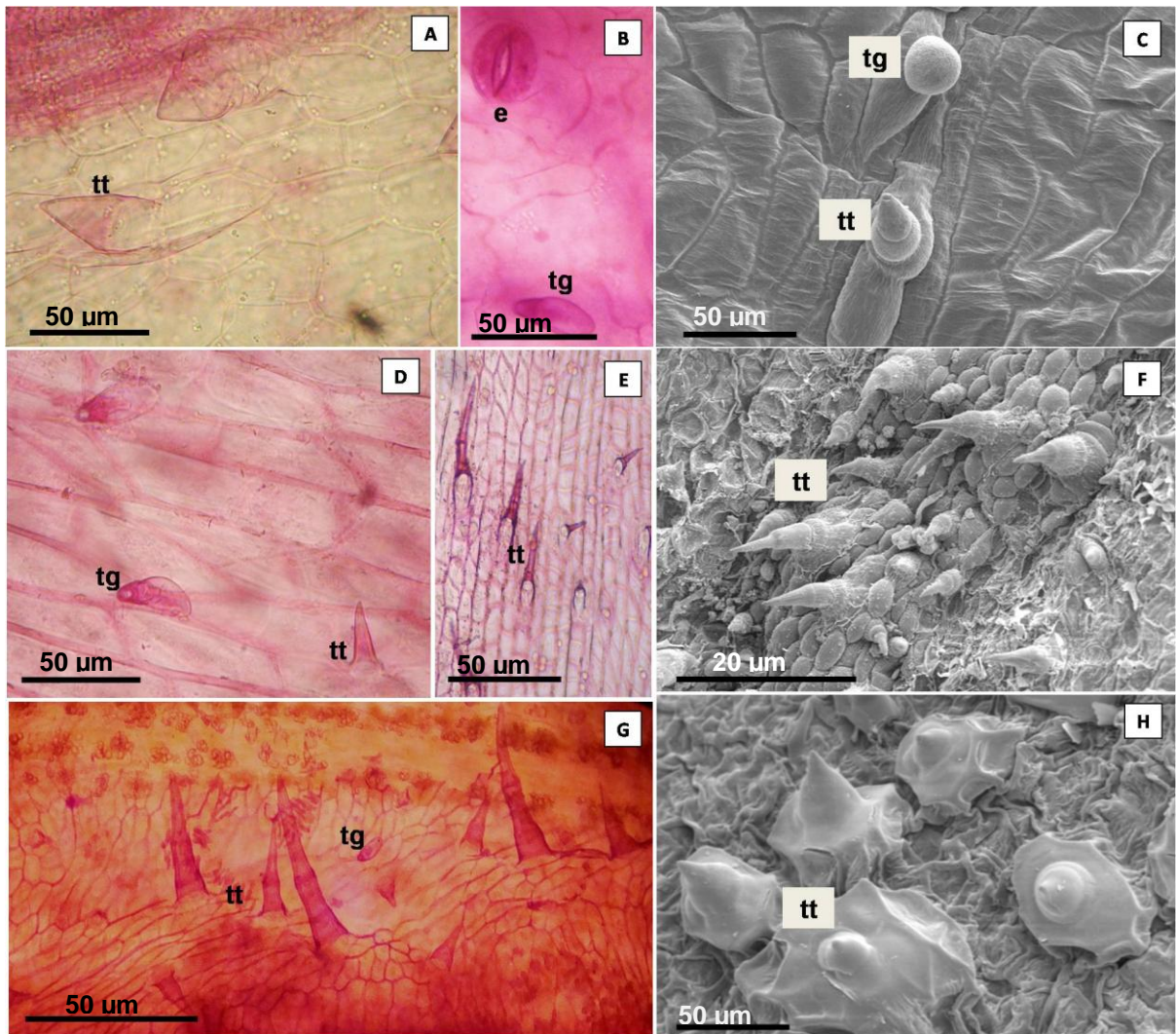


FIGURA 6: Tricomas em vista frontal, da face adaxial das folhas de *P. hispidinervum*. A e B. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; C. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vitro*; D e E. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; F. Eletromicrografia de varredura do cultivo *ex vitro*; G. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; H. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vivo*. Legenda: tricoma tector (tt), tricoma glandular (tg) e estômato (e)

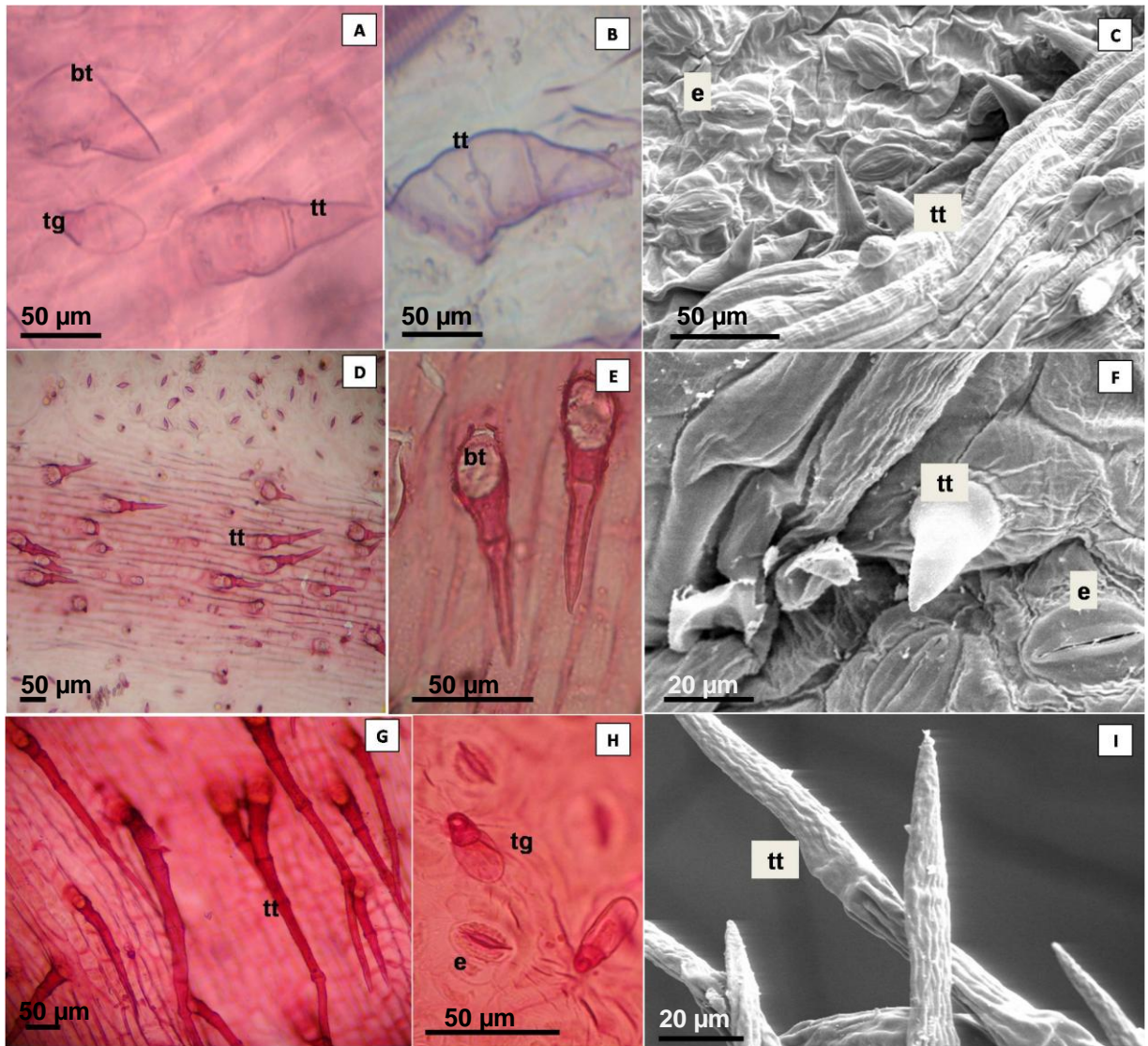


FIGURA 7: Tricomas em vista frontal, da face abaxial das folhas de *P. hispidinervum*.

A e B. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; C. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vitro*; D e E. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; F. Eletromicrografia de varredura do cultivo *ex vitro*; G e H. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; I. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vivo*.
 Legenda: base do tricoma tector (bt), tricoma tector (tt), tricoma glandular (tg) e estômato (e)

Em vista frontal, a epiderme da espécie *P. aduncum* apresenta células irregulares e ligeiramente curvas com diferença nos tamanhos, sendo maiores na face adaxial e menores na face abaxial (Figuras 8 e 9). De acordo com Dousseau (2009), as células epidérmicas da espécie *P. aduncum* de ambas as superfícies foliares, possuem formatos variados, como poligonal, cúbicas e retangulares.

Em secção transversal a epiderme adaxial e abaxial da folhas de plantas do cultivo *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* nesta espécie verificou que esta possui formato retangular e alongado no sentido periclinal. Nascimento e Vilhena-Potiguara (1999) verificaram que para a espécie *P. hispidinervum*, em corte transversal do limbo, a epiderme adaxial e abaxial apresentou tamanhos e formatos semelhantes.

Sob a epiderme foi observada a presença de uma ou duas camadas de células, denominadas de hipoderme. Segundo Dousseau (2009), essa camada de células é sempre contínua e localizada abaixo da epiderme adaxial, sendo menor ou ausente na face abaxial. A existência da epiderme múltipla é comum e bastante discutida entre as Piperaceas. Vianna e Akisue (1997) verificaram em *P. aduncum* a presença dessa camada subcelular apenas na epiderme adaxial, surgidas pelos autores como hipoderme, porém não foi realizado o estudo ontogênico da folha para inferir sobre a identidade do tecido.

Nas folhas das espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum* cultivadas em ambiente *ex vitro* observou-se a presença de uma a três camadas de células múltiplas ou hipodérmicas. Camadas subcelulares em ambas as superfícies da folha também foram constatadas por Albiero et al. (2006), sendo descontínua na face adaxial, contendo uma a três camadas, contínua e frouxa na face abaxial.

Em todas as condições de cultivos testados verificou-se à presença de tricomas do tipo tector e glandular nas faces adaxial e abaxial das folhas (Figuras 10 e 11). Os tricomas tectores variaram entre unicelulares e multicelulares, estando mais concentrados na face abaxial da folha. No cultivo *in vitro*, ocorreu a predominância de tricomas do tipo tector unicelular nas duas superfícies foliares. Entretanto, nos cultivos *ex vitro* e *in vivo* verificou-se a ocorrência de tricomas tectores multicelulares, principalmente na nervura principal da folha.

Os tricomas glandulares foram encontrados nas duas superfícies da folha em todos os sistemas de cultivo testados, porém com predominância na face abaxial. Este tipo de tricoma apresenta um pedúnculo curto inserido entre as células epidérmicas e curvatura voltada sobre as células epidérmicas. Albiero (2005b)

trabalhando com a espécie *P. gaudichaudianum*, observou a presença de tricoma glandular do tipo unicelular e ovóide, possuindo uma porção apical secretora.

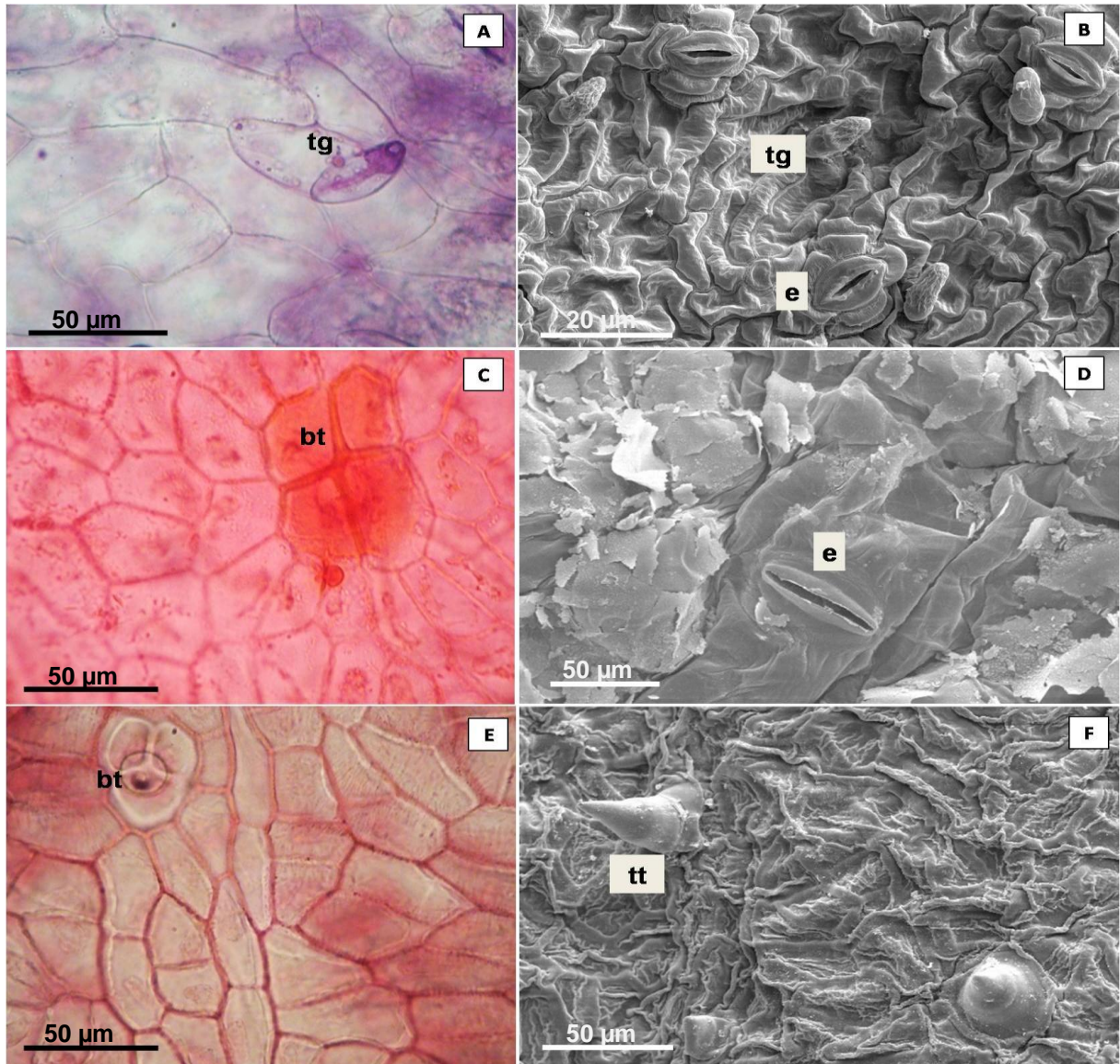


FIGURA 8: Epiderme em vista frontal, da face adaxial da folha de *Piper aduncum*. A. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; B. Eletromicrografia do cultivo *in vitro*; C. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; D. Eletromicrografia do cultivo *ex vitro*; E. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; F. Eletromicrografia do cultivo *in vivo*. Legenda: tricoma glandular (tg), estômato (e), base do tricoma tector (bt) e tricoma tector (tt)

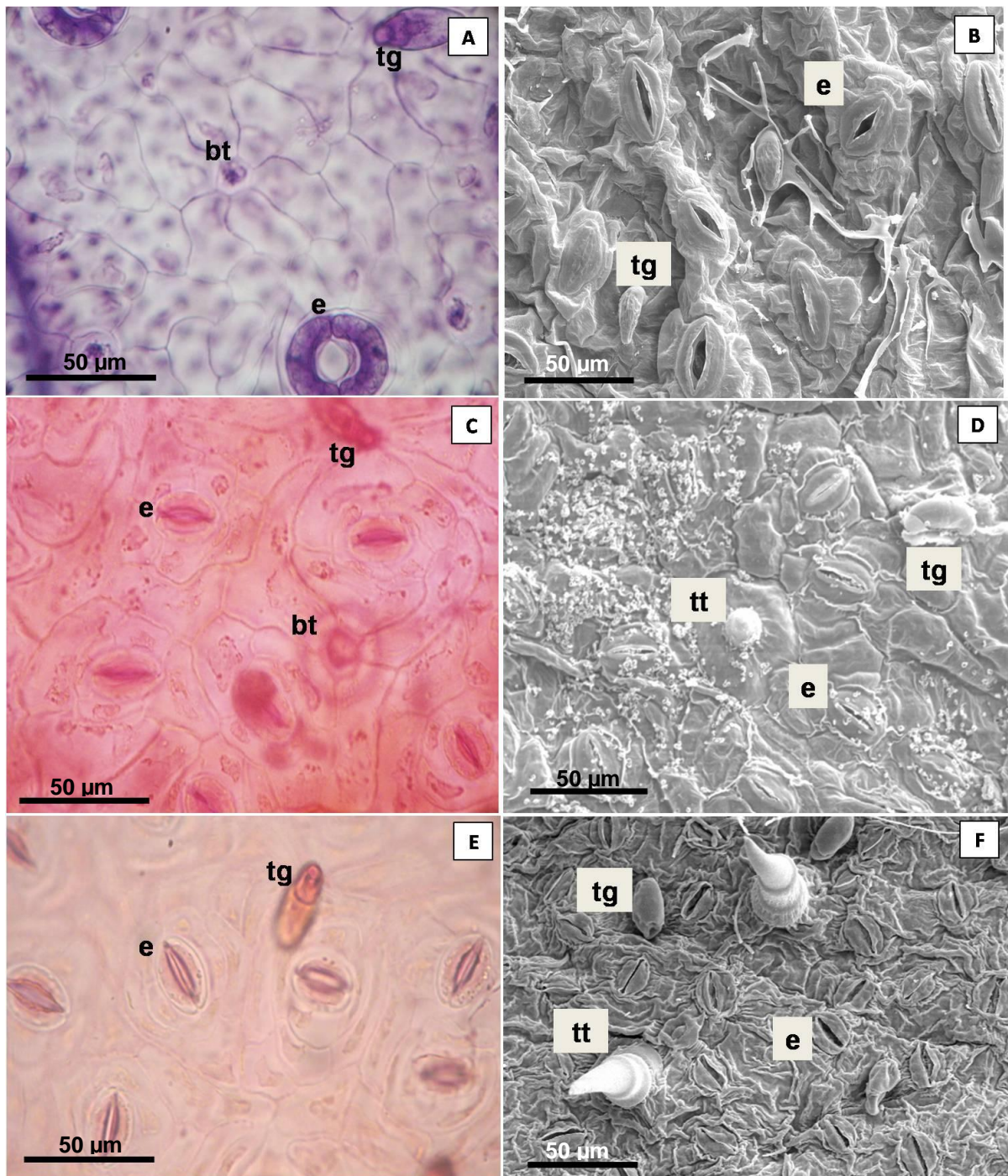


FIGURA 9: Epiderme em vista frontal, da face abaxial da folha de *P. aduncum*. A. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; B. Eletromicrografia do cultivo *in vitro*; C. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; D. Eletromicrografia do cultivo *ex vitro*; E. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; F. Eletromicrografia do cultivo *in vivo*. Legenda: base do tricoma tector (bt), tricoma tector (tt), tricoma glandular (tg) e estômato (e)

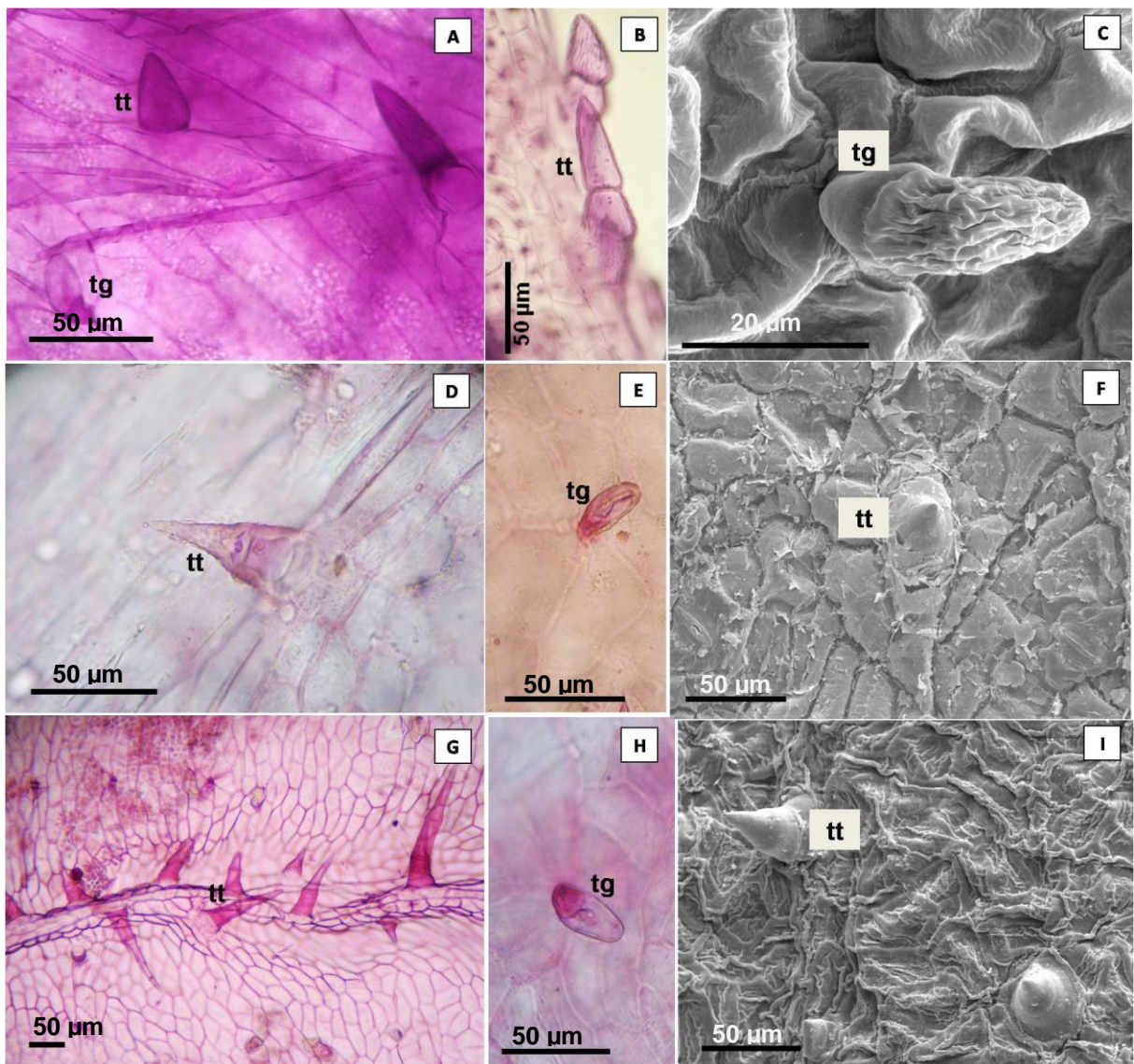


FIGURA 10: Tricomas em vista frontal, da face adaxial folha de *P. aduncum*. A e B. Fotomicrografia do cultivo *in vitro* evidenciando tricoma tector e glandular; C. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vitro*; D e E. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; F. Eletromicrografia de varredura do cultivo *ex vitro*; G e H. Fotomicrografia do cultivo *in vivo* mostrando tricomas tectores sobre a nervura secundária da folha e tricoma glandular; I. Eletromicrografia do cultivo *in vivo*. Legenda: tricoma tector (tt) e tricoma glandular (tg)

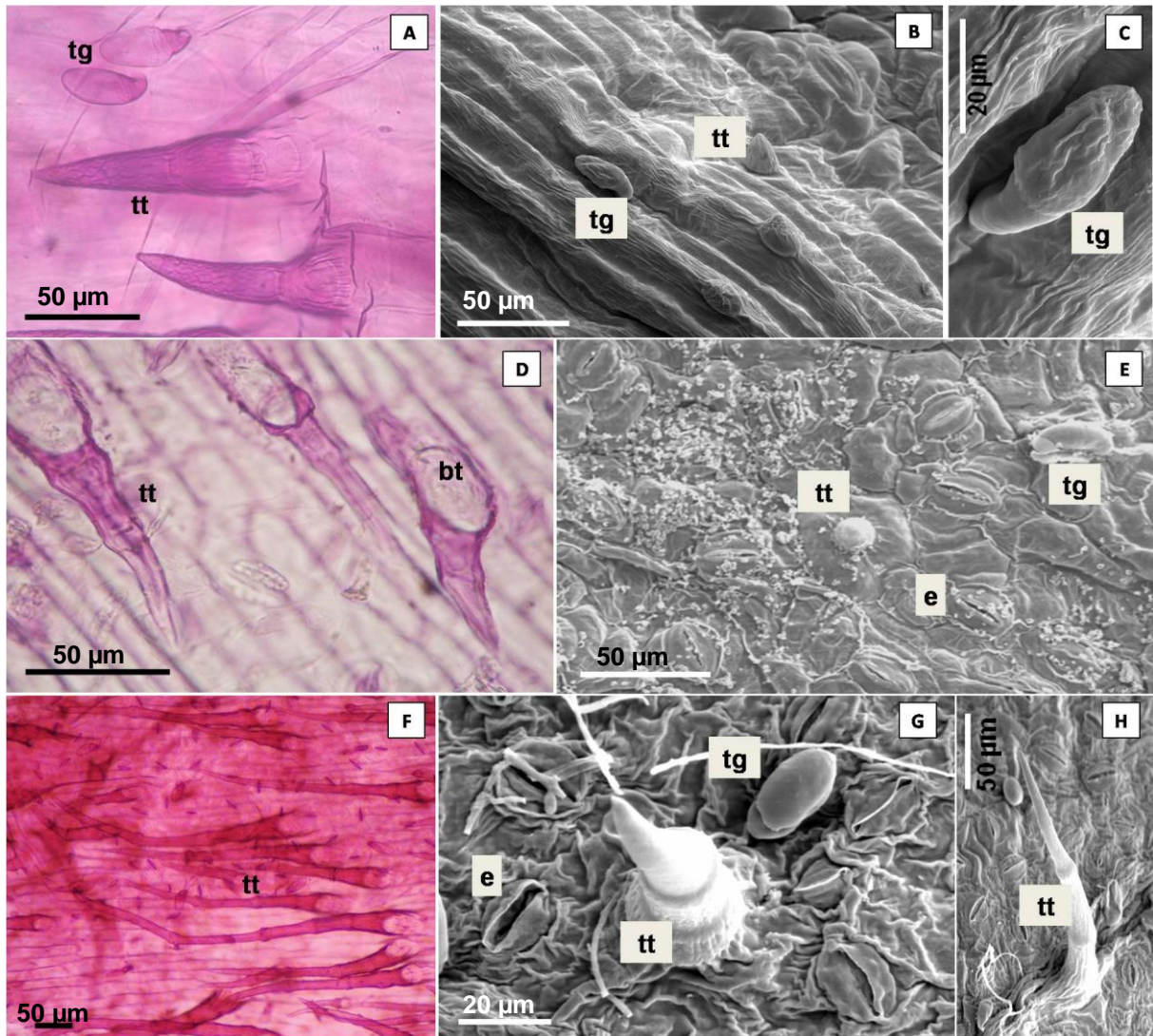


FIGURA 11: Tricomas em vista frontal, da face abaxial da folha de *P. aduncum*. A. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; B e C. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vitro*; D. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; E. Eletromicrografia de varredura do cultivo *ex vitro*; F. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*; G e H. Eletromicrografia de varredura do cultivo *in vivo*. Legenda: base do tricoma tector (bt), tricoma tector (tt), tricoma glandular (tg) e estômato (e)

4.1.1 Espessura dos tecidos da lâmina foliar e mesofilo

Para *P. hispidinervum* a espessura da epiderme e hipoderme foi significativamente maior na condição *ex vitro* (Tabela 1). Tais resultados são semelhantes ao de Costa et al. (2009) que verificaram maior variação durante a aclimatização da hipoderme da face abaxial em relação a adaxial em bananeira.

Estes resultados diferem dos encontrados por Pereira (2004) que trabalhando com a espécie *Uncaria guianensis*, não observou diferença significativa na espessura da epiderme abaxial durante a aclimatização.

Em relação às células da hipoderme, de acordo com Madison (1977) o aumento da espessura dessas células pode estar relacionado com mecanismo de armazenamento de água, além de exercer papel importante na economia de calor. Santo e Pugialli (1999) atribuem esta duplicação à maior exposição à luz. Braga et al. (2011) relatam que plantas que se desenvolveram heterotroficamente sob condições de cultivo *in vitro* em alta umidade passam por um período de adaptação quando submetidas a condições autotróficas com baixa umidade durante a aclimatização, em razão da grande diferença entre os dois ambientes.

TABELA 1 – Espessura da epiderme (EPAD e EPAB) e hipoderme (HIPAD e HIPAB) da face adaxial e abaxial, respectivamente em μm , de *Piper hispidinervum* sob diferentes condições de cultivo

Condições de cultivo	Espessura das estruturas			
	EP AD	EPAB	HIP AD ⁽¹⁾	HIPAB ⁽²⁾
<i>In vitro</i>	6,09 c	6,09 c	12,65 b	22,28 a
<i>Ex vitro</i>	13,78 a	13,59 a	53,39 a	40,58 a
<i>In vivo</i>	10,53 b	9,36 b	18,24 b	10,20 b
CV(%)	8,26	9,48	11,14	16,32

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

⁽¹⁾ Dados originais transformados em \sqrt{x} .

⁽²⁾ Dados originais transformados em $\log x$.

Para *P. aduncum*, a espessura da epiderme e hipoderme adaxial não foi observado resultados significativos comparando as condições de cultivo avaliadas (Tabela 2). A espessura da hipoderme abaxial foi significativamente maior na condição *in vitro*. De acordo com Barboza et al. (2006) para o abacaxi da cv. Pérola a hipoderme pode não exercer funções bem definidas em plantas *in vitro*, devido à condição heterotrófica e controlada, e a disponibilidade de luz, água e nutrientes deste ambiente. Esse tecido pode assumir grande importância no momento da aclimatização, impedindo a desidratação das plantas micropropagadas nos primeiros dias após o plantio, podendo estar correlacionado ao alto índice de sobrevivência na condição *ex vitro*.

A espessura da epiderme abaxial foi significativamente maior na condição *ex vitro*, quando comparada com as folhas dos cultivos *in vitro* e *in vivo*. Resultados semelhantes foram obtidos por Machado e Biasi (2011) trabalhando com folhas de videira em diferentes condições de cultivo, os quais reportam esse fenômeno a hiperidricidade das células.

TABELA 2 – Espessura da epiderme (EP AD e EP AB) e hipoderme (HIP AD e HIP AB) da face adaxial e abaxial, respectivamente em μm , de *Piper aduncum* sob diferentes condições de cultivo

Condições de cultivo	Espessura das estruturas			
	EP AD	EP AB ⁽¹⁾	HIP AD ⁽¹⁾	HIP AB
<i>In vitro</i>	11,98 ab	7,64 c	20,04 a	23,27 a
<i>Ex vitro</i>	13,86 a	13,11 a	25,15 a	18,09 b
<i>In vivo</i>	10,43 b	9,34 b	26,04 a	18,22 b
CV(%)	14,70	6,46	28,01	15,30

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

⁽¹⁾ Dados originais transformados em \sqrt{x}

O mesofilo em folhas de *P. hispidinervum* é composto por tecidos clorofilados, organizados em parênquima paliçádico e esponjoso. As folhas apresentam mesofilo do tipo dorsiventral. O parênquima paliçádico está imediatamente abaixo da hipoderme adaxial. É formado por um estrato de células colunares, em folhas no cultivo *in vitro* e por dois estratos de células colunares nos cultivos *ex vitro* e *in vivo*, sendo mais alongadas e justapostas (Figura 12).

Na literatura a especialização do tecido paliçádico refere-se à eficiência da fotossíntese. A grande maioria dos cloroplastos é encontrada nas células do parênquima paliçádico devido à forma alongada e ao arranjo das células, possibilitando a máxima captação de luz (APPEZZATTO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2003).

Em folhas do cultivo *in vitro* desta espécie ocorreu menor desenvolvimento do parênquima paliçádico. Tal fato pode estar relacionado com o ambiente controlado (*in vitro*), por apresentar baixa luminosidade, presença de carboidratos exógenos, alta umidade relativa e reduzidas trocas gasosas (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999; ARIGITA et al., 2002). Resultados semelhantes foram observados por Dousseau et al. (2008) onde as células do parênquima paliçádico e esponjoso da espécie

Tabebuia serratifolia apresentaram menor espessura e menor espaços intercelulares em folhas de plantas *in vitro*, quando comparadas com plantas *in vivo*.

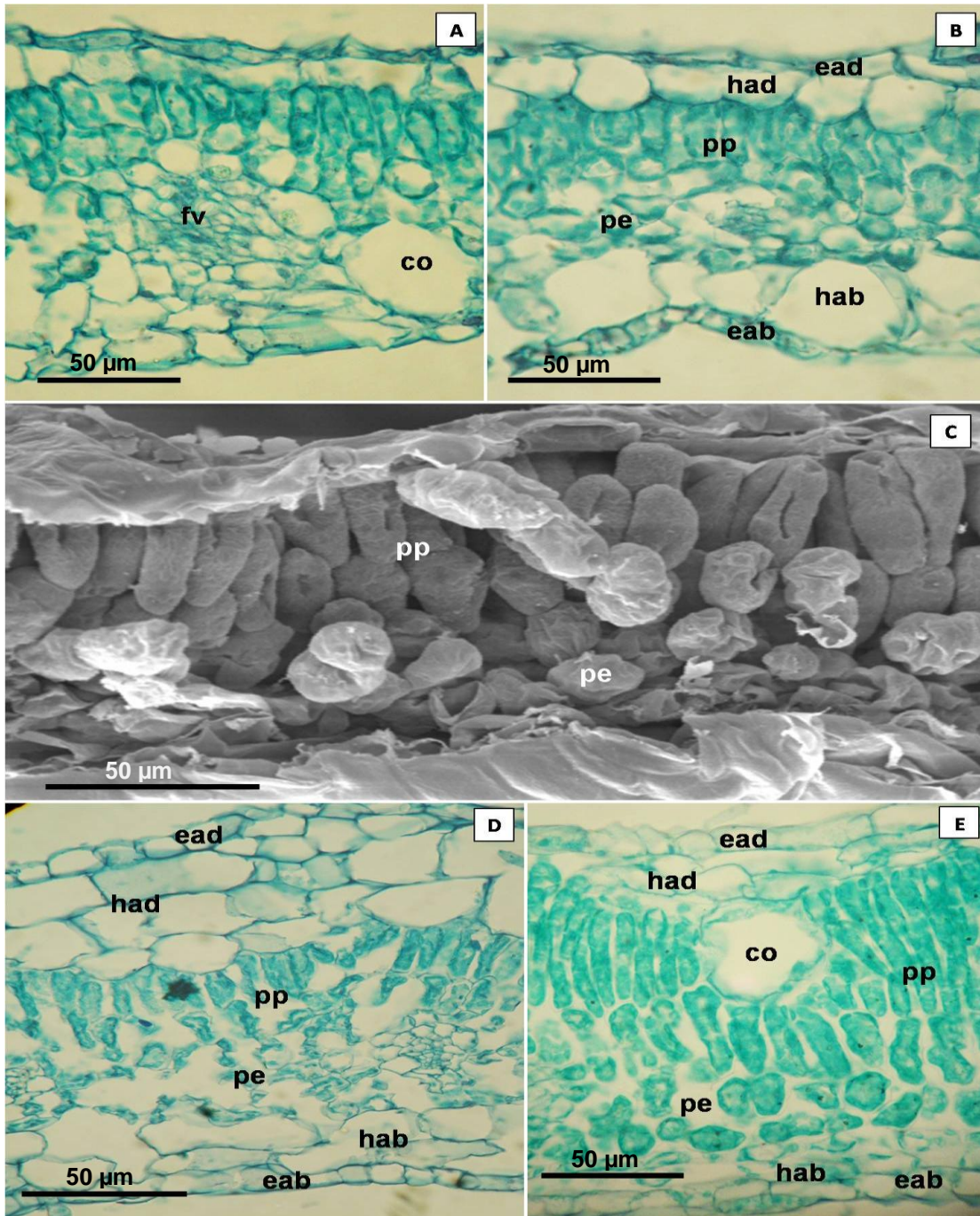


FIGURA 12: Secção transversal da lâmina foliar de *P. hispidinervum*. A e B. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; C e D. Eletromicrografia de varredura e fotomicrografia do cultivo *ex vitro*, respectivamente; E. Fotomicrografia do cultivo *in vivo*. Legenda: epiderme adaxial (ead), hipoderme adaxial (had), parênquima paliçádico (pp), parênquima esponjoso (pe), feixe vascular (fv), células oleíferas (co), hipoderme abaxial (hab) e epiderme abaxial (eab)

A lâmina foliar de *P. hispidinervum* foi mais espessa no cultivo *ex vitro* quando comparadas com as demais condições de cultivo (Tabela 3). No cultivo *in vitro*, a irradiância é inferior quando comparada com luminosidade da casa de vegetação. Portanto, mudanças estruturais na lâmina foliar podem ser verificadas como resposta às condições ambientais (FERMINO JÚNIOR, 2009). Abbade et al. (2009) observaram diferenças anatômicas entre os tecidos de folhas de *Tabebuia róseo alba* provenientes do cultivo *in vitro* e *ex vitro*. Sendo que as folhas provindas do cultivo *ex vitro* tiveram espessuras superiores às do cultivo *in vitro*. Essas diferenças também foram observadas por diversos autores que compararam a anatomia de folhas *in vitro* e *ex vitro* de outras espécies, como mama-cadela (*Brosimum gaudichaudii*) (FIDELIS et al., 2000), ingá (*Inga vera*) (SOARES, 2003), Annona glaba (DECETTI, 2004), sangra d'água (*Croton urucurana*) (LIMA, 2004), candeia (*Eremanthus erythropappus*) (ROSAL, 2004), cagaita (*Eugenia dysenterica*) (MARTINOTTO, 2004), abacaxi (BARBOSA et al., 2006), entre outras.

A espessura do parênquima paliçádico de *P. hispidinervum* do cultivo *in vivo* foi significativamente diferente quando comparadas aos demais cultivos (*ex vitro* e *in vitro*) (Tabela 3). Confirmando que as plantas dessa espécie quando cultivadas *in vitro* passam por um período de adaptação na fase de aclimatização. No período de aclimatização, apresentam características intermediárias das folhas *in vitro* e *in vivo*. Somente as folhas completamente formadas *ex vitro* são semelhantes às folhas *in vivo* (DONNELLY et al., 1985). Segundo Santiago et al. (2001), parênquima clorofiliano bem desenvolvido, apresentando o paliçádico e o lacunoso equiparados, células epidérmicas com paredes espessas e estômatos em alta densidade, são características encontradas em *Piper hispidinervum*. Essas características podem ser entendidas, do ponto de vista ecológico, como uma adaptação dessa espécie às condições sazonais de diferentes luminosidades.

O parênquima esponjoso em folhas de plantas do cultivo *ex vitro* apresentou-se mais espesso do que em folhas de plantas *in vitro* e *in vivo* (Tabela 3), promovendo maior espessamento do mesófilo. Estes dados corroboram com o trabalho de Abbade et al (2009), que realizaram estudos com *Tabebuia róseo Alba* e verificaram que as plantas cultivadas *ex vitro* apresentaram espessuras superiores às do cultivo *in vitro* em todos os tecidos. Segundo Fermino Júnior (2009) as

dimensões dos tecidos clorofilanos de folhas de *Tectona grandis* apresentaram plasticidade estrutural quando submetidas à maior ou menor luminosidade. Da mesma forma, a plasticidade foi verificada na lâmina foliar de *P. hispidinervum* no cultivo *ex vitro*, alongando principalmente os tecidos do parênquima esponjoso. Essa característica é fundamental para permitir o sucesso na etapa de aclimatização da propagação clonal e possibilitar a sobrevivência no campo (HAZARIKA, 2006).

TABELA 3 – Espessura da lâmina foliar, mesofilo, parênquima paliçádico (PP) e parênquima esponjoso (PE), em μm , de *Piper hispidinervum* sob diferentes condições de cultivo

Condições de cultivo	Espessura das estruturas			
	Lâmina Foliar	Mesofilo	PP	PE
<i>In vitro</i>	93,42 c	81,24 c	20,36 c	24,79 c
<i>Ex vitro</i>	223,24 a	196,46 a	52,06 b	50,42 a
<i>In vivo</i>	147,29 b	127,38 b	66,70 a	32,23 b
CV(%)	12,67	13,99	10,46	15,76

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As folhas da espécie *P. aduncum* apresentam mesofilo dorsiventral, constituído por tecidos clorofilados, possuindo diferenciação em parênquima paliçádico e esponjoso. O parênquima paliçádico está imediatamente abaixo da hipoderme adaxial. É formado por um estrato de células colunares, em folhas no cultivo *in vitro* e por dois estratos de células colunares no cultivo *ex vitro* e *in vivo*, sendo mais alongadas e justapostas (Figura 13).

A anatomia foliar é altamente especializada para a absorção de luz. As propriedades do mesofilo, de modo especial do parênquima paliçádico, garantem a otimização da absorção de luz. Chazdon e Kaufmann (1993) analisaram as folhas de *P. arieianum* (Piperaceae) e constataram variação significativa dependente da luz na espessura total foliar, espessura da epiderme superior, espessura do parênquima paliçádico e alongamento dos estratos do parênquima esponjoso.

O parênquima esponjoso possui células de formato irregular, promovendo a formação de espaços intercelulares. Segundo Castro et al. (2009) os espaços intercelulares são importantes para o acúmulo de gases nas trocas gasosas.

Normalmente folhas provenientes do cultivo *in vitro* apresentam menor espessura do mesofilo, devido às condições controladas de luminosidade neste ambiente. O mesofilo de folhas formadas *in vitro* em menor espessura e pouco diferenciado torna essas plantas altamente susceptíveis ao estresse durante a aclimatização (HAZARIKA, 2006). As plantas transplantadas para o ambiente *ex vitro* estão expostas a maior irradiância, e, conseqüentemente, maior atividade fotossintética (FERMINO JÚNIOR; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2009). Segundo Vogelmann et al. (1993), a forma colunar das células do parênquima paliçádico facilita a penetração de luz no parênquima esponjoso.

A estrutura da folha pode ser grandemente influenciada pelo nível de luz durante o crescimento. A capacidade de alterar a estrutura das folhas em resposta a diferentes níveis de luz é um atributo comum das espécies que apresentam amplo potencial de aclimatização (BJORKMAN, 1981). De acordo com Santiago et al. (2001), a adaptação da planta ao novo ambiente depende do ajuste de seu aparelho fotossintético, de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente possível. As respostas dessas adaptações são refletidas no crescimento global da planta.

Para a espécie *P. aduncum* a lâmina foliar e o mesofilo não diferiram entre as condições de cultivo analisadas. Entretanto, existem indicativos de que a espessura total da lâmina foliar sofreu gradativas alterações, sendo altamente influenciada pela irradiância nos ambientes *ex vitro* e *in vivo* (Tabela 4). De acordo com Sandoval-Fernández et al. (1994) o grau de transição e diferenciação em relação à anatomia foliar, durante a fase de adaptação *ex vitro* das plantas micropropagadas, está associado quantidade e ao estágio de maturidade dos primórdios foliares remanescentes do cultivo *in vitro* no momento da transferência das plantas, bem como também às condições de estresse, às quais as plantas são submetidas.

Em relação a espessura do parênquima paliçádico, houve diferença significativa para plantas dos cultivos *ex vitro* e *in vivo*. Nestas condições, a espessura do parênquima paliçádico foi maior em relação às plantas do ambiente *in*

vitro (Tabela 4). Esse resultado corrobora com Costa et al. (2009), no qual também obtiveram maior diferenciação no parênquima paliçádico de bananeira da cultivar Japira, apresentando células alongadas e formação de um segundo estrato de células em resposta à aclimatização. Resultados semelhantes foram descritos por Calvete et al. (2002) em morangueiro, com maior desenvolvimento do parênquima paliçádico em condições *ex vitro*.

TABELA 4 – Espessura da lâmina foliar, mesofilo, parênquima paliçádico (PP) e parênquima esponjoso (PE), em μm , de *Piper aduncum* sob diferentes condições de cultivo

Condições de cultivo	Espessura das estruturas			
	Lâmina Foliar ⁽¹⁾	Mesofilo ⁽¹⁾	PP	PE ⁽²⁾
<i>In vitro</i>	109,87 b	90,16 b	24,52 b	23,27 b
<i>Ex vitro</i>	173,11 a	146,13 a	47,31 a	43,52 a
<i>In vivo</i>	142,92 ab	123,12 ab	49,45 a	33,24 b
CV(%)	4,22	4,83	16,37	9,74

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

⁽¹⁾ Dados originais transformados em $\log x$

⁽²⁾ Dados originais transformados em \sqrt{x}

O parênquima esponjoso apresentou resultados significativos em *P. aduncum* no ambiente *ex vitro*, assim como foi observado para a espécie *P. hispidinervum* neste mesmo trabalho. O aumento na espessura dos parênquimas, sobretudo do parênquima esponjoso, com maior proporção de espaços intercelulares, tem sido relacionado a uma maior capacidade fotossintética das plantas, o que poderá aumentar a taxa de sobrevivência das plantas durante a fase de aclimatização (TOMA et al., 2004).

Os feixes vasculares estão distribuídos entre o parênquima paliçádico e parênquima esponjoso, podendo variar de tamanho em relação ao ambiente. As células oleíferas ou idioblastos são observados no mesofilo, geralmente são volumosos, têm formato esférico a ovalado. São células secretoras que contêm

substâncias de compostos químicos, tais como óleo essencial em seu interior, provavelmente com função de defesa contra microrganismo (Figura 13-C).

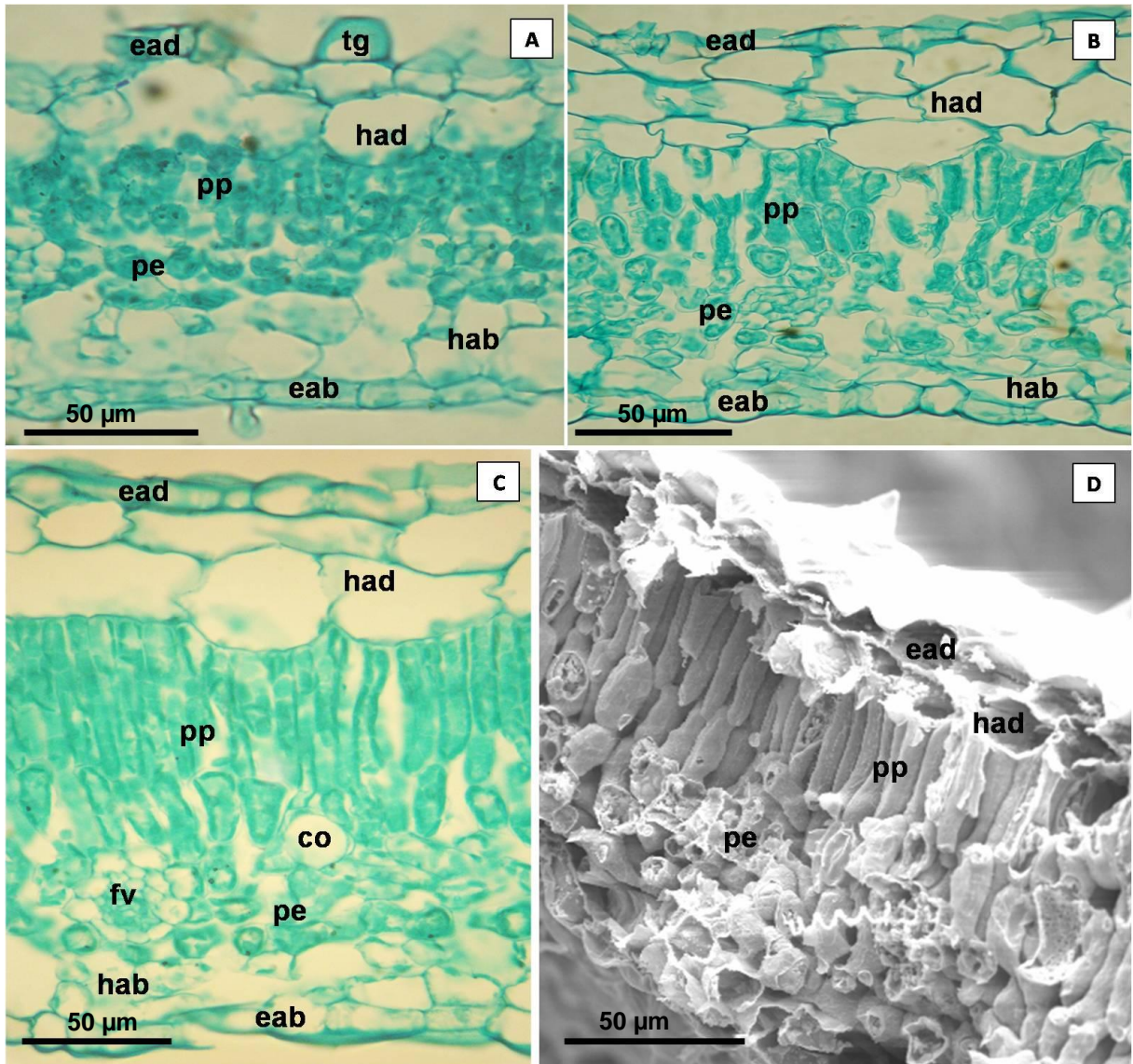


FIGURA 13: Secção transversal da lâmina foliar de *P. aduncum*. A. Fotomicrografia do cultivo *in vitro*; B. Fotomicrografia do cultivo *ex vitro*; C e D. Fotomicrografia e eletromicrografia de varredura do cultivo *in vivo*. Legenda: tricoma glandular (tg), epiderme adaxial (ead), hipoderme adaxial (had), parênquima paliádico (pp), parênquima esponjoso (pe), feixe vascular (fv), células oleíferas (co), hipoderme abaxial (hab) e epiderme abaxial (eab)

4.1.2 Classificação e distribuição dos estômatos

Os estômatos de *P. hispidinervum* foram classificados como anisocítico (circundados por três células subsidiárias de tamanhos diferentes), ciclocítico (envolvido por quatro ou mais de células subsidiárias) e tetracítico (com quatro células subsidiárias, sendo duas polares e duas laterais), sendo o tipo tetracítico predominante. Quanto a sua distribuição foram caracterizados como anfihipoestomática, ou seja, apresentam estômatos em ambas as faces (adaxial e abaxial), porém a quantidade é maior na face abaxial. Os estômatos apresentam-se acima do nível das demais células epidérmicas (Figura 14). No presente estudo não houve variação na distribuição dos estômatos nas diferentes condições de cultivo avaliadas.

Comparando os valores observados a campo para ambas as faces da folha em *P. hispidinervum*, observa-se que apesar de anfihipoestomática existem mais estômatos na face abaxial, contrariando com Gogosz e tal (2012), no qual afirmam que a espécie é epiestomática.

Em relação a *P. aduncum*, os estômatos são do tipo tetracíticos, ou seja, apresentam quatro células subsidiárias envolvendo as células-guarda. Esse tipo de complexo é comum na epiderme foliar de Piperaceae (SOUZA et al., 2004). As folhas são hipoestomática, na qual os estômatos estão dispostos na face abaxial da lâmina foliar (Figura 15). Na face adaxial, os estômatos foram raros, fato que inviabilizou sua quantificação. Segundo Mauseth (1988), a menor frequência estomática na epiderme adaxial deve-se ao fato da exposição desta aos raios solares incidentes, os quais favorecem a transpiração. Em *P. aduncum* os estômatos apresentam-se acima do nível das células epidérmicas, como também observado em *P. hispidinervum* nesse estudo. Essa característica estomática também foi observada por diversos autores que avaliaram a anatomia de plantas da família Piperaceae, como *Piper crassinervum* e *Piper gaudichaudianum* (ALBIERO et al., 2005a; 2005b), *Piper arboreum* (SOUZA et al., 2009), *Peperomia* (TAKEMORI et al., 2003) e *Piper hispidum* (ALBIERO et al., 2006).

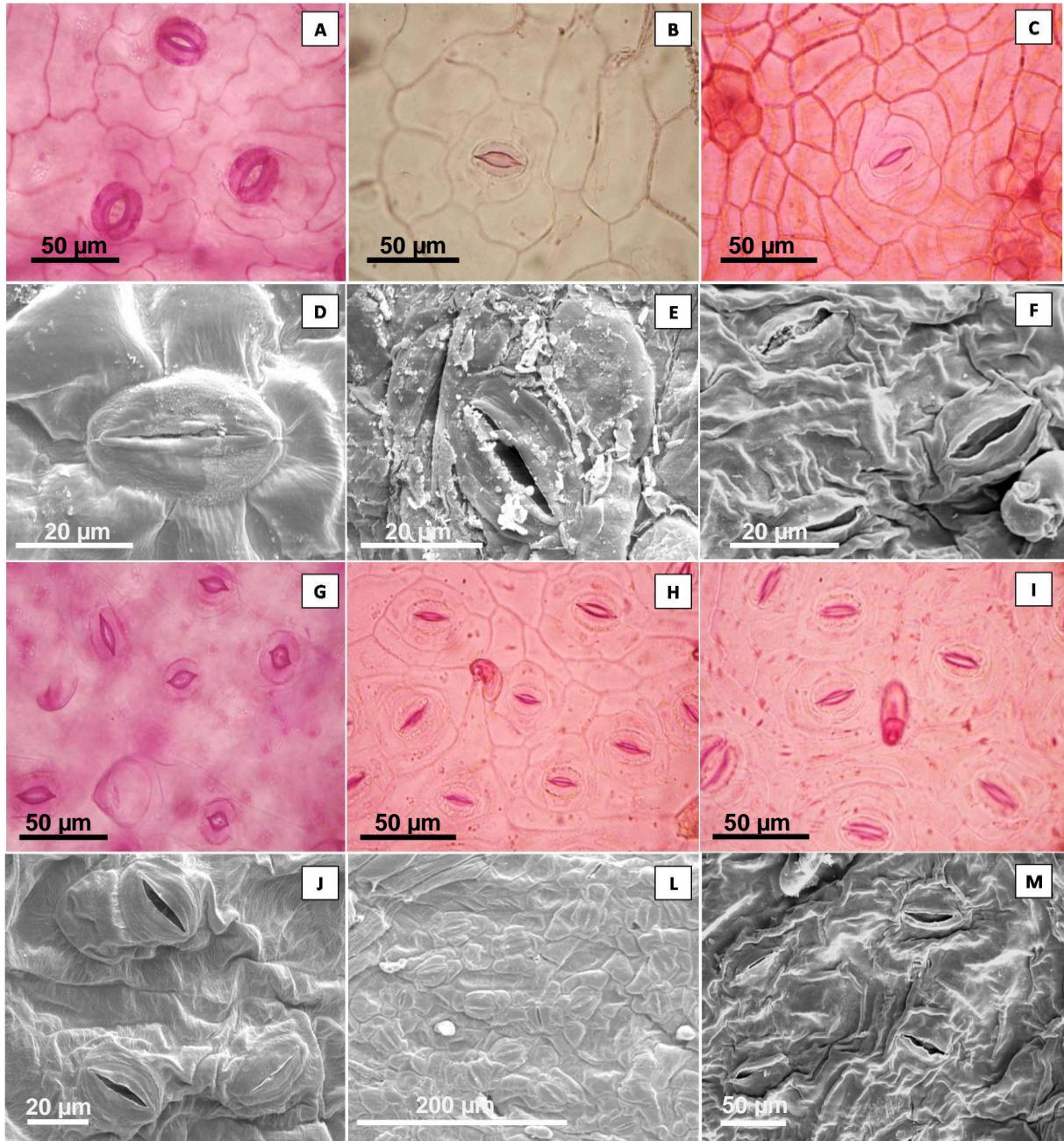


FIGURA 14: Secção paradérmica evidenciando os estômatos, da face adaxial (A-F) e abaxial (G-M) de folhas de *P. hispidinervum* obtidas de plantas submetidas à condição *in vitro* (A, D, G e J); *ex vitro* (B, E, H e L) e *in vivo* (C, F, I e M)

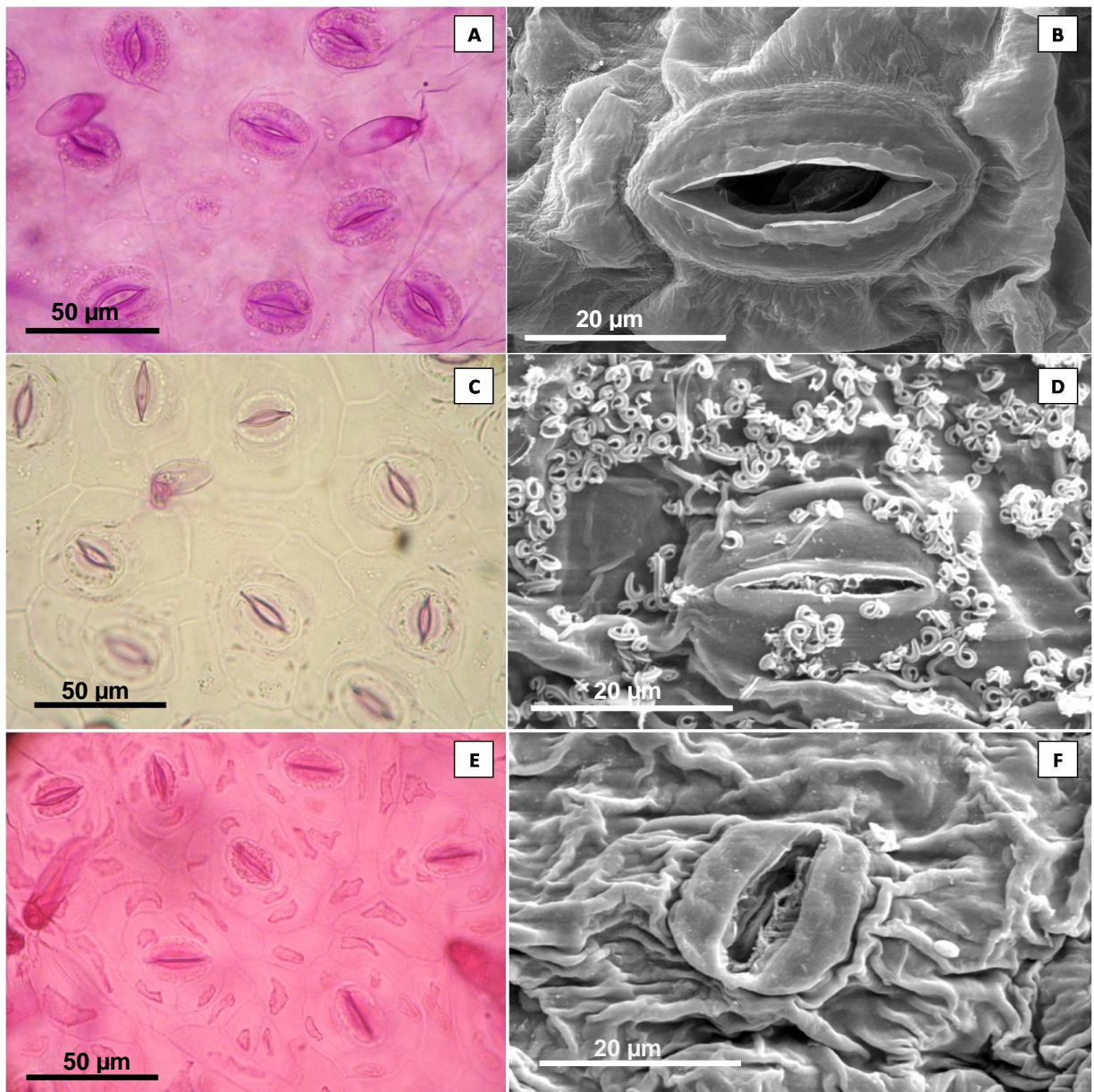


FIGURA 15: Secção paradérmica evidenciando os estômatos, da face abaxial, de folhas de *P. aduncum* obtidas de plantas submetidas ao cultivo *in vitro* (A e B); cultivo *ex vitro*; (C e D) e cultivo *in vivo* (E e F)

4.1.3 Densidade e dimensão estomática

O número médio de estômatos por unidade de área, na face adaxial, apresentou variação nas folhas de *P. hispidinervum* quando comparados em condições de cultivo *ex vitro*, *in vitro* e *in vivo*.

A maior densidade (estomática/mm²) de *P. hispidinervum* ocorreu no cultivo *in vitro* e a menor densidade no cultivo *in vivo*, indicando uma possível adaptação para

não perder água na superfície onde ocorre maior incidência solar. Valores intermediários foram registrados para a condição *ex vitro* (Tabela 5). Este gradiente deve estar relacionada à irradiância nas condições de cultivo *ex vitro* e *in vivo*. Estes resultados diferem do descrito por Costa et al. (2009) onde trabalhando com bananeira o número de estômatos por área da face adaxial não apresentou diferença significativa entre os cultivos *in vitro* e *ex vitro*.

O aumento na densidade estomática nas folhas das plantas cultivadas *in vitro*, comparado a folhas de plantas mantidas em ambiente *in vivo*, tem sido reportado em diversas espécies, estando associado, principalmente, à elevada umidade relativa no interior dos recipientes de cultivo e à reduzida intensidade de luz (KHAN et al., 2003).

Não houve diferença significativa para o comprimento do poro na face adaxial da lâmina foliar de *P. hispidinervum* (Tabela 5). Entretanto, em se tratando da largura do poro estomático a folha do cultivo *in vitro* apresentou maiores dimensões, assim como a largura das células-guarda. Essa maior abertura das células-guarda *in vitro* pode estar relacionada com a maior umidade do ambiente. Hazarika et al. (2002) registraram células-guarda arredondadas ou em forma de meia lua nas folhas de *Citrus* cultivado *in vitro* e células reniformes em casa de vegetação.

O aumento das dimensões das células-guarda e do comprimento do poro pode estar relacionado às adaptações da planta em resposta ao novo ambiente (*ex vitro*).

TABELA 5 – Densidade estomática em est/mm² e dimensão estomática em comprimento (CCG) e largura (LCG) das células-guarda, comprimento (CP) e largura (LP) do poro, em µm, na face adaxial das folhas de *Piper hispidinervum* sob diferentes condições de cultivo

Condições de cultivo	Densidade e dimensão estomática				
	Est/mm ²	CCG	LCG	CP	LP
<i>In vitro</i>	264,16 a	24,33 c	7,04 a	16,87 b	5,68 a
<i>Ex vitro</i>	183,75 b	33,58 a	5,75 b	23,20 a	4,03 b
<i>In vivo</i>	143,33 c	29,31 b	4,77 c	21,17 ab	2,98 c
CV(%)	8,71	3,71	9,52	19,57	9,04

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na face abaxial, a densidade de estômatos é maior nas folhas a do cultivo *in vitro*, apesar de não haver diferença para a *P. hispidinervum*. A densidade estomática da face abaxial, não apresentou variação nas folhas de *P. hispidinervum* quando comparadas a condições de cultivo *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* (Tabela 6). Resultados semelhantes foram descrito por Fermino Júnior (2009) quando trabalhando com a espécie *Tectona grandis* nas condições *in vitro* fotomixotróficas, fotoautotróficas e *ex vitro*. Os resultados obtidos nesse estudo foram semelhantes aos verificados para *Anona coriacea* (SANTANA et al., 2008), onde a mesma densidade estomática foi verificada nas condições *in vitro* e *ex vitro*. Entretanto, o mesmo autor, verificou aumento na densidade estomática de plantas *in vitro* para outras espécies de anonáceas.

As dimensões da largura da célula-guarda e largura do poro foram maiores em plantas do cultivo *in vitro* (Tabela 6). De acordo com Afreen (2004) na condição de *in vitro* pode haver alterações na morfologia, tamanho, densidade e funcionalidade estomática. O presente resultado corrobora com os obtidos por Pereira (2004), nas folhas de *Uncaria guianensis*, onde o diâmetro polar dos estômatos foi menor à medida que aumentou o período de aclimatização, fato que talvez esteja associado à economia de água nesse ambiente. Provavelmente, folhas com estômatos menores apresentam maior eficiência do uso de água, e a diferença no tamanho da abertura estomática revela maior efeito sobre a difusão de água do que sobre a difusão do gás carbônico.

TABELA 6 – Densidade estomática em est/mm² e dimensão estomática em comprimento (CCG) e largura (LCG) das células-guarda, comprimento (CP) e largura do poro (LP), em µm, na face abaxial das folhas de *Piper hispidinervum* sob diferentes condições de cultivo

Condições de cultivo	Densidade e dimensão estomática				
	Est/mm ² (¹)	CCG	LCG	CP	LP
<i>In vitro</i>	475,41 a	24,82 c	6,26 a	18,56 b	7,38 a
<i>Ex vitro</i>	441,25 a	32,66 a	5,57 b	21,74 a	4,16 b
<i>In vivo</i>	538,75 a	27,70 b	5,42 b	18,23 b	3,79 b
CV(%)	23,64	3,73	7,35	5,84	7,31

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

(¹)Dados originais transformados em \sqrt{x} .

A densidade estomática da face abaxial apresentou variação nas folhas de *P. aduncum* quando comparadas em condições de cultivo *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* (Tabela 7). Os resultados obtidos nesse estudo foram semelhantes aos verificados para o cafeeiro (VOLTAN et al.,1992), onde o número de estômatos por unidade de área decresce literalmente com a diminuição do nível de luz.

Os estômatos desta espécie apresentaram maiores dimensões da largura células-guarda e largura do poro estomático nas folhas da condição *in vitro* (Tabela 7). Resultados semelhantes foram apresentados para *P. hispidinervum*. Nas duas espécies estudadas o aumento da dimensão dos estômatos no cultivo *in vitro* pode estar relacionado à falta de controle no mecanismo de abertura e fechamento estomático, pois quando as plantas se desenvolvem em condição *ex vitro*, os estômatos possuem dimensões menores, sofrendo adaptação para o controle da perda de água. De acordo com Pospíšilová et al. (1999), os estômatos *in vitro* são inábeis para a função, tornando as plantas mais suscetíveis à desidratação na fase de aclimatização.

TABELA 7 – Densidade estomática em est/mm² e dimensão estomática em comprimento (CCG) e largura (LCG) das células-guarda, comprimento e largura do poro (LP), em µm, na face abaxial das folhas de *Piper aduncum* sob diferentes condições de cultivo

Condições de cultivo	Densidade e dimensão estomática				
	Est/mm ² ⁽¹⁾	CCG	LCG	CP	LP
<i>In vitro</i>	476,25 b	32,57 b	6,91 a	23,49 b	5,91 a
<i>Ex vitro</i>	439,16 c	36,54 a	5,90 b	26,61 a	4,80 b
<i>In vivo</i>	542,08 a	30,02 c	5,31 c	23,39 b	3,76 c
CV(%)	0,48	3,91	5,87	5,15	6,89

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

⁽¹⁾ Dados originais transformados em *log_x*

De acordo com KHAN et al. (2002) e ROCHA (2005), a relação DP/DE (diâmetro polar/diâmetro equatorial) associada ao formato das células-guarda é uma importante particularidade para o desempenho dos estômatos, visto que a forma elíptica (maior DP/DE) é característica de estômatos funcionais, enquanto que a forma arredondada está associada a estômatos que não apresentam funcionalidade normal. Portanto, cada espécie e condição de cultivo podem apresentar um resultado específico.

5 CONCLUSÕES

- Diferentes ambientes (*in vitro*, *ex vitro* e *in vivo*) promovem a plasticidade das estruturas celulares da lâmina foliar das espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum*;
- A espessura da epiderme e hipoderme das espécies *P. hispidinervum* e *P. aduncum* sofre adaptações na transição de cultivo *in vitro* para o *ex vitro*;
- A lâmina foliar e o mesofilo da espécie *P. hispidinervum* e *P. aduncum* apresentam maior espessamento devido ao aumento do parênquima esponjoso na condição de cultivo *ex vitro*;
- Em ambas as espécies a abertura do poro estomático é influenciada pelo ambiente *in vitro*;
- Folhas de *P. hispidinervum* e *P. aduncum* provenientes de cultivo *in vitro* apresentam menor espessura da lâmina foliar;
- *P. hispidinervum* foi classificada como anfihipoestomática, sendo observada maior densidade de estômatos na superfície adaxial das folhas na condição *in vitro*;
- *P. aduncum* apresenta estômatos apenas na superfície abaxial das folhas, sendo classificada como hipoestomática, com maior densidade estomática na condição *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C.; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, R.; CASTRO, E. M. de C.; CENTOFANTE, A. R.; OLIVEIRA, C. Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia róseo Alba* (Ridl.) Sand.) – Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 307-311, abr./jun. 2009.
- ALBARELLO, N.; FIGUEIREDO, S. F. L.; VIANA, V. R. C.; NEVES, L. J. Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 4, n. 1, p. 35-46, jul./set. 2001.
- ALBIERO, A. L. M.; PAOLI, A. A. S.; SOUZA, L. A. de; MOURÃO, K. S. M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper crassinervum* H.B.&K. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.19, n. 2, p. 305-312, jul./set. 2005a.
- ALBIERO, A. L. M.; SOUZA, L. A. de; MOURÃO, K. S. M.; ALMEIDA, O. J. G. de; LOPES, W. A. L. Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 24, n. 4, p. 550-554, jul. 2005b.
- ALBIERO, A. L. M.; PAOLI, A. A. S.; SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Piper hispidum* Sw. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 3, p. 379-391, jul./set. 2006.
- ALMEIDA, M. C. **Banco de sementes e simulação de clareiras na germinação de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. D. C.)**. 1999. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, 1999.
- ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M. R. T.; COSTA, C. G. da; BARROS, C. F. Epiderme. In: APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed). **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p.87-107.
- APPEZZATTO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003. 438 p.
- ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A. TAMÉS, R. S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.115, n.1, p.166-173, May. 2002.
- BARBOZA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO, D; TEIXEIRA, J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p.185-194, fev. 2006.
- BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. 2 ed. Viçosa, MG: UFV, 2002. 307 p.
- BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London A**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.

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

BASTOS, E. A., RODRIGUES, B. H. N., ANDRADE JÚNIOR, A. S., CARDOSO, M. J. Parâmetros de crescimento do feijão caupi sob diferentes regimes hídricos. **Engenharia Agrícola**, Jaboticatal, v. 22, n. 1, p. 43-50, 2002.

BERGO, C. L. **Estudos agronômicos e fitoquímicos de *Piper hispidinervum* C.DC. e *Piper aduncum* L. Para produção de safrol e dilapiol.** 2010. 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BIASI, L. A. Micropropagação de videiras. In: POMMER, C. V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado.** Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 320-350.

BISSING, D. R. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. **Stain Technology**, v. 49, n 2, p 116-117, 1974.

BOMFIM, G. V. do. **Efeitos de lâminas e frequências de irrigação e tipos e volumes de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental.** 2006. 167 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

BOUQUET, A. TORREGROSA, L. Micropropagation of the grapevine (*Vitis* spp.). In: JAIN, S. M. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 319-352.

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M. de; RAFAEL, G. C.; FAVERO, A. C.; VALENTE, T. C. T. Alterações morfológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 863-868, set/out. 2011.

BRAINERD, K. E. FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 106, n. 4, p. 515-518, 1981.

BUCH, E. **Aspectos morfo-fisiológicos e metabólicos durante a fase de pré-aclimatização e aclimatização de *Agave attenuata* Salmy-Dyck.** 2005. 111 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

CABRAL, G. B.; PIRES, M. V. V.; LACERDA, A. L.; CARNEIRO, V. T. de C. **Introdução *in vitro*, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003, 4 p. (Comunicado Técnico, 101)

- CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDGNON, M. H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 20, n. 4, p. 649-653, dez. 2002.
- CARVALHO, G. R.; PASQUAL, M.; RESENDE, E.; SCARANTE, M. J. Aclimatização de plantas de cafeeiro (*Coffea arábica* L.) propagadas "*in vitro*". **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 3, p. 483-490, jul./set. 1999.
- CASTRO, E. M. de; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
- CHAZDON, R. L.; KAUFMANN, S. Plasticity of leaf anatomy of two rain forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. **Functional Ecology**, London, v. 7, n. 4, p. 385-394, Aug. 1993.
- CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n.19, p.16-21, mar./abr. 2001.
- COSTA, F. H. S.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OLIVEIRA, C. Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização *ex vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 39, n. 2, p. 386-392, mar./abr. 2009.
- COSTA, P. R. R. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 3, p.357-369, maio/jun. 2000.
- DECCETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glaba* L.** 2004. 93 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SUTTER; E. G.; SHACKEL, K. A. Acclimatization and subsequent gas-exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 95, n. 2, p. 225-232, Apr. 1995.
- DOUSSEAU, S.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; SOARES, R. P.; EMRICH, E. B.; MELO, L. A. Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl.) Nlch. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1694-1700, nov./dez. 2008.
- DOUSSEAU, S. **Propagação, caracterização fotossintética, estruturais, fitoquímicas e crescimento inicial de *Piper aduncum* L. (Piperaceae).** 2009. 129 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2009.
- DONNELLY, D. J.; VIDAVE, W. E.; LEE, K. Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 4, n. 1, p. 43-50, 1985.
- FAHN, A. **Plant anatomy**. 4 ed. Oxford: Pergamon Press, 1990. 588 p.

FANK-DE-CARVALHO, S. M.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Arquitetura , anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L. F. (Amaranthaceae). **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 377-390, abr./jun. 2005.

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

FAZOLIN, M. *et al.* **Potencialidades da Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): características gerais e resultados de pesquisa**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2006. 53p. il. Color. (Embrapa Acre. Documentos, 103).

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; CATANI, V.; ALÉCIO, M. R.; LIMA, M. S. de. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C.DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanecium nocturnum* (Bar. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 113-120, jan./fev. 2007.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 369-394, jul./set. 2006.

FERMINO JÚNIOR, P. C. P. **Morfogênese e fisiologia do desenvolvimento *in vitro* da espécie florestal nativa da amazônia *Amburana acreana* (Ducke) A.C. Smith e da espécie exótica *Tectona grandis* L.** 2009. 218 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

FERMINO JÚNIOR, P. C. P.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Características anatômicas de folhas de Teca (*Tectona grandis* L.) desenvolvidas sob condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro*. **Evidência**, Joaçaba, v. 9 n. 1-2, p. 17-28, jan./dez. 2009

FIDELIS, I.; CASTRO, E. M. C.; PINTO, J. E. B. P.; GAVILANES, M. L.; SANTIAGO, E. J. A. Características anatômicas de estruturas vegetativas de *Brosimum gaudichaudii* Trec. desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 327-336, abr./jun. 2000.

FILA, G.; GHASHGHAIE, J.; HOARAU, J.; CORNIC, G. Photoeynthesis, leaf conductance and water relations of in vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatisation. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 102, n. 3, p. 411-418, Mar. 1998.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Revista Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2003. p. 105-124.

FRANKLIN, G. L. Preparation of thin sections of synthetic resins and Wood-resin composites, and a new macerating method for wood. **Nature**, London, v. 155, n. 3924, p. 51, Jan. 1945.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: The Technology**, Great Britain: Exegetics Limited, 574 p, 1993.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: In practice**. 2 ed. Edington: Springer, 1996. 1361 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq/ ABCTP, 1990. p. 99-160.

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

GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, New York, v. 11, n. 1, p. 1-21, Feb. 1969.

GOGOSZ, A. M.; BOEGER, M. R. T.; NEGRELLE, R. R. B.; BERGO, C. Anatomia foliar comparativa de nove espécies do gênero *Piper* (Piperaceae). **Rodriguésia**, v. 63, n. 2, p. 405-417, 2012.

GUEDES, R. da S. **Embriogênese somática e regeneração de plantas de dendezeiro**. 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, 2008.

GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; ANDREOTTI, E.; TOGNOLINI, M.; MALDONADO, M. E.; BRUNI, R. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper abliquum* Ruiz e Pavon (Piperaceae) essential oils from eastern ecuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 39-48, Jan. 2009.

HARARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, Dec. 2003.

HAZARIKA, B. N.; PARTHASARATHY, V. A.; NAGARAJU, V. Anatomical variation in *Citrus* leaves from *in vitro* and greenhouse plants: scanning electron microscopic studies. **Indian Journal Horticulture**, New Delhi, v. 59, n. 3, p. 243-246, Sep. 2002.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105-120. Apr. 2006.

IACONO, F.; MARTINELLI, L. CO₂ assimilation and transpiration balance in species of genus *Vitis* cultivated *in vivo* and *in vitro*: estimation of stomatal and cuticular transpiration *in vitro*. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Villenave d'Ornon, v. 32, n. 2, p. 91-97, 1998.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book Company, 1940. 523 p.

KHAN, P.S.S.V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C. DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 71, n. 2, p.141-146, 2002.

KHAN, P. S. V.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 46, n. 2, p.161-166, 2003.

KHAN, P. S. S. V., Acclimatization of micropropagated horticultural plants. In: CHANDRA, R.; MISHRA, M. (Ed.), **Comprehensive micropropagation of horticultural crops**. Lucknow: International Book Distribution, 2003. p. 491-524.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p.141-14, 1999.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal**. Seropédica: Editora Universidade Rural, 1997. 194 p.

LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C.; PINTO, J. E. B. P. **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41 p.

LAMHANEDI, M.; CHAMBERLAND, H.; TREMBLAY, F. M. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to *in vitro* acclimatization. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 118, n. 4, p. 554-561, Aug. 2003.

LOMBARDI, S. P.; PASSOS, I. R. S.; NOGUEIRA, M. C. S.; APPEZZATO-DAGLÓRIA, B. *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata* mast. **Brazilian Archives of biology and technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 239-247, Mar. 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MACHADO, M. P.; BIASI, L. A. Morfoanatomia das folhas do porta-enxerto de videira 'VR043' (*Vitis vinifera* L. x *Vitis rotundifolia* michx.) em diferentes condições de cultivo. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, São José dos Pinhais, v. 9, n. 1, p.73-78, jan./mar. 2011.

MACIEL, S. de A.; FERMINO JUNIOR, P. C. P.; SILVA, R. A. da; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Morpho-anatomical characterization of embryogenic calluses from immature zygotic embryo of peach palm during somatic embryogenesis. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 263-267, Apr./Jun. 2010.

MACCLELLAND, M. T. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 115-123, 1990.

MADISON, M. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. **Selbyana**, Sarasota, v. 2, n. 1, p.1-13, 1977.

MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1988. 568 p.

MARTINOTTO, C. **Cultivo *in vitro* e aspectos morfológicos de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.)**. 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

MENDONÇA-HAGLER, L. C. S. Biodiversidade e Biossegurança. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 18. p. 16-22, jan/fev. 2001.

MENEZES, N. L. de; SILVA, D. da C.; PINNA, G. F. de A. M. de. Folha. In: APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed). **Anatomia vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p. 303-325.

MESQUITA, J. M. O.; CAVALEIRO, C.; CUNHA, A. P.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 6-12, jan/mar 2005.

MOREIRA, M. A. **Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L) Merril cv. Pérola**. 2001. 81 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2001.

MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, v. 103, n. 1, p. 51-63, Dec. 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Malden, v. 15, n. 3, p. 473-497, Jul. 1962.

NASCIMENTO, M. E. do; VILHENA-POTIGUARA, R. C. de. Aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Piper hispidinervum* C.DC (Piperaceae) e suas estruturas secretoras. **Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi: Série Botânica**, Belém, v. 15, n. 1, p. 39-104, 1999.

NUNES, J. D. **Citogenética de acessos de pimenta longa (*Piper spp.*)**. 2004. 42 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

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

OGUCHI, R.; HIKOSAKA, K.; HIROSE, T. Does the photosynthetic light-acclimation need change in leaf anatomy. **Plant Cell and Environment**, Malden, v. 26, n. 4, p. 505-512, Apr. 2003.

OLIVEIRA, J. P. de. **Produção de mudas *in vitro* e ocorrência de microrganismos endofíticos em bananeiras da amazônia sul-ocidental**. 2009, 123 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, 2009.

OLIVEIRA, J. C. S. de; DIAS, I. J. M.; CAMRA, C. A. G. da; SCHWARTZ, M. O. E. Volatile constituents of the leaf oils of *Piper aduncum* L. from different regions of Pernambuco (Northeast of Brazil). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 18, n. 5, p. 557-559, 2006.

OLIVEIRA, M. N. **Protocolo de avaliação isoenzimática para a Pimenta longa (*Piper hispidinervum*)**. Acre:Embrapa Acre, 1998. 4 p. (Instruções Técnicas, 12).

OLIVEIRA, R. P.; GOMES, T. S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 12, p. 2329-2334, dez. 2000.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K.S. JAIN, R. TANEJA, P.; JHA, A. TYAGI, O. M.; PRASAD, A. K. WENGEL, J.; OLSEN, C. E. BOLL, P. M. Phytochemistry of genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, p. 597-673, Oct. 1997.

PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, H.S.; PARK, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 99, n. 2, p. 199-205, Feb. 2004.

PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; RAMOS, J. D. **Aplicações na propagação de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 81 p.

PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 289-292, ago. 2001.

PEREIRA, R. C. A. **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento dos biomarcadores de *Uncaria tomentosa* Willdenow Ex Roemer & Schultes Dc e *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin (Unha de Gato)**. 2004. 186 f. Tese (Doutorado em Agronomia e Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

PEREIRA, A. C. R. I.; OLIVEIRA, J. V. de; GONDIM JÚNIOR, M. G.; CÂMARA, C. A. G. da. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR, 1775) (Coleóptera: Bruchidae) em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 717-724, maio/jun. 2008.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBELO, R. A.; GIOTTO, C. R.; WENDHAUSEN JÚNIOR, R.; LARGURA, G.; TAVARES, L. B. B. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* (Pimenta longa). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 15, p. 18-23, jul./ago. 2000.

PESSINI, G. L., ALBIERO, A. L. M.; MOURÃO, K. S. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO B. P.; CORTEZ D. A. Análise farmacognóstica de *Piper regnellii* (Miq.) C. D. C. var. *pallescens* (C. D. C.) Yunck: aspectos botânicos e enfoque físico-químico preliminar. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n.3, p. 209-216, abr. 2003.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Pensa, 1990. 326 p.

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

PIMENTEL, F. A.; PINHEIRO, P. S. N. **Mapeamento e caracterização de habitats naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) no município de Brasília**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2000. 20 p.(Boletim de Pesquisa, 28).

PIZA, I. M. de T.; PINHO, R. S. Série: **Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas**. Fundação Cargill, v. 2, p. 179-187, 2002.

POSPISILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Czech Republic, v. 42, n. 4, p. 481-497, Dec. 1999.

REEVE, H. K.; SHERMAN, P. W. Adaptation and the goals of evolutionary research. **Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 68, n. 1, p. 1-32, Mar. 1993.

REIS, M. S. dos; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2007. p. 45-69.

ROCHA, H.S. **Luz e sacarose na micropropagação da bananeira “Prata Anã”**: alterações morfoanatômicas. 2005. 98f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, 2005.

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

RODRIGUES, A. C.; AMANO, E.; ALMEIDA, S. L. de. **Anatomia vegetal**. Florianópolis: CED/LANTEC/UFSC, 2010. 154 p.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande - MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p.102-123, jan./fev. 2001.

ROSA, F. A. F.; NASCIMENTO, M. G.; REBELO, R. A.; PESCADOR, R. Avaliação da atividade regulatória de crescimento de compostos análogos ao ácido indolacético em sementes de alface. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas. **Anais...** Livro de Resumos, v. 2, QB-010.

- ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (D. C.) Mac Leish)**. 2004. 106 f. Dissertação (Mestrado em fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- SÁ, C. P. de; PIMENTEL, F. A. **Viabilidade financeira da exploração da pimenta longa em sistemas de cultivo racional e extrativismo no acre**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2001, 2 p. (Documento, 136).
- SÁ, C. P. de; BAYMA, M. M. A.; GOMES, F. C. da R., OLIVEIRA, E. L. de. **Aspectos agrônômicos e socioeconômico do cultivo da pimenta longa para a produção de safrol no acre, 2004**. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2004, 4 p. (Embrapa Acre. Comunicado Técnico, 164).
- SAHER, S.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E.; OLMOS, E. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Malden, v 120, n. 1, p. 152-161, Jan. 2004.
- SALISBURY, F. B.; ROSS. C. W.; **Plant Physiology**, 4. ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682 p.
- SALVARO, L. M. S. **Reguladores vegetais e poliaminas na organogênese *in vitro* de *Piper hispidinervium* Candolle de Candolle: análises biométricas e bioquímicas**. 2009. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Departamento de Botânica, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- SANDOVAL-FERNÁNDEZ, J. A. MULLER, L. E. WEBERLING, F. Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. 'Grande Naine' (AAA) plants grown *in vitro* and during hardening as compared to field-grown plants. **Fruits**, Paris, v.49, n.1, p.37-46, 1994.
- SANTANA, J. R. F.; OLIVEIRA, L. M.; PAIVA, R.; RESENDE, R. K. S.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. D. Anatomia foliar de seis espécies de anonáceas cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 38, n. 8, p. 2362-2365. nov. 2008.
- 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. D. C.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p.1035-1042, set./out. 2001.
- SANTO, A. do E.; PUGIALLI, H. R. L. Estudo da plasticidade anatômica foliar de *Stromanthe thalia* (Vell.) J. M. A. Braga (Marantaceae) em dois ambientes de Mata Atlântica. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 76/77, p.109-124, 1999.
- SANTOS, R. P. **Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições *in vitro***. 2007. 128 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

- SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**, v. 58, p. 147-166, 1987.
- SHANGGUAN, Z.; SHAO, M.; DYCKMANS, J. Interaction of osmotic adjustment and photosynthesis in winter wheat under soil drought. **Journal Plant Physiology**, v.154, n. 5/6, 753 - 758, May 1999.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Oxford, v. 52, n. 3-4, p. 591-611, Dec. 1965.
- SILVA, E. M.; MACHADO, S. R. Estrutura e desenvolvimento dos tricomas secretores em folhas de *Piper regnellii* (Piperaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 117-124, ago. 1999.
- SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasílica**, Feira de Santana, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.
- SILVA, A. C. P. R.; OLIVEIRA, M. N. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre**. Rio Branco, AC: Embrapa, 2000. 13 p. (Boletim de Pesquisa, 23).
- SILVA, W. C.; RIBEIRO, J. D.; SOUZA, H. E. M.; CORRÊA, R. S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 37, n. 2, p. 293-298, abr./jun. 2007.
- SRINIVASA-RAO, N. K.; BHATT, R. M.; SADASCHIVA, A. T. Tolerance to water stress in tomato cultivars. **Photosynthetica**, Czech Republic, v. 38, n. 3, p. 465-467, 2000.
- SOARES, G. A. **Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro (*Inga vera* Willd, subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn.)**. 2003. 107 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- SOUSA, P. J. C.; BARROS, C. A. L.; ROCHA, J. C. S.; LIRA, D. S.; MONTEIRO, G. M.; MAIA, J. G. S. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 217-221, abr./jun. 2008.
- SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.
- SOUZA JÚNIOR, E. E. de; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeito de substratos e recipientes na aclimatização de plântulas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. Pérola. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 31, n. 2, p. 147-151, jul./dez. 2001.
- SOUZA, L. A. **Morfologia e Anatomia Vegetal**. Ponta Grossa. Editora UEPG. 2003. 259 p.

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

SOUZA, L. A.; ALBIERO, A. L. M.; ALMEIDA, O. J. G.; LOPES, W. A. L.; MOURÃO, K. S. M.; MOSCHETA, I. S. Estudo morfo-anatômico da folha e do caule de *Piper arboreum* Aubl. (Piperaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 28, n. 1, p. 103-107, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odesa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from Apple, cherry, and sweetgum plants after removal *in vitro* culture. **Journal of American society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 113, n. 2, p. 234-238, Mar. 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre. Artemed, 2009. 819 p.

TAKEMORI, N. K. BONA, C.; ALQUINI, Y. Anatomia comparada das folhas de espécies de *Peperomia* (Piperaceae) – I. Ontogênese do tecido aquífero e dos estômatos. **Acta Botânica Brasileira**, Feira de Santana, v. 17, n. 3, p. 387-394, 2003.

TERASHIMA I.; INOUE Y. Palisade tissue chloroplasts and spongy tissue chloroplasts in spinach: biochemical and ultra-structural differences. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 63-75, Jan. 1985.

TOMA, I.; TOMA, C.; GHIORGHITA, G. Histo-anatomy and *in vitro* morphogenesis in *Hyssopus officinalis* L. **Acta Botanica Croatica**, Zagreb, v. 63, n. 1, p. 59-68, 2004.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. 72 p. (Boletim Técnico, 174).

TORREJÓN, D. G. **Uña de gato y producción sostenible**. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, 1997. 138 p.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1998. 864 p.

TUKEY, J. W. Comparing individual means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 5, n. 2, p. 99-114, Jun. 1949.

VANTELGEN, H. J.; VANMIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botanica Neerlandica**, Austrália, v. 41, n. 4, p. 453-459, 1992.

VIANNA, W. O.; AKISUE, G. Caracterização morfológica de *Piper aduncum* L. **Lecta**, Bragança paulista, v. 15, n. 1-2, p. 11-62, jan./dez. 1997.

VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: Uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

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

VILLALOBOS, V. M.; THORPE, T. A. Micropropagación: concepto, metodología y resultados. In: ROCA, W. M.; MROGISNKI, L. A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. p.127-142.

VOGELMANN, T. C.; MARTIN G. The functional significance of palisade tissue: penetration of directional versus diffuse light. **Plant, Cell and Environment**, v.16, n. 1, p. 65-72, Jan. 1993.

VOLTAN, R. B. Q.; FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidade luminosa. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 99-105, 1992.

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

WADT, L. H. de; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic diversity of “Pimenta longa” genotypes (*Piper spp.*, Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 1, p. 74-82, 2004.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais: cultivo *in vitro* de vegetais**. UFRPE, Departamento de Química, Laboratório de Pesquisa Cultura de Tecidos Vegetais. 2005. Disponível em: <<http://ufrpe.br/quimica/culttec.htm>>. Acesso em: 18 abril 2012.

YUNCKER, T. G. **The Piperaceae of Brazil**. 2. ed. São Paulo: Hoehnea, 1972. 366 p.

ZARRABEITIA, A.; LEJARCEGUI, X.; VERAMENDI, J.; & MINGO-CASTEL, A. M. Influence of nitrogen supply on micropropagation and subsequent microtuberization of four potato cultivars. **Journal American Potato**, New York, v. 74, n. 6, p. 369 - 378, Nov. 1997.