

**ASPECTOS ANATÔMICOS E DO CRESCIMENTO
DA PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* C.DC.)
EM CONDIÇÕES “IN VITRO” E “IN VIVO”**

EDSON JOSÉ ARTIAGA DE SANTIAGO

34.973925
N
8702

48702

M FN 34272

EDSON JOSÉ ARTIAGA DE SANTIAGO

**ASPECTOS ANATÔMICOS E DO CRESCIMENTO
DA PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* C.DC.)
EM CONDIÇÕES “IN VITRO” E “IN VIVO”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. PhD José Eduardo Brasil Pereira Pinto

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1999

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

Santiago, Edson José Artiaga de

Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) em condições “in vitro” e “in vivo”. / Edson José Artiaga de Santiago. – Lavras: UFLA, 1999.

118 p.: il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Pimenta longa. 2. *Piper hispidinervium* C.DC. 3. Piperaceae. 4. Cultura de tecido. 5. Planta lenhosa. 6. Tecidos vegetais – Anatomia. 7. Nutrição – crescimento. 8. Eletromicrografia – Microscopia eletrônica de varredura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.973925

EDSON JOSÉ ARTIAGA DE SANTIAGO

**ASPECTOS ANATÔMICOS E DO CRESCIMENTO
DA PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* C.DC.
EM CONDIÇÕES “IN VITRO” E “IN VIVO”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 16 de abril de 1999

Prof.^a Dra. Janice Guedes de Carvalho

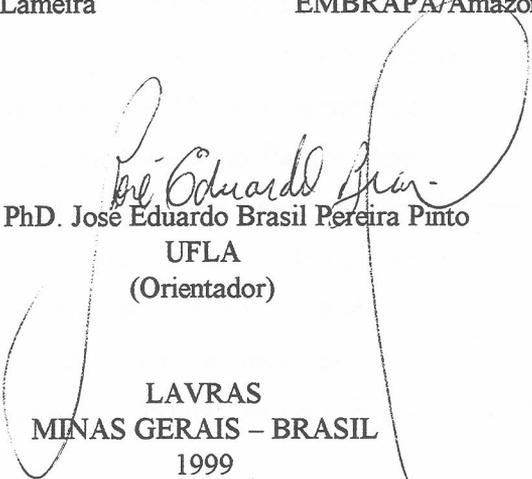
UFLA

Prof. Dr. Manuel Losada Gavilanes

UFLA

Pesq. Dr. Osmar Alves Lameira

EMBRAPA/Amazônia Oriental


Prof. Ph.D. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
1999

BIOGRAFIA DO AUTOR

EDSON JOSÉ ARTIAGA DE SANTIAGO, filho de Benedito Rodrigues de Santiago e Adalziza Artiaga de Santiago, nasceu em Porto Velho, Rondônia. É Engenheiro Agrônomo, graduado pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará – FCAP em 1985.

É funcionário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA desde 1974, tendo desempenhado função de auxiliar de laboratório; desenhista técnico I; desenhista técnico II e, Pesquisador. Foi responsável pelo Laboratório do Pólo de Pesquisa de Dendê (Lab. PPD) da Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual - UEPAE de Belém/EMBRAPA e coordenador do Campo Experimental de Várzeas de Belém e do Campo Experimental de Várzeas do Tacajós, ambos no Pará, da Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual - UEPAE de Belém/EMBRAPA.

Realizou treinamento em “Manejo de Solos Tropicais”, no Instituto Nacional de Investigação e Promoção Agropecuária – INIPA, patrocinado pela Universidade Estatal de Carolina do Norte da América - NCSU e Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas - IICA, em Yurimaguas, Peru.

Realizou especialização em “Estudos anatômicos e morfológicos de estrutura interna de plantas medicinais no Parque Botânico da Universidade Kitasato / Instituto de Pesquisa de Plantas Medicinais do Ministério da Saúde / Centro de Treinamento Agrotécnica de Tsukuba, Japão, patrocinado pela Agência de Cooperação Internacional do Japão - JICA.

Em 1997 iniciou o curso de mestrado em Fitotecnia, área de concentração em Biotecnologia de Plantas, na Universidade Federal de Lavras – UFLA, concluído em abril de 1999.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE QUADROS.....	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1.....	1
1.1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO	5
1.2.1 Descrição botânica	5
1.2.2 Importância econômica	7
1.2.3 Cultura de tecidos	9
1.2.4 Estruturas anatômicas	10
1.2.5 Nutrição e crescimento	12
1.2.6 Adaptação da planta à intensidade luminosa	14
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 2: ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> C.DC.) (PIPERACEAE) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	21
2.1 RESUMO	22
2.2 ABSTRACT	23
2.3 INTRODUÇÃO	24
2.4 REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.4.1 Características gerais da família piperaceae	25
2.4.2 Características gerais do gênero <i>Piper</i>	25
2.4.3 Anatomia foliar	26

2.4.4 Condições de cultivo	27
2.5 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.5.1 Local	29
2.5.2 Material botânico	29
2.5.3 Cortes histológicos	32
2.5.4 Delineamento experimental	33
2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
2.7 CONCLUSÕES.....	42
2.8 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	42
2.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPÍTULO 3: CRESCIMENTO DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> C.DC.) SUBMETIDA A DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO E FÓSFORO “IN VITRO”	46
3.1 RESUMO	47
3.2 ABSTRACT	48
3.3 INTRODUÇÃO	49
3.4 REFERÊNCIAL TEÓRICO	50
3.4.1 O nitrogênio na planta	50
3.4.2 O fósforo na planta	52
3.4.3 Nitrogênio X fósforo	53
3.5 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.5.1 Local	55
3.5.2 Material botânico e obtenção do explante	55
3.5.3 Experimento	56
3.5.4 Delineamento experimental	59
3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
3.6.1 Matéria fresca total	60
3.6.2 Matéria fresca da raiz	62
3.6.3 Matéria fresca do caule	65

3.6.4	Matéria fresca da folha	68
3.6.5	Matéria seca total.....	70
3.6.6	Matéria seca da raiz	74
3.6.7	Matéria seca do caule	76
3.6.8	Matéria seca da folha	77
3.7	CONCLUSÕES.....	80
3.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CAPÍTULO 4: ESTUDOS COMPARATIVOS ANATÔMICOS DE PLANTAS DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> C.DC.) EM DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO E FÓSFORO “IN VITRO”		85
4.1	RESUMO	86
4.2	ABSTRACT	87
4.3	INTRODUÇÃO	88
4.4	REFERENCIAL TEÓRICO	89
4.4.1	Estudos anatômicos	89
4.4.2	Microscopia eletrônica de varredura	91
4.5	MATERIAL E MÉTODOS	93
4.5.1	Local.....	93
4.5.2	Tratamento	93
4.5.3	Preparação do espécimen para a microscopia eletrônica de varredura	95
4.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
4.6.1	Superfície abaxial	96
4.6.2	Superfície adaxial	99
4.6.3	Caule	101
4.6.4	Raiz:	103
4.7	CONCLUSÕES	105
4.8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXOS		108

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Resumo da análise de variância para número de células (CEL), estômatos (EST), diâmetro polar (DP), diâmetro equatorial (DE) e índice estomático (IE), obtido na avaliação de folhas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. sob diferentes condições de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	37
2	Quadro de médias, para o fator tratamento, número de células (CEL), estômatos (EST), diâmetro polar (DP) e diâmetro equatorial (DE), obtido na avaliação de folhas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. sob diferentes condições de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	38
3	Quadro de médias para o índice estomático (IE), obtido na avaliação de folhas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. sob diferentes condições de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	40
4	Varição das doses de nitrogênio (NH_4NO_3) e a relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ do meio nutritivo de Murashige e Skoog (1962).....	57
5	Varição das doses de fósforo do meio nutritivo de Murashige e Skoog (1962).....	57
6	Caracteres avaliados em matérias fresca da raiz, caule e folha, através da variação das doses de nitrogênio e de fósforo fornecidos ao meio nutritivo de MS (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	61
7	Resumo da anava para a variável peso da matéria fresca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.....	63
8	Resumo da anava para a variável peso da matéria fresca do caule (MFC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.....	66
9	Resumo da anava para a variável peso da matéria fresca da folha (MFF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.....	68

10	Médias avaliadas quanto ao peso da matéria seca da raiz, caule e folha nos tratamentos, através da variação das doses de nitrogênio e de fósforo fornecidas ao meio nutritivo de MS (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	73
11	Resumo da anava para a variável peso da matéria seca da raiz (MSR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	74
12	Resumo da anava para a variável peso da matéria seca do caule (MSC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	76
13	Resumo da anava para a variável peso da matéria seca da folha (MSF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	77
14	Composição e relação nos tratamentos das doses de nitrogênio e de fósforo fornecidos ao meio nutritivo de MS (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Exsicata de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. (Herbário EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1997)	6
2	Aspecto geral do plantio de pimenta longa (<i>Piper hispidinervium</i> C.DC.) EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1999.....	7
3	Pimenta longa cultivada em casa-de-vegetação (UFLA/DAG-Lab. Cultura de Tecidos, 1997)	30
4	Pimenta longa cultivada a pleno sol (EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1997)	30
5	Pimenta longa cultivada em sub-bosque (EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1997)	31
6	Corte transversal da lâmina foliar de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. sob diferentes condições de cultivo. Ead – Epiderme adaxial; EAb – Epiderme abaxial; Pp – Parênquima paliçádico; Pl – Parênquima lacunoso; IO – Idioblasto oleífero.....	35
7	Número de estômatos e de células, diâmetro polar e equatorial observados na lâmina foliar de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. sob diferentes condições de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	37
8	Índices estomáticos observados nas regiões basal, mediana e apical da lâmina foliar de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. sob diferentes condições de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	40
9	Plântula de pimenta longa germinadas “in vitro”, aos 20 dias (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	58
10	Pimenta longa “in vitro”, aos 30, 45 e 75 dias após a aplicação dos tratamentos (UFLA, Lavras, MG, 1999)...	58
11	Peso da matéria fresca da raiz, caule, folha e total, avaliados após 75 dias de cultivo através da variação das doses de nitrogênio e de fósforo fornecidos ao meio nutritivo de Murashige e Skoog (1962) (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	60

12	Produção de matéria fresca da raiz de plântulas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. “in vitro”, em função da dose de N total do meio MS, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	64
13	Produção de matéria fresca da raiz de plântulas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. “in vitro”, em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	65
14	Produção de matéria fresca do caule de plântulas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. “in vitro”, em função da dose de N total no meio MS, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	66
15	Produção de matéria fresca do caule de plântulas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. “in vitro”, em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	67
16	Produção de matéria fresca da folha de plântulas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. “in vitro”, em função da dose de N total no meio MS, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	69
17	Produção de matéria fresca da folha de plântulas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. “in vitro”, em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	70
18	Produção de matéria seca total de plântulas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. “in vitro”, em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	71
19	Peso da matéria seca da raiz, caule, folha e total, avaliados após 75 dias através da variação das doses de nitrogênio e de fósforo fornecidos ao meio nutritivo de MS (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	72

20	Produção de matéria seca da raiz de plântulas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. “in vitro”, em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (Lavras, 1999).....	75
21	Produção de matéria seca da raiz de plântulas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. “in vitro”, em função da dose de N total no meio MS, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	76
22	Produção de matéria seca da folha de plântulas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. “in vitro”, em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	78
23	Produção de matéria seca da folha de plântulas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. “in vitro”, em função da dose de P total no meio MS, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	79
24	Eletromicrografias de varredura da face abaxial de folhas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC., nos tratamentos com as variações das doses de N(NH ₄ NO ₃) e P(KH ₂ PO ₄) do meio nutritivo MS (1962) (20kv; X350; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1999).....	97
25	Eletromicrografia de varredura da epiderme abaxial da <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. (20kv; X3550; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1999).....	98
26	Eletromicrografias de varredura da face adaxial de folhas de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC., nos tratamentos com as variações das doses de N(NH ₄ NO ₃) e P(KH ₂ PO ₄) do meio nutritivo MS (1962) (20kv; X350; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1999).....	100
27	Aspecto geral da epiderme adaxial da pimenta longa vista através de microscopia eletrônica de varredura (20kv; X3550; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1999).....	101

28	Corte histológico do caule de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC. através da microscopia de varredura (20kv; X500; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA 1999).....	102
29	Corte transversal da raiz da pimenta longa (20kv; X75; wd23; ME; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1999).....	103
30	Corte histológico da raiz de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC., observado no tratamento 12 (20kv; X500; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1999).....	104
31	Corte histológico da raiz de <i>Piper hispidinervium</i> C.DC., observado no tratamento 1 (20kv; X500; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1999).....	105

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Tratamentos com as variações e combinações das doses de nitrogênio e fósforo do meio de MS (1962) (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	56
2	Tratamentos com as variações e combinações das doses de nitrogênio e fósforo do meio de MS (1962) (UFLA, Lavras, MG, 1999).....	94

RESUMO

SANTIAGO, E.J.A. de; Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) em condições “in vitro” e “in vivo”.
Lavras: UFLA, 1999. 118p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, área Fitotecnia)

Uma das regiões de maior biodiversidade do planeta, a Amazônia, abriga inúmeras plantas detentoras de propriedades medicinais e/ou aromáticas disponíveis, embora a maioria seja pouco conhecida e ainda não pesquisada. Dentre as plantas aromáticas da Amazônia, destaca-se a pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC. - Piperaceae), da família piperaceae, que apresenta espécies produtoras de óleo essencial, produtos vegetais separáveis por arraste a vapor d'água. A *Piper hispidinervium* apresenta, em seus órgãos vegetativos, idioblastos oleíferos que eliminam óleos essenciais denominados de safrol (fenil éter), líquido viscoso de aroma canforáceo usado para aromatizar cervejas e refrigerantes, como agente de fragrâncias em alguns produtos, incluindo ceras, sabões e desinfetantes e, ainda, como um inseticida leve, pouco tóxico e biodegradável. O cultivo da pimenta longa poderá ser uma nova alternativa de produção, utilizando áreas que foram desmatadas e/ou degradadas. A utilização da cultura de tecidos para a propagação clonal de plantas tem sido aceita em numerosas áreas da agricultura comercial. Neste trabalho, a cultura de tecidos está direcionada para as mudanças morfológicas e anatômicas das estruturas internas ligadas ao processo de produtividade primária, durante o crescimento dos tecidos vegetais propagados tanto “in vitro” como “in vivo”. Objetivou-se avaliar o crescimento e as alterações sobre a estrutura organizacional dos tecidos dos órgãos vegetativos da pimenta longa submetidos a variações de doses de N e P “in vitro”, assim como os efeitos das condições de cultivos sobre a anatomia foliar. Constatou-se que a eficiência estomática está estritamente relacionada com as condições de cultivo. As variações e combinações de doses de N(NH₄NO₃) e P(KH₂PO₄) do meio de cultura básico de MS causaram efeitos depressivos no crescimento da pimenta longa como também influenciaram na frequência e abertura estomática, na composição das estruturas e superfícies epidérmicas e nas estruturas dos sistemas vasculares variando as intensidades de células de amido.

Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador),
Janice Guedes de Carvalho – UFLA, Manuel Losada Gavilanes – UFLA e
Evaristo Mauro de Castro – UFLA.

ABSTRACT

SANTIAGO, E.J. A de; **Anatomical and growth aspects of long pepper (*Piper hispidinervum* C. DC.) under “in vitro” and “in vivo” conditions.** Lavras: UFLA, 1999. 118 p. (Dissertation - Master's degree in Agronomy/Agriculture)

One of the planet's greatest biodiversity regions, the Amazonia, houses a number of plants possessing available medicinal and/or aromatic properties, although most of them is little known and, not yet researched. Among the Amazonia's aromatic plants stands out long pepper (*Piper hispidinervium* C.DC. - Piperaceae). The piperaceae family present essential oil-producing species, water steam draft - separable plant products. *Piper hispidinervium* presents in its vegetative organs oil-possessing idioblasts which release essential oils, named safrole (phenyl ether), sticky liquid of camphorlike aroma, used for aromatizing both beer and refreshments, as an fragrance agent in some products, including waxes, soaps and disinfectants and in addition, as a slight insecticide, little toxic and biodegradable. The cultivation of long pepper will be able to be a new production alternative, utilizing areas which have been cleared and/or degraded. The employment of tissue culture for clonal propagation of plants has been accepted in several areas of commercial farming. In this work, tissue culture is directed towards morphological and anatomical changes of the internal structures linked to the primary productivity process during the growth of vegetative tissues propagated both “in vitro” and “in vivo”. Evaluating both the growth and alterations upon the organizational structure of the tissues of the vegetative organs of long pepper submitted to variable doses of N and P “in vitro” as well as the effects of the conditions on leaf anatomy. It was found that the stomatic efficiency is tightly related to the cultivation conditions. Both the variations and combinations of doses of N(NH₄NO₃) and P(KH₂PO₄) of the MS basic culture medium, have caused depressive effects on the growth of long pepper, as well as they influenced the frequency and stomatic opening, composition of the epidermic structures and surfaces and the structures of vascular systems varying the amounts of starchy cells.

Guidance committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto - UFLA (Major Professor), Janice Guedes de Carvalho - UFLA, Manuel Losada Gavilanes and Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A Amazônia brasileira apresenta-se como um manancial, devido ao grande número de espécies disponíveis, embora a maioria seja pouco conhecida e ainda não pesquisada. A transformação da contribuição esporádica do conhecimento sobre plantas medicinais, aromáticas e inseticidas, em trabalhos organizados, sistemáticos e permanentes poderá ser alcançada através da seleção de plantas com tradição terapêutica, fundamentada em estudos de identificação botânica ligados ao uso popular comprovado. As avaliações agrônômicas também são da mais alta relevância na busca da caracterização, identificação dos princípios ativos, da conservação, da propagação, do cultivo econômico apropriado e da utilização como matéria-prima industrial.

Vivemos uma época de conflitos entre o desenvolvimento industrial e a conservação de nossos recursos renováveis. A exploração imediatista visando a obtenção de recursos a curto prazo tem levado a uma contínua e progressiva devastação florestal, trazendo graves conseqüências ao ambiente e ao homem. Em todas as partes do mundo estão sendo reativadas as pesquisas sobre produtos de origem natural.

→ Atualmente, as pesquisas com espécies naturais progredem em todos os sentidos, mas o interesse pela fitoterapia e homeopatia como opções terapêuticas vem crescendo dia-a-dia. Calcula-se que o Brasil disponha de algo entre 60 a 250 mil espécies vegetais das quais 40% devem conter propriedades terapêuticas (Oliveira, Akissue e Akissue, 1991).

→ O Brasil importa e exporta plantas aromáticas e medicinais. Muitas das espécies importadas poderiam ser cultivadas no país, principalmente se

considerarmos que nossas terras se estendem desde a latitude 5°N a 34°S. A maior parte do território nacional localiza-se em altitudes que se situam entre o nível do mar e até 1200m. Cerca de 20% do território registra temperaturas médias anuais entre 20 e 24°C. Por outro lado, cerca de 80% do país recebe entre 1000 e 2500mm anuais de chuvas, destacando-se, entre os tipos climáticos, o equatorial, o tropical de altitude e o subtropical (Von Hertwig, 1991).

→ A grande maioria das plantas medicinais da região é de ervas ou arbustos que vegetam pelos campos ou no sub-bosque das matas; umas preferem a terra firme, outras as várzeas; umas são consideradas invasoras de áreas cultivadas, outras aparecem nas frestas dos muros da cidade. Assim sendo, caso pretenda-se iniciar o cultivo de espécies espontâneas, torna-se indispensável a perfeita identificação das plantas matrizes, comparando-se as características da que se pretende cultivar com a descrição botânica da planta desejada. Mesmo assim, é preciso estar atento para o fato de que sob diferentes condições ambientais não só o aspecto mas também o teor dos princípios ativos são comumente alterados (Pimentel, 1994).

O conhecimento popular sobre as virtudes dessas plantas, a maneira como são usadas, o cuidado na preparação de remédios tem sido hoje em dia comprovado, fazendo com que sejam recomendadas por órgãos médicos ligados à da saúde popular. Entretanto, o seu uso deve obedecer à cuidados e conhecimentos adequados, uma vez que existem plantas consideradas medicinais que são altamente tóxicas e outras com efeitos colaterais imprevisíveis.

O acelerado processo extrativo das plantas com tradições fitoterápicas nas áreas de ocorrência natural deve-se à grande demanda pelos alcalóides produzidos por essas espécies. Indústrias de fármacos e cosméticos as têm colocado na linha de frente e explorado de forma extensiva. Nessas condições a

regeneração é lenta e o processo de desmatamento tem provocado a diminuição da oferta do produto bruto (raízes, caules e folhas) no mercado industrializador.

→ O processo de domesticação de espécies silvestres passa por etapas em que as exigências das plantas são identificadas dentro do seu habitat natural e pelas respostas fisiológicas que apresentam ao serem submetidas a ambientes de cultivo racional, onde os eventuais estresses podem ser atenuados artificialmente. O conhecimento que se tem hoje sobre as exigências das plantas medicinais restringem-se às observações dos nativos nas áreas de ocorrência natural, uma vez que, até agora, pouco tem sido divulgado em pesquisas isoladas.

Uma das regiões de maior biodiversidade do planeta, a Amazônia, abriga inúmeras plantas detentoras de propriedades medicinais e, com certeza, outras tantas das quais se desconhece os efeitos terapêuticos. Esta é, inclusive, uma das bandeiras dos ecologistas pela preservação do ecossistema amazônico.

A flora odorífera da Amazônia apresenta-se como uma das fontes renováveis mais apropriadas para a produção de medicamentos, essências aromáticas para a indústria mundial de cosméticos e inseticidas naturais. Para isso, torna-se necessário promover a domesticação das espécies identificadas como promissoras para que, cultivadas racionalmente, possam oferecer alternativas econômicas quando inseridas no processo produtivo.

→ Dentre as plantas aromáticas da Amazônia, destaca-se a pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC. - Piperaceae). O cultivo desta espécie poderá ser uma nova alternativa de exploração utilizando áreas que foram desmatadas e/ou degradadas. A simplicidade do sistema de produção, a rusticidade da espécie e a facilidade no manejo da cultura e na produção do óleo essencial recomendam sua exploração comercial, com o cultivo desta espécie conduzido por pequenos agricultores reunidos em associações e cooperativas.

A propagação do material coletado é selecionado casualmente em locais de crescimento espontâneo que diante da variabilidade genética, não apresentam um completo balanceamento nas suas características químicas e substâncias ativas.

→ A natureza cria individualidades. Não existem sequer dois indivíduos iguais. Entretanto, em indivíduos pertencentes a uma mesma espécie, prevalecem as semelhanças, ficando as diferenças restritas a certos limites. Conhecem-se diversas espécies do gênero *Piper*, subordinado à família Piperaceae (Oliveira, Akissue e Akissue, 1991).

A utilização da cultura de tecidos para a propagação clonal de plantas tem sido aceita em numerosas áreas da agricultura comercial (McCown, 1988). Os laboratórios têm dado especial atenção ao uso da tecnologia de cultura de tecidos para a propagação de plantas matrizes (Debergh, 1990; Debergh e Read, 1993) e propagação assexuada de plantas economicamente importantes (Hu e Wang, 1983; Jones, 1987; Bhojwani, 1990).

Neste trabalho, a cultura de tecidos está direcionada para as mudanças morfológicas e anatômicas das estruturas internas ligadas ao processo de produtividade primária durante o crescimento dos tecidos vegetais propagados tanto "in vitro" como "in vivo", podendo fornecer dados importantes relacionados ao processo de estabelecimento, que indicarão a variação da síntese dos princípios ativos, em decorrência das mudanças ambientais. Objetivou-se avaliar o crescimento e as alterações sobre a estrutura organizacional dos tecidos dos órgãos vegetativos da pimenta longa submetidos a variações de níveis de $N(NH_4NO_3)$ e $P(KH_2PO_4)$ do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), assim como os efeitos das condições de cultivos sobre a anatomia foliar.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1. Descrição botânica

Piperales é a ordem que compreende três famílias (Saururaceae, Piperaceae e Chloranthaceae), nas quais incluem-se as plantas com hábitos predominantemente herbáceos, caulescentes ou acaules (Barroso, 1984).

A família Piperaceae foi descrita no século XVIII por Linnaeus (Yuncker, *apud* Nascimento, 1997), apresentando-lhe quatro gêneros, sendo o *Piper* descrito em 1737. Yuncker (1972) reporta que De Candolle, no século XIX, foi um dos cientistas que mais se dedicaram ao estudo da Piperaceae, e que ela é encontrada em todas as florestas tropicais úmidas do mundo, sendo também espécie dominante em muitas florestas neotrópicas. É representada por plantas herbáceas, trepadeiras, arbustos e, raramente, árvores. Compreende 12 gêneros e cerca de 1400 espécies, sendo que cinco desses gêneros são indígenas e subespontâneos, com 460 espécies no Brasil, cuja distribuição geográfica ocorre entre os trópicos, com poucas espécies extratropicais (Barroso, 1978, citado por Santos et al., 1998), apresenta flores sésseis com mais de um estigma em inflorescência opositifolia (Barroso, 1984)

A *Piper hispidinervium* C.DC., popularmente conhecida como pimenta longa, é um arbusto ou arvoreta de 2-7m de altura com caule geniculado. Suas folhas são membráceas ou cartáceas, elípticas, elíptico-ovadas ou elíptico-lanceoladas. As inflorescências são espigas alongadas, com flores minúsculas e frutos obpiramidais (Yuncker, 1972). O autor relata que a classificação de *Piper* tem a seguinte posição sistemática:

Divisão: Angiospermae

Classe: Dicotyledoneae

Ordem: Piperales

Família: Piperaceae

Gênero: *Piper*

A classificação da espécie em estudo foi efetuada nos herbários, IAN–Belém, Pará, Brasil, localizados na EMBRAPA/Amazônia Oriental, cuja exsicata tem o registro 165651 e no herbário da ESAL-UFLA, Lavras, MG, Brasil, exsicata n°.15594 (Figura 1).



FIGURA 1. – Exsicata de *Piper hispidinervium* C.DC. (Herbário EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1997).

1.2.2 Importância econômica

A pimenta longa (Figura 2) nativa da Amazônia, característica de vegetação secundária e natural nos campos de pastagem, no Estado do Acre, adapta-se muito bem aos solos pobres em nutrientes (Alencar et al., 1971). Maia, Green e Milchard (1993) informam que as folhas de *Piper hispidinervium* possuem 3-4% de óleo volátil com rendimento de 81-88% de safrol quando em estado nativo, podendo apresentar rendimentos de 98,12%, após cultivos e tratos culturais adequados. Possui ciclo vital curto de aproximadamente 8 meses, época da primeira floração, quando mede em torno de 2m de altura, momento propício para o corte da planta (Silva, 1993).



FIGURA 2 – Aspecto geral do plantio de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) (EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1999).

Trabalhos mais recentes registram que a família Piperaceae apresenta espécies produtoras de óleo essencial. Na Amazônia, foram apresentadas mais de dez espécies de *Piper* como fornecedoras de óleos essenciais (Maia et al., 1987), que são produtos vegetais separáveis por arraste a vapor d'água e que existem nas plantas em estruturas especiais de secreção, tais como: idioblastos, cavidades e canais esquizógenos ou lisígenos originados por separação ou lise de células, respectivamente, e tricomas glandulares. A *Piper hispidinervium* apresenta em seus órgãos vegetativos idioblastos oleíferos que eliminam óleos essenciais denominados de safrol. A volatilidade com vapor d'água e a existência de estruturas anatômicas definidas são mais importantes para a classificação do óleo essencial do que o odor (Gottlieb e Salatino, 1987).

O safrol é um fenil éter encontrado como componente volátil em algumas espécies de plantas e que em sua forma mais pura, à temperatura ambiente, é um líquido viscoso de aroma canforáceo (Maia et al, 1987). Em sua forma natural foi largamente utilizado nos Estados Unidos para aromatizar cervejas (Anya, 1974) e como agente de fragrâncias em alguns produtos como ceras, sabões e desinfetantes (Anon, 1992). Atualmente, o safrol natural é utilizado na forma da heliotropina como componente de fragrâncias e do butóxido de piperonila, na composição de inseticidas (Castro e Poveda, 1983). O butóxido de piperonila apresenta-se como o principal agente sinérgico para o piretrum natural, o qual é a base para inseticidas biodegradáveis e que, isolado, tem efeito reduzido. O piretrum natural associado ao butóxido de piperonila é a única formulação permitida para o uso no armazenamento e processamento de alimentos em todos os países do Primeiro Mundo (Arctander, 1960). Segundo Maia, Green e Milchard (1993), a demanda por butóxido de piperonila tende a crescer cada vez mais devido as suas características de baixa toxicidade e por ser biodegradável.

Nascimento (1997) também reporta que, até 1958, o safrol era usado intensamente nos Estados Unidos para aromatizar cervejas e refrigerantes (Anyá, *apud* Silva, 1993), como agente de fragrâncias em alguns produtos, incluindo ceras, sabões e desinfetantes (Anon, *apud* Silva, 1993) e ainda como um inseticida leve, pouco tóxico e biodegradável (Beker, *apud* Silva, 1993). Esta substância era, até algum tempo atrás, extraída de uma espécie arbórea chamada sassafrás (*Ocotea pretiosa* (Nees) Mez. – Lauraceae), no estado de Santa Catarina (Alencar et al., 1971). Porém, com a exploração abusiva e desordenada, o risco de extinção da espécie era quase certo, visto que a mesma era cortada no tronco para a extração do óleo na casca (Silva, 1993). Diante do problema, o Governo Federal, em 1991, através do Decreto número 1557 publicado no Diário Oficial da União de 25 de setembro de 1991, proibiu a derrubada das árvores desta espécie.

1.2.3 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos de plantas tem sido considerada uma grande alternativa para a agricultura. A propagação “in vitro”, também denominada de micropropagação em função do tamanho dos propágulos utilizados, é, indiscutivelmente, a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecidos (Grattapaglia e Machado, 1990).

O crescimento de células vegetais “in vitro” geralmente é determinado pela natureza do explante e composição dos nutrientes do meio. A alta concentração de sais no meio pode favorecer o crescimento de calos e morfogênese e torná-lo inapropriado para o crescimento de raízes excisadas, anteras e órgãos florais (Ozias-Akins e Vasil, 1985).

O sucesso de um sistema de micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis. A capacidade de regeneração e crescimento “in

vitro” parece estar associada não apenas ao genótipo mas também à atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos. O manejo da planta matriz, as características do explante utilizado, o procedimento de subcultura adotado, as condições ambientais e microambientais dentro do frasco de cultura e o transplante são etapas influenciadas por diversas variáveis imponderáveis que freqüentemente restringem a repetição dos resultados, dificultando a determinação de um protocolo efetivamente comercial de micropropagação (Grattapaglia e Machado, 1990).

A propagação vegetativa de plantas medicinais, aromáticas e inseticidas seguem as mesmas técnicas usadas para plantas de interesse agrônomo. As plantas podem ser regeneradas a partir de meristemas (embrião, ápices caulinares, gemas axilares) ou de tecidos não meristemáticos, através da organogênese ou embriogênese. A regeneração de plantas de *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Richard (Rubiaceae), uma importante planta medicinal brasileira teria sido obtida através de segmentos nodais e internodais por Lameira, Costa e Pinto (1994), técnicas que, por certo, viabilizam espécies com dificuldade de reprodução (baixa taxa de germinação), assim como aquelas em fase de extinção, provocada pela exploração irracional, modificando o ambiente.

1.2.4 Estruturas anatômicas

Quanto à natureza morfológica e estruturas anatômicas, as folhas podem ser diferenciadas em dois tipos: folhas de sombra e folhas de sol. As folhas de sombra possuem anatomia e propriedades fisiológicas que as capacitam a utilizar baixas intensidades luminosas com grande eficiência; entretanto, não podem fazer uso eficiente de alta intensidade de luz porque os plastídeos podem ser destruídos por processos foto-oxidativos sob luz plena (Bjorkman e Holmgren, 1963; Coombs e Hall, 1982). Porém, a adaptação das folhas de sol às condições

de sombra parece ser mais fácil, pela própria situação de que, à medida que a planta se desenvolve, o sombreamento mútuo de suas folhas aumenta.

Geralmente aceita-se que as folhas de sol são menores e mais espessas, com maior desenvolvimento de cutícula; no mesófilo encontra-se parênquima paliçádico e lacunoso bem diferenciado. Camadas de células do parênquima paliçádico são maiores, com pequenos espaços intercelulares, apresentando uma maior área de superfície externa de paredes, além de possuir células mais alongadas em direção perpendicular à superfície foliar. As paredes celulares e a epiderme também são mais espessas (Esau, 1976; Mitchell, 1979; Whatley e Whatley, 1982; Coombs e Hall, 1982). A proporção entre parênquima paliçádico e lacunoso também aumenta, bem como o desenvolvimento de tecidos de sustentação (Medri e Lleras, 1980). De acordo com Evans (1973), a expansão da folha à sombra se deve a um crescimento ativo da epiderme foliar em área. Tanto a epiderme da face adaxial da folha (superior) quanto da abaxial (inferior) respondem às mudanças na luminosidade, mas, em geral, a epiderme superior é mais afetada (Engel e Poggiani, 1989).

Também as características dos estômatos sofrem mudanças consideráveis em respostas à luz. Muitos estudos têm constatado que alta intensidade luminosa aumenta a frequência de estômatos por unidade de área superficial da folha (Bjorkman e Holmgren, 1963; Evans, 1973; Boardman, 1977; Ashton e Turner, 1979; Medri e Lleras, 1980), mas as respostas quanto ao seu comprimento ou ao tamanho das células-guardas não são consistentes (Boardman, 1977). A capacidade de respostas estomáticas pode variar em relação à posição dos estômatos nas folhas. Geralmente, a condutância estomática na face adaxial da folha correlaciona-se mais com a frequência de estômatos, ao contrário do que ocorre na face abaxial, permitindo respostas mais rápidas (Magnussen, 1985). Deste modo, espécies tolerantes tendem a ter estômatos apenas na face inferior.

Podemos analisar que nem sempre os índices anatômicos isolados são critérios válidos para indicar a atividade fisiológica normal das espécies sob condições sazonais. Entretanto, muito pouco tem sido feito com objetivo de que estudos anatômicos sejam utilizados para a elucidação de problemas quantitativos do crescimento das plantas (Evans, 1973) durante o processo de domesticação.

1.2.5 Nutrição e crescimento

A nutrição mineral é um dos fatores de estresse que podem interferir nos constituintes químicos de uma planta. A deficiência e/ou excesso de nutrientes podem promover maior ou menor produção de fármacos (Lameira, 1997).

O estado nutricional de uma planta pode ser influenciado por diversos fatores: tipo de solo, adubação, pH, temperatura, luz, umidade do solo e outros. Considerando que o safrol é extraído dos ramos novos e folhas, Brasil e Viégas (1997) avaliaram o efeito da aplicação da adubação mineral N-P-K na produção de biomassa aérea da pimenta longa e verificaram efeitos significativos para N e K e para a interação N-P-K e inferiram ainda que, apesar de não ter havido efeito significativo de P na produção da matéria seca, a elevação otimizou a resposta da planta ao N e ao K. Viégas et al. (1997), estudando o crescimento do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Staph. – Rutaceae) sob níveis analíticos de macronutrientes, verificaram que todos os tratamentos com omissão afetaram a produção de matéria seca quando comparados com o tratamento completo, sendo o mais afetado a omissão individual de nitrogênio.

Os elementos minerais exigidos em maiores quantidades para o crescimento de plantas inteiras são incluídos nos meios nutritivos na forma de sais inorgânicos, podendo o nitrogênio ser adicionado como componente de suplementos orgânicos (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990).

Por apresentar-se na forma de cátion (amônia) e ânion (nitrito ou nitrato), o nitrogênio difere dos demais macronutrientes (Miranda, 1997). O efeito dessas diferentes formas inorgânicas, separadamente, pode promover ou não o crescimento e desenvolvimento de determinadas espécies de plantas. Já a combinação das duas estimula o crescimento de muitas espécies "in vitro", de modo que a toxidez do amônio não é absoluta (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990).

Esses íons são de grande importância no controle do pH do meio de cultura. Atuam como agente tamponante e favorecem a absorção de outros íons presentes no meio (Nagao, Pasqual e Ramos, 1994), os quais geralmente possuem baixa capacidade tamponante (Caldas, Haridasan e Ferreira, 1990).

Grewal, Ahuja e Atal (1980), citados por Grattapaglia e Machado (1990), verificaram, em culturas de *Eucalyptus citriodora* Hook (Myrtaceae), que ao se reduzir pela metade as concentrações de nitrato de amônia e de potássio do meio MS, a taxa de multiplicação dobra.

Para George e Sherrington (1984) e Nagao, Pasqual e Ramos (1994), o crescimento e a morfogênese de células e tecidos de plantas cultivadas "in vitro" são marcadamente influenciados pela disponibilidade e pela forma com que o nitrogênio é suplementado no meio de cultivo. O nitrogênio parece ter maior influência na formação de raízes em comparação com outros macronutrientes no meio de cultura. Sendo o nutriente mais absorvido durante o ciclo de feijoeiro (Raij et al., 1996), também é o constituinte básico da clorofila, dos aminoácidos, das proteínas e de outros componentes importantes no metabolismo da planta (Teixeira, 1998).

O fósforo contribui para o aumento da concentração de alcalóides na beladona e de substâncias aromáticas no coentro (*Coriandro sativum* L. - Apiaceae) e no funcho (*Foeniculum vulgare* Mill. - Apiaceae). O seu déficit no solo reduz a concentração de cumarinas em chambá (*Justicia pectoralis* var.

stenophilla Jacq.- Acanthaceae), mas o efeito mais negativo é a redução da produção de biomassa, podendo reduzir a produção total de princípios ativos (Barros, Andrade e Silva, 1992 e Martins et al., 1995).

No pH que comumente ocorre nos solos cultivados, o fósforo é absorvido predominantemente na forma iônica de $H_2PO_4^-$. A acumulação de fósforo nas células corticais da raiz é seguida pela transferência dentro dela até o xilema, o que se dá pelo simplasto. Entretanto, o fósforo não pára de se movimentar quando, no transporte a longa distância, chega à folha ou às regiões de crescimento pois é juntamente com o nitrogênio, o elemento mais prontamente redistribuído (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1997). No meio de Murashige e Skoog (1962), o fosfato de potássio monobásico é usado na concentração de 1,25mM. Este nível é considerado baixo para algumas culturas, sendo que a complementação com o nível igual de fosfato de sódio monobásico tem sido benéfico para algumas espécies (Murashige, 1977).

1.2.6 Adaptação da planta a intensidade luminosa

Embora os fatores primários que determinam o estabelecimento de determinada comunidade vegetal em uma região sejam a precipitação e a temperatura (Clarke, 1971; Walter, 1971; Andrae, 1978 e Jacobs, 1988), a distribuição local das espécies dentro das comunidades está fortemente influenciada pelas diferenças na disponibilidade de luz, ou seja, a grande variabilidade entre as diferentes espécies vegetais quanto às suas necessidades de luz durante as etapas do ciclo vital, bem como nos hábitos de crescimento, resulta no desenvolvimento de comunidades estratificadas que proporcionam uma ampla faixa de habitats para outros organismos (Whathey e Whathey, 1982). Assim, graças às respostas de crescimento à luz, as plantas conseguem

explorar condições microclimáticas mais favoráveis e evitar as desfavoráveis (Jacobs, 1988).

Em *Quercus rubra* Rugel ex A.DC. (Cupuliferae) a redução da intensidade luminosa diminui significativamente o peso da matéria seca de plântulas sob uma ampla faixa de temperatura (Farmer Jr., 1975), revelando sua relativa intolerância à sombra. Entretanto, não só o peso da matéria seca total é importante como também a sua redistribuição entre sistema radicular e parte aérea, que denotam um maior equilíbrio das plantas, embora o crescimento do sistema radicular seja bastante influenciado pela radiação luminosa. Contudo, o efeito é claramente indireto, apesar das respostas serem rápidas (Evans, 1973), pois o sistema radicular depende do suprimento de assimilados da parte aérea.

O conteúdo de água das plantas pode servir como um índice anatômico, pois relaciona-se com a elasticidade das paredes celulares, podendo refletir mudanças na estrutura foliar, principalmente na extensão da venação e na proporção de tecido do caule (Evans, 1973).

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, R. de; LIMA, R.A. de; CORREA, R.G.C.; et al. Óleos Essenciais de Plantas Brasileiras. *Acta Amazônica*, Manaus, 1:41, 1971.
- ANDRAE, F.H. *Ecologia florestal*. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais, 1978. p.9-26.
- ANON, A. *Marketing reports in tissues of the chemical marketing reporter*. New York: Schnell publishing, 1992.
- ANYA, A.L. Study of the allelopathic activity in the essential oil of *Piper auritum*. In: CONGRESS OF ESSENTIAL OILS, 6, 1974, Oak Park. *Proceedings...* Oak Park: Alhured Published Corporation, 1974.
- ARCTANDER, S. *Perfume and flavour materials of natural origen*. Elisabeth, New Jersey, 1960.
- ASHTON, D.H.; TURNER, J.S. Studies on the light compensation point of *Eucalyptus regnans* Muell. *Australian Journal of Botany*, Melbourne, v.27, p. 289-607, 1979.
- BARROS, R.F.M.; ANDRADE, L.H.C.; SILVA, N.H. Efeito da radiação solar e disponibilidade de nutrientes sobre a produção de cumarinas em *Justicia pectoralis* Jacq. Var. *Stenophylla* Leonard. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1992, Curitiba. *Anais...* Curitiba: UFPR, 1992.
- BARROSO, G.M. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Viçosa: Imprensa Universitária, 1984. 3v.
- BHOJWANI, S.S. *Plant tissue culture: applications and limitations*. Amsterdam: Elsevier, 1990. 461p.
- BJORKMAN, O.; HOLMGREN, P. Adaptability of the photosynthetic apparatus to light intensity in ecotypes from exposed and shaded habitats. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.16, p. 889-915, 1963.
- BOARDMAN, N.K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Annual Review of Plant Physiology*, California, v.28, p. 355-377, 1977.

- BRASIL, E.C.; VIÉGAS, I. de J.M. Efeito da adubação NPK na produção de matéria seca de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 26, 1997, Rio de Janeiro. Anais...Rio de Janeiro: SBCS, 1997. 1 CD-ROM.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas de aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.37-63.
- CASTRO, C.; POVEDA, L. *Piper auritum* H.B.K. Estudio preliminar de aceite essencial de sus hojas. Instituto de Ciências Químicas de Produtos Natural, v.7, n.1/2, p.24-25, 1983.
- CLARKE, G.L. Elementos de ecologia. Barcelona: Omega, 637p. 1971.
- COOMBS, J.; HALL, D.O. Techniques in bioproductivity and photosynthesis. Oxford: Pergamon Press, 1982. 191p.
- DEBERGH, P.C. Recent trends in the application of tissue culture to ornamentals. In: GREEN, C.G.; SOMERS, D.A.; HACKETT, W.P.; BLESBOER, D.D. Plant tissue and culture. New York: A.R. Liss, 1990. p.383-393.
- DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (eds.). Micropropagation – tecnologia and application. London: Kluwer Academy Publishers, 1993. cap.1, p.1-13.
- ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudos fenológicos das principais espécies arbóreas plantadas no Parque de Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. O Solo, Piracicaba, SP, v.77, n.1/2, p. 42-56, 1989.
- ESAU, K. Anatomia das plantas com sementes; tradução: Berta Lange de Morretes. São Paulo: Edgard Blücher/Ed. da Universidade de São Paulo, 1976. 193p.
- EVANS, L.T. The effect of light on plant growth, development and yield. In: SLATYER, R.O. (ed.) Plant response to climatic factors. Paris: UNESCO, 1973. p.21-35.
- FARMER Jr., R.E. Growth and assimilation rate of juvenile northern red oak: effects of light and temperature. Forest Science, Washington, v.21, n.4, p.373-381, 1975.

- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**- Handbook and directory of comercial laboratories. Eversley: Exegetics Limited, 1984. 593p.
- GOTTLIEB, O.R.; SALATINO, A. Função e evolução dos óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.39, n.8, p.707-716, 1987.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., (ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-169.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and cultures. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant Cell Culture** - techniques for propagation and breeding. New York: MacMillan Publishing Company, 1983. v.1, p.177-277.
- JACOBS, M. **The tropical rain forest - a first encounter**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. 295p.
- JONES, L.H. Clonal propagation of plantation crops. In: ABBOT, A.J.; ATKIN, R.K. **Improving vegetatively propagated crops**. London: Academic Press, 1987. p.385-405.
- LAMEIRA, O.A. **Propagação "in vitro" e "in vivo", dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de Flavonóides em Erva-Baleeira (*Cordia verbenacea* L.)** Lavras: UFLA, 1997. 87p. (Tese - Doutorado em Fitotecnia)
- LAMEIRA, O.A.; COSTA, M.P. da; PINTO, J.E.B.P. The efficiency of shoot and plantlet formation of *Cephaelis ipecacuanha* after three subcultures "in vitro". **Ciência Rural**, Santa Maria, v.24, n.3, p.523-526, 1994.
- MAGNUSSEN, S. Growth, transpiration, unit leaf rate and water use efficiency of six poplar clones at different light and temperature regimes. **Forest Tree Improvement**, Copenhagen, v.18, p. 1-48, 1985.
- MAIA, J.G.S.; GREEN, C.L.; MILCHARD, M.J. New Sources of Natural Safrole. **Perfumer and Flavorist International**, Weaton, v.18, p.19-22, 1993.

- MAIA, J.G.S.; SILVA, M.I. da; LUZ, A.I.R.; et al. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em Saffrol. **Química Nova**, São Paulo, v.10, n.3, p.200-204, 1987
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319p.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1995. 220p.
- McCOWN, B.H. Adventitious rooting of tissue cultured plants. In: DAVIS, T.D.; HAISSIG, B.E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cultting**. Portland: Dioscorides Press, 1988. p.289-302.
- MEDRI, M.E.; LLERAS, E. Ecofisiologia de plantas da Amazônia. Anatomia foliar e ecofisiologia de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Castanha -do-Pará) - Lecythidaceae. **Acta Amazônica**, Manaus, v.9, n.1, p.15-23, 1980.
- MIRANDA, A.M.P. de. **Concentração de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação "in vitro" da samambaia espada (*Nephrolepis exaltata* L. Schott)**. Lavras: UFLA, 1997. 42p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)
- MITCHELL, R.L. **Crop growth and culture**. Ames: The Iowa State University Press, 1979. 439p.
- MURASHIGE, T. Manipulation of organ initiation in plant tissue culture. **Botany Bulletin**, London, Academia Sinica, v.18, p.1-24, 1977.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NAGAO, E.O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação "in vitro" de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v.53, n.1, p.25-31, 1994.
- NASCIMENTO, M.E. **Aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Piper hispidinervium* C.DC. (Piperaceae) e suas estruturas secretoras**. Belém: UFPa/MPEG, 1997. 78p. (Dissertação – Mestrado em Biologia Ambiental)
- OLIVEIRA, F. de; AKISSUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. 412p.

- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Nutrition of plant tissues. In: VASIL, I.K. **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants: Cell Growth, Nutrition, Cytodifferentiation and Cryopreservation**. Florida: Academic Press, 1985. v.2, cap.4, p.129-147.
- PIMENTEL, A.A.M.P. **Cultivo de plantas medicinais na Amazônia**. Belém: FCAP. Serviço de Documentação e Informação, 1994. 114p.
- RAIJ, B.V.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (eds.) **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: IAC, 1996. 285p. (Boletim Técnico, 100).
- SANTOS, A.S.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.das G.B.; et al. Sesquiterpenes of amazonian *Piper* species. **Acta Amazônica**, Manaus, v.28, n.2, p.127-130, 1998.
- SILVA, M.H.L. da. **Tecnologia de cultivo e produção racional de Pimenta Longa, *Piper hispidinevium* C.DC.** Rio de Janeiro: UFRRJ, 1993. 120p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).
- TEIXEIRA, I.R. **Comportamento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Pérola) submetido a diferentes densidades de semeadura e níveis de adubação nitrogenada**. Lavras: UFPA, 1998. 67p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)
- VIÉGAS, I. de J.M.; CARVALHO, J.G. de; CONCEIÇÃO, H.E.O. da; et al. Sintomas de macronutrientes em plantas de jaborandi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 26, 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBCS, 1997. 1 CD-ROM.
- VON HERTWIG, I.F. **Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem e comercialização**. 2.ed. São Paulo: Icome, 1991. 414p.
- WALTER, H. **Ecology of tropical and subtropical vegetation**. Edimburgh: Oliver & Boyd, 1971. cap.1, p.1-29.
- WHATHEY, J.M.; WHATHEY, F.R. **A luz e a vida das plantas**. São Paulo, EPU-EDUSP, 1982. 101p. (Temas de Biologia, 30).
- YUNCKER, T.G. **The Piperaceae of Brazil**. **Hoehnea**, São Paulo, v.2, p.1-266, 1972.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS DA ANATOMIA FOLIAR DA PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* C.DC.) SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

RESUMO

SANTIAGO, E.J.A. de. Aspectos da anatomia foliar da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) sob diferentes condições de cultivo. Lavras: UFLA, 1999. 118p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia, área Fitotecnia).

A *Piper hispidinervium* C.DC. (Piperaceae) popularmente conhecida como pimenta longa, desenvolve-se em áreas degradadas de campos naturais do Estado do Acre, BR. Suas folhas contêm estruturas especiais de secreção, ricas em safrol, que variam de 90 a 94%, dos 3 a 4% dos óleos essenciais encontrados. O safrol é um fenil éter volátil, líquido viscoso de aroma canforáceo e bastante utilizado para aromatizar cervejas e refrigerantes, como agente de fragrâncias e sinergismo de inseticidas e herbicidas, biodegradáveis. Objetivou-se, neste trabalho, o estudo da anatomia foliar sob diferentes condições de cultivo. As folhas de pimenta longa foram coletadas de plantas em três condições de cultivos: pleno sol ($1439\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), casa-de-vegetação ($885\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e sub-bosque ($192\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Foram seccionadas em micrótomo rotatório, submetidas ao processo de coloração com safrablau e preparadas lâminas permanentes. Os cortes histológicos foram feitos nas porções mediana, entre o bordo e nervura mediana das folhas coletadas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três tratamentos contendo cinco repetições, sendo cada parcela constituída de três plantas. Os dados obtidos foram submetidos ao teste F e as médias contrastadas pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. As variáveis de respostas foram: número de células e de estômatos, diâmetro polar e equatorial e índice estomático. O número de células foi maior na condição de sub-bosque, havendo a redução do diâmetro polar e equatorial quando comparado com os outros dois sistemas que não diferenciaram estatisticamente, mas foram influenciados pelo aumento da intensidade luminosa. O índice estomático está restritamente relacionado com as condições de cultivo na seguinte ordem: pleno sol, casa-de-vegetação e sub-bosque. As condições de cultivo mostram que a radiação solar influencia no crescimento e desenvolvimento dos tecidos vegetais.

Termos para indexação: Anatomia; piperaceae; *Piper hispidinervium* C.DC.; condições de cultivo; safrol; estômatos.

Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador), Janice Guedes de Carvalho – UFLA, Manuel Losada Gavilanes – UFLA e Evaristo Mauro de Castro – UFLA.

ABSTRACT

SANTIAGO, E.J.A. de. Aspects of leaf anatomy of long pepper (*Piper hispidinervium* C. DC.) under cultivation conditions. Lavras: UFLA, 1999. 118p. (Dissertation - Master's degree in Agronomy/Agriculture).

Piper hispidinervium C.DC. (Piperaceae) is popularly known as long pepper, it develops in degraded areas of natural fields in the state of Acre, Brazil. In their leaves are special secreting structures rich in safrole, which range from 90 to 94%, out of 3 to 4% of the essential oil found. Safrole is a volatile phenol ether, sticky liquid of camphorlike aroma and very much utilized to aromatize both beers and refreshments, as a fragrance agent and synergism of biodegradable herbicide and insecticide. The study of the leaf anatomy under different cultivation conditions was aimed at in this study. The leaves of long pepper were collected from plants under three cultivation conditions: full sunshine ($1439\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), green house ($885\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and under-storey ($192\mu\text{Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$); were selected in rotatory microtome, submitted to the process of staining with safrablu and prepared on permanent slides. The histological sections were done on the median parts, between the edge and the median rib of the leaves collected. The experimental design was completely randomized with three treatments containing five replications, being each plot constituted of three plants. The data obtained were submitted to F test and the means contrasted by Scott-Knott test, at the 5% level of probability. The response variables were: number of cells and of stomates, polar and equatorial diameter and stomatic index. The number of cells was greater under the condition of under-storey, there being the reduction of the polar and equatorial diameter as compared with the other two systems which did not differ statistically, but were influenced by the increase of light intensity. Stomatic index is tightly related with the cultivation conditions in the following order: full sunshine, greenhouse and under-storey. The cultivation conditions show that solar radiation influence both the growth and development of plant tissues .

Index terms: Anatomy; piperaceae; *Piper hispidinervium* C.DC; cultivation conditions; safrole; stomates.

Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major Professor), Janice Guedes de Carvalho – UFLA, Manuel Losada Gavilanes – UFLA and Evaristo Mauro de Castro - UFLA.

2.3 INTRODUÇÃO

A grande maioria das plantas aromáticas e medicinais é de ervas ou arbustos herbáceos que vegetam pelos campos ou no sub-bosque das matas. Umam preferem a terra firme, outras as várzeas; umas são consideradas invasoras de áreas cultivadas, outras aparecem nas frestas dos muros da cidade. Assim sendo, caso se pretenda iniciar o cultivo de espécimes espontâneos, torna-se indispensável a perfeita identificação das plantas matrizes. Para isso, comparam-se as características da planta que se pretende coletar com a descrição botânica da planta desejada.

A pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC. - Piperaceae) desenvolve-se normalmente em áreas de pousio (capoeiras), formando populações de grande densidade dominantes sobre as demais espécies. Possui, em suas folhas, teores que variam de 90 a 94% do óleo essencial safrol. A partir de coletas de espécies deste gênero, o Museu Paraense Emilio Goeldi - MPEG constatou que a pimenta longa constitui-se em uma espécie promissora para a produção de safrol.

Existem várias publicações voltadas para a identificação botânica das espécies amazônicas, entretanto, poucas referem-se às suas exigências edafoclimáticas e método de cultivo. A avaliação decorrente das condições de cultivo é uma base para a compreensão do processo de adaptação da espécie e é fator importante para o conhecimento de um eficiente manejo para a condução de sistemas de produção comercialmente viáveis.

Reverendo a literatura, não foram encontrados estudos detalhados relacionados com a anatomia das folhas de *Piper hispidinervium* em diferentes condições de cultivo. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo contribuir para o conhecimento anatômico desta espécie, bastante comum nos campos naturais do Estado do Acre, Brasil.

2.4 REFERENCIAL TEÓRICO

2.4.1 Características gerais da família Piperaceae

A família Piperaceae é representada por plantas herbáceas, trepadeiras, arbustos e, raramente, árvores, de caule freqüentemente articulado (com nós e entre-nós) com articulações intumescidas e folhas simples, inteiras e alternas. As flores são aclamídeas, andróginas ou unissexuadas, protegidas por bractéolas, pediceladas ou, quando sésseis, sempre reunidas em densas inflorescências, geralmente peltadas; androceu formado de 2-6 estames livres, com anteras bitecas ou unitecas, rimosas; ovário súpero, unilocular, uniovulado, formado de 1-5 carpelos, com 1-5 estigmas; óvulo basal, ortótrofo. O fruto é uma drupa indeiscente, carmosa, raramente com perisperma e endosperma escasso; o embrião é reduzido (Lawrence, 1920; Schultz, 1963; Cronquist, 1968; Joly, 1975 e Barroso, 1984).

2.4.2 Características gerais do gênero *Piper*

→ O gênero *Piper*, pertencente à família Piperaceae, possui folhas que apresentam filotaxia alterna dística, são pecioladas e possuem estípulas caducas adnatas ao pecíolo, as quais sofrem abscisão nas proximidades do quarto nó, a partir do ápice. O pecíolo é curto e contorcido nas plantas adultas. O limbo é membranáceo ou cartáceo ovado ou elíptico-lanceolado com 5-10 (raro até 23cm) de comprimento, e 4-7cm de largura, sendo a área foliar média de 378mm², ápice curtamente acuminado, com base assimétrico-arredondada ou cordiforme e margem inteira. São opacas em ambas as faces, sendo a abaxial finamente pubescente, com tricomas quase adpressos sobre as nervuras primárias e secundárias, secretores caducos (Nascimento, 1997).

2.4.3 Anatomia foliar

Pesquisas de anatomia foliar podem conduzir a soluções para problemas relacionados com a multiplicação, melhoramento e cultura dos vegetais (Gavilanes, 1981). Plantas de comprovado interesse econômico já foram estudadas minuciosamente e, entre outros autores, Hayward (1938), citado por Gavilanes (1981), exemplifica o que está sendo considerado. Plantas nativas brasileiras que eventualmente possam vir a apresentar interesses econômicos carecem de pesquisas dessa natureza (Gavilanes, 1981).

As classificações anátomo-ecológicas de Withner, Nelson e Wejksnora (1974) enfocam características anatômicas de algumas Orchidaceae, que possivelmente se relacionariam com o xeromorfismo habitacional e/ou escleromorfismo nutricional e via fotossintética CAM (Crassulaceam Acid Metabolism), e estas estabeleceriam uma síndrome adaptativa para o efetivo controle do fluxo hídrico no limbo foliar, dando as espécies condições para a colonização de ambientes mais xéricos como as Campinas abertas (Bonates, 1993).

As folhas são protegidas por uma epiderme cutinizada. As trocas gasosas com a atmosfera são largamente limitadas aos poros estomáticos circundados pelas células guardiães capazes de abrir e fechar as aberturas estomáticas. Os estômatos ocorrem em todas as partes aéreas da planta, sendo mais abundantes nas folhas. As espécies vegetais possuem a faculdade de desenvolver diferentes estruturas anatômicas e morfológicas quando crescem em condições ambientais adversas. Dentro de uma mesma planta ocorrem diferenças entre folhas crescendo em distintas posições na copa, devido à quantidade de luz que recebem.

Os estômatos são estruturas através das quais as plantas estabelecem as trocas gasosas com o ambiente. Nascimento (1997) reporta que em *Piper*

hispidinervium estas estruturas encontram-se ligeiramente abaixo das demais células epidérmicas, observando-se grãos de amido em suas células subsidiárias.

É bem conhecido que o número de estômatos varia entre as espécies (Hirano, 1931; Meidner e Mansfield, 1968), o que também tem sido mostrado na densidade de estômatos das folhas de uma mesma espécie, dependendo do meio onde as folhas se desenvolveram (Eckerson, 1908; Rea, 1921 e Penfound, 1931). Gupta (1961) relata que a densidade estomática é inversamente proporcional à área da lâmina foliar e conclui que o número absoluto de estômatos é constante, com folhas de mesma linhagem individual, afirmando ainda que, quando as plantas de mesma espécie estavam crescendo em ambientes diferentes, a mesma correlação foi observada novamente.

2.4.4 Condições de cultivo

Apesar de todo o conhecimento acumulado sobre as características morfológicas e anatômicas das folhas das espécies amazônicas, pouca atenção tem sido dada aos aspectos morfológicos da superfície das folhas. No entanto, é exatamente destes aspectos que depende, em grande parte, a adaptação das plantas ao seu ambiente, pois são as características químicas e/ou morfológicas da superfície foliar que condicionam, por exemplo, a quantidade de luz absorvida ou refletida, o grau de hidrofobia do órgão, a pressão de vapor do ar em contato com as folhas, a eficiência do órgão em defender-se de parasitas e patógenos, a quantidade de poluentes ou defensivos absorvida e, evidentemente, a magnitude da transpiração cuticular (Martin e Juniper, 1970; Juniper e Jefre, 1983, citados por Salatino, Montenegro e Salatino, 1986).

Estudos ecofisiológicos que indiquem a influência dos fatores ambientais na distribuição, sobrevivência e desenvolvimento das espécies florestais e que auxiliem na compreensão de seu papel no ecossistema tornam-se, portanto,

fundamentais (Pinto, Varela e Batalha, 1993). O cultivo de espécies vegetais em sistemas de produção, seja com finalidade econômica ou conservacionista, requer uma série de cuidados que dependem do conhecimento prévio de suas características fisiológicas e exigências ecológicas nas diversas etapas de seu ciclo vital.

Amo (1985) observou que as diferenças de luz quanto a sua intensidade têm, nas condições naturais, efeitos mais significativos no crescimento das plantas do que a sua qualidade, principalmente quanto ao acúmulo de matéria seca.

A influência do fator ambiente, tal como a luz, é importante para entender tanto a densidade como o número total de estômatos nas folhas da mesma espécie. Knecht e Orton (1970) mostraram a posição correta na relação entre a densidade e a persistência de estômatos em cultivares de *Ilex opaca* Ait. (Aquifoliaceae), sugerindo o uso da densidade de estômatos como critério de avaliação.

Plantas de *Guarea guidonea* (L.) Sleumer (Meliaceae) cultivadas em 100% da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) apresentaram uma maior frequência estomática acompanhada de um maior índice estomático em comparação às cultivadas em 48 e 67% da RFA (Castro et al., 1998).

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 aclimação (Bjorkman, 1981). Voltan, Fahl e Carelli (1992) reportam que o estudo da epiderme nas folhas de cultivares de cafeeiro, o número de estômatos decresceu linearmente com o nível de luz, no entanto, em *Coffea canephora* L. (Rubiaceae) esta característica foi superior quando comparada com *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) e o híbrido intraespecífico.

A adaptação da planta ao ambiente de luz depende do ajuste de seu aparelho fotossintético, de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente possível. As respostas destas adaptações serão refletidas no crescimento global da planta. Assim, a eficiência do crescimento pode ser relacionada à habilidade de adaptação das plântulas às condições de intensidade luminosa do ambiente. Frequentemente as análises do crescimento das plantas são utilizadas para prever o grau de tolerância ao sombreamento.

2.5 MATERIAL E MÉTODOS

2.5.1 Local

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil, a uma altitude de 900 metros, 21°14'06'' de Latitude Sul e 45° de Longitude WGr.

2.5.2 Material botânico

As folhas de pimenta longa foram coletadas por volta das 9 horas, de plantas em três condições de cultivos.

- a) plantas cultivadas em casa-de-vegetação, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (Figura 3);
- b) plantas cultivadas a pleno sol, nas áreas experimentais do Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental (1°27'S; 48°29'W) (Figura 4);

- c) plantas cultivadas em sub-bosque, nas áreas experimentais do Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Figura 5).



FIGURA 3 – Pimenta longa cultivada em casa-de-vegetação (UFLA/DAG-Lab. Cultura de Tecidos, Lavras, MG, 1997).



FIGURA 4 – Pimenta longa cultivada a pleno sol (EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1997).



FIGURA 5 – Pimenta longa cultivada em sub-bosque (EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, PA, 1997).

As condições de radiação solar incidente nas diferentes condições de cultivo foram obtidas no horário entre 10-11 horas, durante o mês de outubro de 1997, utilizando-se os dados originados por um sensor de radiação acoplado a um porômetro de estado dinâmico, marca LI-COR e modelo LI 1600. Os valores da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) são os seguintes:

- a) $1439 \mu\text{Einstein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a pleno sol;
- b) $885 \mu\text{Einstein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em casa-de-vegetação;
- c) $192 \mu\text{Einstein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ em sub-bosque.

Estes valores são médias obtidas durante o período de uma semana, fazendo-se três leituras diárias por tratamento.

O estudo anatômico foi realizado com materiais fixados e a fixação realizada no local de coleta, em F.A.A. 70% (Johansen, 1940) por 72 horas e, posteriormente, conservado em álcool 70°GL. Foram utilizadas folhas adultas, coletadas no quinto nó, contadas a partir do nó apical, a fim de evitar dúvidas provenientes de eventuais casos de desenvolvimento heteroblástico (Gavilanes, 1981).

2.5.3 Cortes histológicos

As folhas foram seccionadas com auxílio de um micrótomo rotatório, em séries orientadas transversalmente e submetidas ao processo de coloração com safrablau (safranina-azul de astra) (Bukatsh, 1972).

Lâminas permanentes foram preparadas mediante a técnica usual de desidratação pelo álcool etílico (Johansen, 1940 e Sass, 1951) sendo efetuados cortes histológicos com o auxílio do micrótomo rotativo, nas porções mediana, entre o bordo e a nervura mediana.

Foram efetuados cortes paradérmicos na superfície abaxial e cortes transversais na região da nervura central, nos quais obtivemos avaliações relativas ao número médio de estômatos por mm^2 , diâmetro polar e equatorial, assim como o índice estomático. As observações foram realizadas com auxílio de câmara clara adaptada a um microscópio Olympus CBB, seguindo a técnica de Labouriau, Oliveira e Salgado-Labouriau (1961).

O índice estomático (IE) expresso em porcentagem foi calculado segundo as orientações de Salisbury (1927), tendo como base o número de estômatos e de células epidérmicas por unidade de área, utilizando a fórmula matemática:

$$IE = 100.S.(E+S)^{-1}$$

sendo:

S \Rightarrow número de estômatos

E \Rightarrow número de células epidérmicas

2.5.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições, sendo cada parcela constituída de três plantas. Os dados obtidos foram submetidos ao teste F e as médias contrastadas pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade (Banzatto e Kronka, 1995). As variáveis de respostas usadas foram:

- a) número de células (CEL);
- b) número de estômatos (EST);
- c) diâmetro polar (DP);
- d) diâmetro equatorial (DE);
- e) índice estomático (IE).

Foi considerada nas avaliações a posição do corte como sendo as porções basal, mediana e apical das folhas coletadas. Em cada região da lâmina foliar foram observados quatro campos.

2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As epidermes da lâmina foliar são plurisseriadas. Em vista frontal (Figura 6) tanto a adaxial como abaxial são constituídas de células irregulares quanto ao tamanho, com paredes espessas, sendo a abaxial de maior espessura podendo ser reta (folhas a pleno sol) e sinuosa (folhas a sub-bosque), orientada perpendicularmente ao comprimento foliar. A epiderme da face adaxial no tratamento a pleno sol e sub-bosque é constituída de três camadas de células retangulares quanto ao formato, enquanto que no tratamento em casa-de-vegetação é constituída de duas camadas.

O parênquima clorofiliano no tratamento a pleno sol (Figura 6) compreende duas camadas de parênquima paliçádico é constituído por células alongadas e justapostas com pequenos espaços intercelulares, características deste tecido, sendo diferenciado pela composição e organização das células no parênquima lacunoso nas condições de sub-bosque. Observa-se também a coersão das células parenquimáticas nas condições de casa de vegetação. Em todas as condições de cultivo (Figura 6), observa-se que o parênquima paliçádico apresenta uma maior proporcionalidade que o lacunoso, exceto nas condições de sub-bosque. De acordo com Fahn (1985) e Esau (1985), o parênquima lacunoso apresenta uma organização mais variada que paliçádico e, se este último é pluriestratificado a camada mais externa apresenta forma e disposição cada vez mais parecido com o lacunoso, como observados em *Piper hispidinervium*.

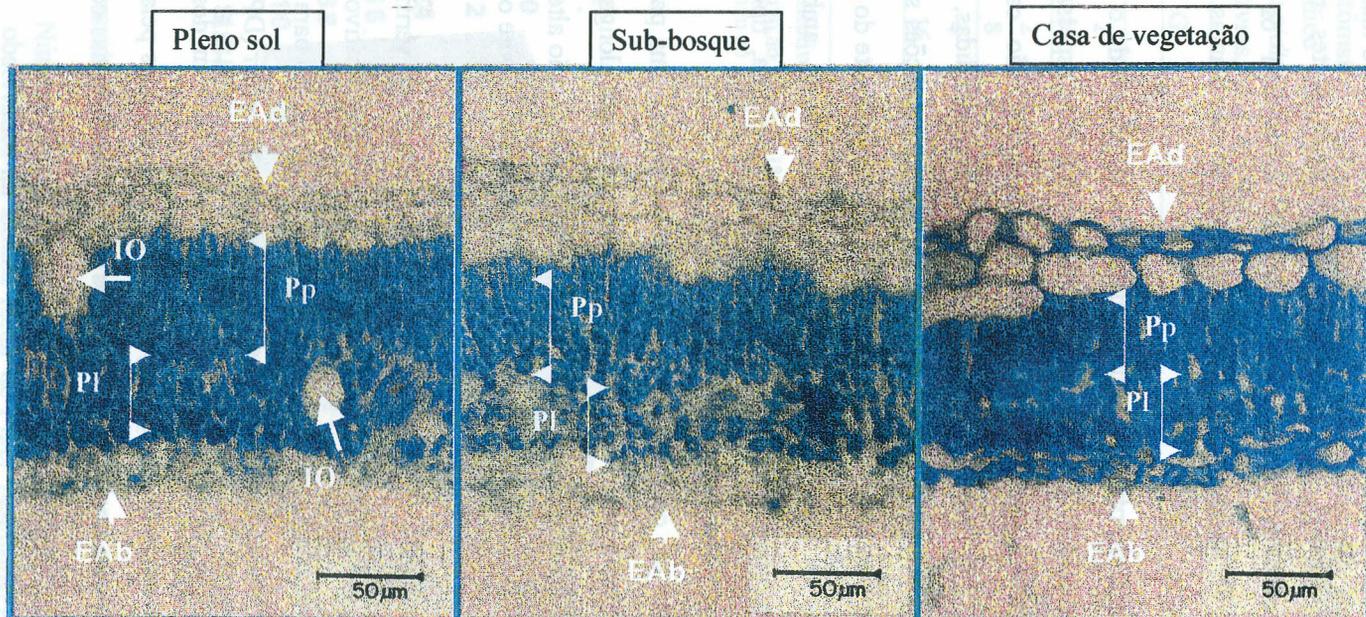


FIGURA 6 – Corte transversal da lâmina foliar de *Piper hispidinervium* C.DC. sob diferentes condições de cultivo. EAd – Epiderme adaxial; EAb – Epiderme abaxial; Pp – Parênquima paliçádico; Pl – Parênquima lacunoso; IO – Idioblasto oleífero

Na secção transversal da lâmina foliar, observa-se que o mesofilo possui organização dorsiventral. Os idioblastos oleíferos existentes no mesofilo concentram-se mais no parênquima lacunoso, confirmam os relatos de Nascimento (1997), havendo uma maior concentração nas plantas cultivadas a pleno sol (Figuras 6).

Parênquima clorofiliano bem desenvolvido, apresentando o paliçádico e o lacunoso equiparados, células epidérmicas com paredes espessas, cutículas delgadas e estômatos em alta densidade e protegidos, são características encontradas em *Piper hispidinervium* que poderiam ser entendidas, do ponto de vista ecológico, como uma adaptação desta espécie às condições sazonais. No entanto, nas campinas amazônicas a água não é o fator limitante do crescimento vegetal, devendo-se levar em consideração outros fatores ambientais que influenciam a estrutura foliar, quais sejam: luz, temperatura, tipo de solo e nutrientes (Araújo e Mendonça, 1998).

O aumento em comprimento das células do parênquima paliçádico nas condições de cultivo a pleno sol poderá ser resultante de um alongamento deste tecido no sentido abaxial, o que, segundo Bjorkman (1981), não altera a área do mesofilo em relação a área foliar, mas aumenta significativamente o seu volume por área foliar e por volume foliar.

Pelos resultados da Tabela 1 observados na Figura 7, verifica-se que o fator tratamento, referente às condições de cultivo, foi significativo ao nível de 5% para a variável número de células (CEL) e ao nível de 1% para números de estômatos (EST), enquanto que para as variáveis diâmetro polar (DP) e diâmetro equatorial (DE) não foi verificada significância para nenhum dos fatores do experimento, indicando que estas variáveis não foram afetadas pelas condições de cultivo, e nem pela posição nas diferentes regiões na folha nas condições em que o trabalho foi executado.

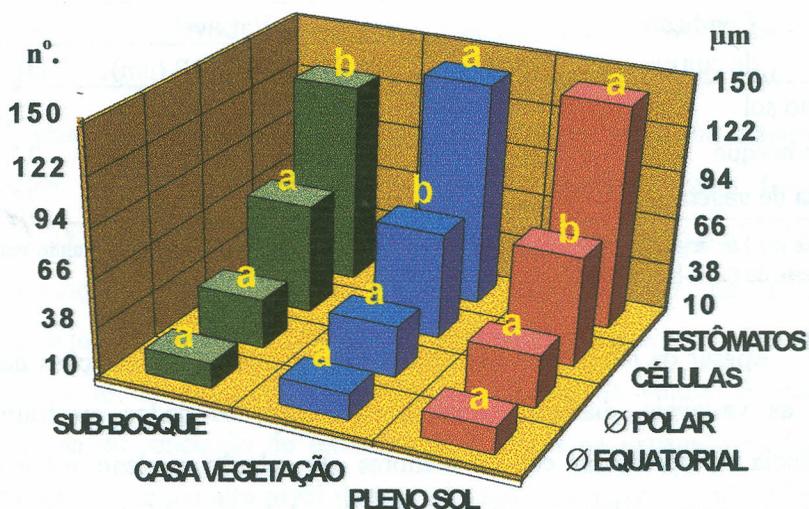
Tabela 1. Resumo da análise de variância para número de células (CEL), estômatos (EST), diâmetro polar (DP), diâmetro equatorial (DE) e índice estomático (IE), obtidos na avaliação de folhas de *Piper hispidinervium* C.DC. sob diferentes condições de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

FV	GL	Quadrado médio				
		CEL	EST	DP	DE	IE
TRAT (T)	2	9,079*	1545,053**	45,904 ^{NS}	10,156 ^{NS}	50,164**
Erro a	12	4,949	110,991	34,495	8,097	3,345
CORTE (C)	2	0,429 ^{NS}	145,584 ^{NS}	6,272 ^{NS}	2,281 ^{NS}	2,449 ^{NS}
Erro b	8	4,412	27,451	2,868	1,994	2,576
T x C	4	4,508 ^{NS}	59,155 ^{NS}	7,552 ^{NS}	1,028 ^{NS}	4,724*
Erro c	16	1,746	111,089	5,430	1,896	4,267
Média geral		73,10	136,479	39,844	25,392	64,727
CV (%)		1,81	7,72	5,85	5,42	3,19

^{NS} não significativo.

** significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

FIGURA 7 - Número de estômatos e de células, diâmetro polar e equatorial observados na lâmina foliar de *Piper hispidinervium* C.DC. sob condições de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

Pela aplicação do teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 2 e Figura 7), observou-se que a condição sub-bosque propiciou um maior número de células em relação às condições de pleno sol e casa de vegetação, sendo que estas últimas não diferiram estatisticamente entre si. Para a variável estômatos, as condições pleno sol e casa de vegetação não diferiram entre si, tendo estas duas condições propiciado um maior número de estômatos quando comparadas com a condição de sub-bosque. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Voltan et al. (1992) que verificaram, em cultivares de cafeeiros, que o número de estômatos decresce literalmente com a diminuição do nível de luz. Para ambas as variáveis não foi detectada significância do fator corte e de sua interação com os tratamentos.

Tabela 2. Quadro de médias para o fator tratamento, número de células (CEL), estômatos (EST), diâmetro polar (DP) e diâmetro equatorial (DE) obtidos na avaliação de folhas de *Piper hispidinervium* C.DC. sob diferentes condições de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

Condição de cultivo	Variável			
	CEL (n°)	EST (n°)	DP (µm)	DE (µm)
Pleno sol	72,48 b ¹	141,35 a	40,22 a	25,24 a
Sub-bosque	73,69 a	126,62 b	39,42 a	24,70 a
Casa de vegetação	72,57 b	140,60 a	39,88 a	25,21 a

¹ As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar de não haver diferença estatística entre as condições de cultivo para as variáveis, diâmetro polar e equatorial, os dados mostraram uma tendência de apresentar células menores em relação a pleno sol e casa de vegetação, comparados com as condições de sub-bosque. Medri e Lleras (1980) concluem que o espaçamento das paredes das células epidérmicas é uma adaptação à perda excessiva de água nos extratos mais xerofíticos da árvore. Em

Piper hispidinervium pode-se relacionar esse espessamento à alta intensidade luminosa, possivelmente aumentando a atividade fotossintética.

Para a variável índice estomático (IE), observa-se, na Tabela 1, que o fator tratamento foi significativo ($Pr < 0,01$), juntamente com a interação Tratamento \times Corte ($Pr < 0,05$). Pelo desdobramento das médias dos tratamentos dentro de cada posição de corte na folha, observa-se, através da Tabela 3 e Figura 8, que para o corte da folha na posição base, a condição de casa de vegetação apresentou o maior índice estomático, seguida da condição a pleno sol e de sub-bosque. Para o corte feito no meio da folha, na condição a pleno sol, foi verificado maior índice estomático seguido das condições casa de vegetação e sub-bosque, sendo que estas não diferiram estatisticamente entre si. Para o corte no ápice da folha, verificou-se superioridade das condições a pleno sol e casa de vegetação seguidas da condição sub-bosque.

Estas observações estão em consonância com as realizadas por Oliveira (1996) em plantas jovens de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum-Sterculiaceae). Para o desdobramento das médias de corte dentro de cada tratamento não foram detectadas diferenças significativas ($Pr > 0,05$). As diferenças observadas no índice estomático da pimenta longa sob diferentes condições de cultivo estão relacionadas com as detectadas para *Guarea guidonea* (L.) Sleumer sob diferentes percentagens de RFA (Castro et al., 1998).

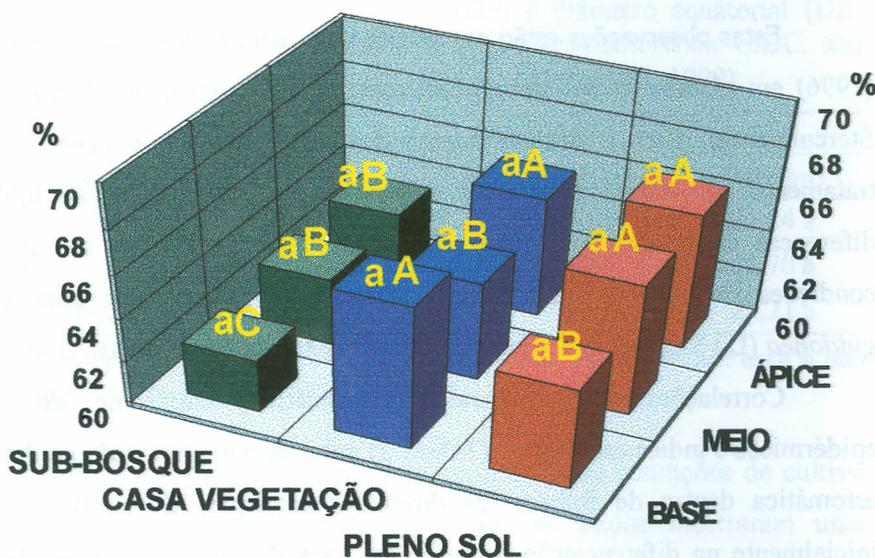
Correlações entre densidade estomática, densidade de células epidérmicas e índice estomático (Tabela 3) indicam que a variação na densidade estomática dentro de folhas, nas diferentes condições de cultivo aparecem inicialmente na diferenciação do estômato para depois na expansão da folha, demonstrando que há um alto nível de variação nas características do estômato dentro e entre as folhas.

Tabela 3. Quadro de médias para o índice estomático (IE), obtido na avaliação de folhas de *Piper hispidinervium* C.DC. sob diferentes condições de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

Posição do corte	Condição de cultivo		
	Pleno sol	Casa de vegetação	Sub-bosque
Base	64,76 a ¹ B ²	66,69 a A	62,52 a C
Meio	66,16 a A	64,62 a B	63,22 a B
Ápice	66,43 a A	65,73 a A	63,49 a B

As médias seguidas pela mesma letra minúscula¹ nas colunas e maiúscula² nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

O aumento no nível de luz em interação com a posição do corte em sub-bosque, casa de vegetação e a pleno sol (Figura 8) proporcionaram um aumento na atividade estomática.



Médias seguidas de mesma letra maiúscula para sistema de cultivo e minúscula para posição de corte não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

FIGURA 8 - Índice estomático observado nas regiões basal, mediana e apical da lâmina foliar de *Piper hispidinervium* C.DC. sob diferentes condições de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

A intensidade de luz pode induzir diferentes graus de xeromorfia ou intensificar características xeromorfas, confirmam os relatos de Withner et al. (1974) e Bonates (1993). Inúmeros dados experimentais citados na literatura mostram que a radiação solar influencia a divisão celular, o crescimento e a diferenciação celular, promovendo os seguintes efeitos: alongamento das células e produção de pigmentos e açúcares com o aumento da pressão osmótica. De acordo com considerações feitas por Rizzini (1995), a diferenciação das células nos tecidos paliçádicos depende estritamente da luz solar e guardam proporções com a intensidade luminosa.

2.7 CONCLUSÕES

Piper hispidinervium apresenta diferenças anatômicas aparentes em microscopia ótica, entre os folíolos nas condições de cultivo estudadas.

As observações contabilizadas neste trabalho permitem que sejam emitidas as seguintes conclusões:

- a) o número de células e de estômatos, e o índice estomático são influenciados significativamente pelas condições de cultivo;
- b) o número de células é maior na condição de sub-bosque, havendo redução do diâmetro polar e equatorial quando comparado com os outros dois sistemas que não diferenciaram significativamente;
- c) o número de estômatos é superior nas condições de pleno sol e de casa de vegetação;
- d) o diâmetro polar e o equatorial não são afetados significativamente pelas condições de cultivo, mas são influenciados pelo aumento da intensidade luminosa.
- e) as condições de cultivo mostram que a radiação solar influencia no crescimento e desenvolvimento dos tecidos vegetais.

2.8 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho não podem ser conclusivos em relação ao grau de plasticidade fenotípica apresentado pela espécie ou mesmo à maior adaptabilidade da planta neste ou naquele ambiente. Faz-se necessária uma análise mais detalhada da anatomia foliar com estudos mais abrangentes, incluindo parâmetros que não foram aqui considerados, tais como: espessura das paredes celulares, relações superfície-volume da área foliar, densidade de venação do mesofilo e quantificação do xilema.

2.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMO, S.R. Del. Algunos aspectos de la influencia de la luz sobre el crecimiento de estados juveniles de especies primarias. In: GOMES-POMPA, A.L. **Renneracion de selvas**. México: Editora Alhamba Mexicana, 1985. p.79-90.
- ARAÚJO, M.G.P. de; MENDONÇA, M.S. de. Escleromorfismo foliar de *Aldina heterophylla* Spruce ex Benth (Leguminosae: Papilionoideae) em três campinas da Amazônia Central. *Acta Amazônica*, Manaus, v.28, n.4, p.353-371, 1998.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S. do N. **Experimentação agrícola**. 3.ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 247p.
- BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1984. 3v.
- BJORKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B.; ZIEGLER, H. (eds). **Encyclopedia of Plant Physiology: Physiological Plant Ecology I**. New York: Springer-Verlag, 1981. v.12, p.57-107, (New series).
- BONATES, L.M.C. Estudos ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazônia, II- Anatomia ecológica foliar de espécies com metabolismo CAM de uma campina da Amazônia Central. *Acta Amazônica*, Manaus, v.23, n.4, p.315-348, 1993.
- BUKATSH, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. *Microkosmos*, Stuttgart, v.61, p.255, 1972.
- CASTRO, E.M. de; GAVILANES, M.L.; ALVARENGA, A.A.; et al. Aspectos da anatomia foliar de mudas de *Guarea guidonea* (L.) Sleumar sob diferentes níveis de radiação fotossinteticamente ativa. *Daphne*, Belo Horizonte, 1998.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2.ed. New York: New York Botanical Garden, 1968. 555p.
- ECKERSON, S. H. The number and size of stomata. *Botanical Gazette*, Chicago, v.46, p.221-224, 1908.
- ESAU, K. **Anatomia Vegetal**. 3.ed. Barcelona: Omega, 1985. 779p.

- FAHN, A. **Anatomia Vegetal**. Madrid: Pirâmide, 1985. 599p.
- GAVILANES, M.L. **Anatomia e nervação foliar de espécies nativas do gênero *Gomphera* L. (Amaranthaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre: UFRS, 1981. 146p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Biológicas)
- GUPTA, B. Correlation of tissues in leaves. Absolute stomatal numbers. **Annals of Botany**, London, v.25, p.71-77, 1961.
- HIRANO, E. Relative abundance of stomata in *Citrus* and related genera. **Botanical Gazette**, Chicago, v.92, p.276-310, 1931.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523p.
- JOLY, A.B. **Botânica: Introdução a taxonomia vegetal**. 2.ed. São Paulo, Editora Nacional & EDUSP, 1975. 777p.
- KNECHT, G. N.; ORTON, E. R. Stomate density in relation to winter hardiness of *Ilex opaca* Ait. **Journal of the American of Society Horticultural Science**, Mount, VA, v.95, n.3, p.341-345, 1970.
- LABOURIAU, L.G.; OLIVEIRA, J.C.; SALGADO-LABOURIAU, M.L. Transpiração de *Shizolobium parahyba* (Vell.). TOLEDO, J. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais, Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.237-257, 1961.
- LAWRENCE, G.H.M. **Taxonomy of vascular plants**. New York: MacMillan, 1920. 823p.
- MEDRI, M.E.; LLERAS, E. Ecofisiologia de plantas da Amazônia. Anatomia foliar e ecofisiologia de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Castanha -do-Pará) - Lecythidaceae. **Acta Amazônica**, Manaus, v.9, n.1, p.15-23, 1980.
- MEIDNER, H.; MANSFIELD, T.A. **Physiology of stomata**. New York: McGraw-Hill, 1968.
- NASCIMENTO, M.E. **Aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Piper hispidinerviium* C.DC. (Piperaceae) e suas estruturas secretoras**. Belém: UFPa/MPEG, 1997. 78p. (Dissertação – Mestrado em Biologia Ambiental)

- OLIVEIRA, M.N.S. de. **Comportamento fisiológico de plantas de acerola, carambola, pitanga, cupuaçu, graviola, pupunha e biribá em função da baixa disponibilidade de água no solo.** Lavras: UFLA, 1996. 67p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- PENFOUND, W. T. Plant anatomy as conditioned by light intensity and soil moisture. **American Journal of Botanical**, Botany Columbus, v.18, p.558-572, 1931.
- PINTO, M.; VARELA, V.P.; BATALHA, L.F.P. Influência do sombreamento no desenvolvimento de mudas de louro (*Licaria canela* (Meiss.) Kosterm.). **Acta Amazônica**, Manaus, v.23, n.4, p.397-402, 1993.
- REA, M. Stomata and hydathodes in *Campanula rotundifolia* L. and their relation to environment. **New Phytologist**, Cambridge, n.20, p.55-72, 1921.
- RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira.** 2.ed. Rev. e atual. – Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 248p.
- SALATINO, A.; MONTENEGRO, G.; SALATINO, M.L.F. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.9, p.117-124, 1986.
- SALISBURY, E.J. On the causes and ecological significance of stomatal frequency. With special reference to the woodland Flora. **Philosophical Transaction Royal Society London**, London, n.217, p.1-65, 1927. (Serie B)
- SASS, J.E. **Botanical microtechnique.** 2.ed. Iowa: Iowa State College Press, 1951. 228p.
- SCHULTZ, A.R. **Botânica sistemática.** Porto Alegre: Globo, 1963. v.2, 427p.
- VOLTAN, R.B.Q.; FAHL, J.I.; CARELLI, M.L.C. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.4, n.2, p.99-105, 1992.
- WITHNER, C.L.; NELSON, P.K.; WEJKSNORA, P.J. The anatomy of orchids. In: WITHNER, C.L. (ed.) **The orchids, scientific studies**, New York: John Wiley, 1974. p.347-367.

CAPÍTULO 3

CRESCIMENTO DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* C.DC.) SUBMETIDA A DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO E FÓSFORO “IN VITRO”

RESUMO

SANTIAGO, E.J.A. de; Crescimento de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) submetida a diferentes doses de N e P “in vitro”. Lavras: UFLA, 1999. 118p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, área Fitotecnia)

A Amazônia brasileira apresenta grande número de espécies vegetais aromáticas disponíveis, embora a maioria seja pouco conhecida e ainda não pesquisada. A flora aromática nativa vem sendo alvo de vários estudos básicos que tentam identificar espécies com potencial econômico para diversos fins. Dentre as plantas nativas desta região, destaca-se a pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC. - Piperaceae) que produz um óleo essencial conhecido por safrol, bastante utilizado para aromatizar cervejas e refrigerantes, como agente de fragrâncias e sinergismo de inseticida e herbicida, biodegradáveis. As interações entre nutrientes na planta são limitantes para o seu crescimento, assim como na síntese e ativação de diversos compostos essenciais para a manutenção do metabolismo. Desta forma, os efeitos de variações e combinações de doses de N(NH_4NO_3) (0; $\frac{1}{4}$; $\frac{1}{2}$; 1 e 2) e de P(KH_2PO_4) ($\frac{1}{2}$; 1 e 2) do meio de cultura básico de MS sobre o crescimento de plântulas de pimenta longa foram avaliados sob condições de cultivo *in vitro*. Os demais constituintes inorgânicos e orgânicos do meio básico foram mantidos sem a utilização de reguladores de crescimento. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, esquema fatorial 5x3 (NxP) com 3 repetições. Os dados obtidos foram submetidos a análise de regressão e, ao teste F, ao nível de 5% de probabilidade. Após 75 dias, observou-se que a redução do nitrogênio amoniacal do meio MS não afetou expressivamente o peso da matéria fresca e seca da pimenta longa, quando associado à dosagem normal e duplicada de fósforo. A suspensão do nitrogênio amoniacal do meio MS, mantendo-se apenas o nitrato (KNO_3), proporcionou um maior crescimento em peso fresco e seco de plântulas de pimenta longa “in vitro”. O aumento na relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ proporcionou um aumento considerável na produção de matéria seca total. A equação quadrática foi a que melhor explicou os efeitos isolados na interação N*P para todas as variáveis de respostas que apresentaram efeito significativo.

Termos para indexação: Cultura de tecidos; cultura “in vitro”; Piperaceae; nutrição mineral; *Piper hispidinervium* C.DC.; nitrogênio; fósforo.

Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador), Janice Guedes de Carvalho – UFLA, Manuel Losada Gavilanes – UFLA e Evaristo Mauro de Castro – UFLA.

ABSTRACT

SANTIAGO, E.J.A. de; Growth of long pepper (*Piper hispidinervium* C. DC.) submitted to different doses of N and P "in vitro". Lavras: UFLA, 1999. 118p. (Dissertation - Master's degree in Agronomy/Agriculture)

The Brazilian Amazonia presents a great number of available aromatic plant species, although most of them be little known and not yet researched. The native aromatic flora has been target of several basic studies which try to identify species with economic potential for a number of different purposes. Out the species native to this region, long pepper stands out (*Piper hispidinervium* C.DC. - Piperaceae) which yields an essential oil known as safrole, which quite utilized for aromatizing both beers and refreshments, as a fragrance agent and synergism of biodegradable insecticide and herbicide. The interactions among nutrients in the plant are limiting to its growth as well as in synthesis and activation of several compounds essential to the maintenance of the metabolism. Thus, the effects of variations and combinations of doses of N(NH_4NO_3) (0; $\frac{1}{4}$; $\frac{1}{2}$; 1 and 2) and of P(KH_2PO_4) and ($\frac{1}{2}$; 1 and 2) of MS basic culture medium upon the growth of seedlings of long pepper were evaluated, under in vitro conditions. The other constituents, both inorganic and organic were of basic medium were maintained, without the utilization of growth regulators. The experimental design was in randomized blocks in a 5×3 factorial scheme (N*P) with 3 replications. The data obtained were submitted to the analysis of variance and to F test at the 5% level of probability. After 75 days, it was found that the reduction of ammonium nitrogen of the MS medium did not affect markedly the weight of the dry and fresh matter of long pepper as associated with the normal and doubled dosage of phosphorus. The ammonium nitrogen suspension of the MS medium, maintaining only nitrate (KNO_3) provided a greater growth in fresh and dry weight of long pepper seedlings "in vitro". The increased of the $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ratio provided and outstanding rise in total dry matter yield. The quadratic equation was the one which best accounted for the isolated effects in the N*P interaction for all the variables of responses which presented significant effect.

Index Terms: Tissue culture, "In vitro" culture, Piperaceae; mineral nutrition, *Piper hispidinervium* C.DC; nitrogen; phosphorus.

Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major Professor), Janice Guedes de Carvalho – UFLA, Manuel Losada Gavilanes – UFLA and Evaristo Mauro de Castro – UFLA.

3.3 INTRODUÇÃO

Calcula-se que o Brasil disponha de 60 a 250 mil espécies vegetais, das quais 40% devem conter propriedades terapêuticas (Oliveira, Akissue e Akissue, 1991), ocasionando interesses crescentes pela fitoterapia e pela homeopatia como opções terapêuticas. Dos medicamentos atualmente produzidos pelas indústrias e comercializados nas farmácias e drogarias, 25% têm componentes químicos de plantas. No caso dos remédios homeopáticos esta porcentagem aumenta para 60%.

Mais importante do que conhecer os sintomas de deficiência nutricional apresentada pelas plantas é saber quais os fatores que levam a isso, procurando dotar as plantas das condições necessárias para que tenham um bom estado nutricional.

A biotecnologia compõe áreas, como a cultura de tecidos vegetais, que é a técnica com maior êxito no cenário mundial. Os meios nutritivos utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos da planta fornecem substâncias essenciais para o crescimento e controlam o padrão do desenvolvimento “in vitro”. Conforme a quantidade com que um determinado elemento entra na composição da planta, ele é classificado como macro ou micronutriente (grande ou pequena quantidade, respectivamente). Porém, todos desempenham funções vitais nas plantas, dos quais três são provenientes do ar ou da água e existem em grande quantidade no meio ambiente. São o carbono, oxigênio e o hidrogênio e, a rigor, não são considerados nutrientes. Os demais provêm do solo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) submetidas a diferentes doses de nitrogênio e fósforo “in vitro”.

3.4 REFERENCIAL TEÓRICO

O conhecimento das funções exercidas pelos elementos químicos na planta é fundamental para entender como vive a planta e também os métodos destinados a avaliar o seu estado natural. Os elementos, macro e micro, exercem funções específicas na vida da planta, embora em algumas delas possa haver, dependendo do elemento, um certo grau de substituição (Malavolta, Vitti e Oliveira, 1997).

A quantidade de nutrientes exigida pela planta é em função dos seus teores no material vegetal e do total de matéria seca produzida. Os minerais são o grupo de nutrientes mais importante, após a fonte de carboidratos, para o desenvolvimento “in vitro”. O meio de cultura mais popular é o de Murashige e Skoog (1962), justamente porque a maioria das espécies reage favoravelmente. Entretanto, a solução nutritiva nem sempre é favorável para o crescimento, devido a alta composição dos sais minerais.

3.4.1 O nitrogênio na planta

O nitrogênio é facilmente redistribuído nas plantas através do floema, na forma de aminoácidos e quando seu suprimento a nitrogênio pelo meio é insuficiente, o nitrogênio das folhas velhas é mobilizado para os órgãos e folhas mais novas. O total de nitrogênio requerido para um bom crescimento, dependendo da espécie, é de 12 a 60mM, na qual o conteúdo de NH_4^+ varia entre 6 a 20mM e o NO_3^- entre 6 a 40mM, embora muitas plantas prefiram NO_3^- do que NH_4^+ (George e Sherrington, 1984).

Nambiar, Nair e Money (1965) relatam que adubações nitrogenadas excessivas em pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L. - Piperaceae) favorecem o

aparecimento de doenças. De acordo com relatos feitos por Kato (1978), as plantas adultas de pimenta-do-reino necessitam anualmente do acréscimo de 90g de N, 10g de P, 120g de K, 80g de Ca e 11g de Mg para sua manutenção e produção comercialmente viável.

O nitrogênio, por exemplo, tem ação bem controversa: quando em déficit, provoca, em papoula (*Papaver somniferum* L. - Papaveraceae) e beladona, (*Atropa belladonna* L. - Solanaceae) aumento na concentração dos alcalóides, enquanto que na lobélia (*Lobelia inflata* L. - Lobeliaceae) há redução. Em camomila (*Chamomila recutita* L. - Asteraceae), o nitrogênio, em interação com o potássio, provoca aumento do rendimento em óleo essencial por unidade de área. Na maioria das vezes, as adubações com nitrogênio mineral (sulfato de amônio, uréia, etc.) podem trazer problemas na produção de substâncias ativas como ocorre na losna (*Artemisia absinthium* L. - Asteraceae), na erva-cidreira-de-arbusto (*Lippia* sp. - Verbenaceae), no coentro (*Coriandrum sativum* L. - Apiaceae), na melissa ou erva-cidreira-rasteira (*Melissa officinalis* L. - Lamiaceae). Por isso, este elemento deve ser fornecido somente pela adubação orgânica, mesmo assim sem excesso (Martins et al.,1995).

Para Nagao, Pasqual e Ramos (1994), citados por Miranda (1997), o crescimento e a morfogênese de células e tecidos de plantas cultivadas “in vitro” são marcadamente influenciados pela disponibilidade e pela forma sob a qual o nitrogênio é suplementado no meio de cultivo.

Bocsa, Mathe e Hangiel (1996) observaram que altas doses de N (600ppm) reduziram a produção de THC (D-9-tetrahidrocanabinol) em *Cannabis sativa* L. (Moraceae).

É usual suprir-se o nitrogênio na forma de íons NH_4^+ e NO_3^- , embora algumas plantas possam se desenvolver em soluções contendo nitrogênio somente na forma de nitrato (George e Sherrington, 1984), isto é observado nos

meios nutritivos de Guatheret (1942) e White (1943) que possuem na sua composição o nitrogênio, unicamente na forma de nitrato.

3.4.2 O fósforo na planta

O fósforo, elemento deficiente em nossos solos, também requer cuidados quanto ao seu uso e contribui para o aumento da concentração de alcalóides na beladona (*Atropa beladonna* L. - Solanaceae) e de substâncias aromáticas no coentro (*Coriandrum sativum* L. - Apiaceae) e no funcho (*Foeniculum vulgare* Mill. - Apiaceae). O seu déficit no solo reduz a concentração de cumarinas em chambá ou anador do nordeste brasileiro (*Justicia pectoralis* var. *stenoohilla* Jacq. - Acanthaceae), mas o efeito mais negativo é a redução da produção de biomassa, reduzindo a produção global de princípio ativo. Assim, pode-se adicionar fósforo aos solos, preferencialmente em formas menos solúveis (fosfatos naturais, farinha de ossos, etc.), ou mesmo só o composto orgânico Martins et al. (1995).

Silberstein e Wittwer (1951) demonstraram que H_2PO_4^- é absorvido mais rapidamente que outros compostos orgânicos e inorgânicos. Estes resultados foram confirmados por Yogaratan, Allen e Greenham (1981) em folhas de macieira que absorveram mais fósforo de H_2PO_4^- que de fosfatos de potássio, sódio e cálcio.

Teixeira et al. (1997), estudaram o efeito de nutrientes minerais no crescimento e no conteúdo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae), reportando que o crescimento vegetativo e o acúmulo de frutanos não foram afetados pela ausência de fósforo.

A concentração de fosfato no meio de cultura também pode ser um importante fator no crescimento de células em suspensão e na produção de metabólitos secundários, uma vez que o fósforo constitui os nucleotídeos que

são importantes para o fornecimento de energia metabólica na forma de ATP, segundo afirmativa de Abreu (1998).

3.4.3 Nitrogênio X fósforo

A interação entre o nitrogênio e o fósforo é bem conhecida na síntese e ativação de diversos compostos essenciais para a manutenção do metabolismo das plantas, relata Abreu (1998), convicta de que há uma correlação positiva entre estes elementos na produção de polissacarídeos ácidos da parede celular, visto ser este um sistema altamente complexo e dinâmico, cuja composição e estrutura variam durante o crescimento e a diferenciação da célula e em respostas a fatores ambientais. O nitrogênio e o fósforo estão entre os seis elementos (nitrogênio, fósforo, enxofre, cálcio, potássio e magnésio) que são requeridos em grandes quantidades comparativamente e, por isso, são chamados de macronutrientes (Carneiro, 1997).

Na espécie *Atropa belladonna* L. (Solanaceae), Montanari Jr., Figueira e Magalhães (1993) observaram que a fertilização com NPK promoveu o aumento na acumulação de biomassa sem alterar o teor do alcalóide. No entanto, *Datura stramonium* L. (Solanaceae) tratada com NH_4NO_3 teve o teor de alcalóide hyoscyamina aumentado e também maior acúmulo de biomassa (Demeyar e Dejaegere, 1992). Os resultados encontrados por Kharwara, Awasthi e Singh (1986) demonstraram que plantas de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae) quando tratadas com fertilizantes nitrogenados e fosfatados, aumentam significativamente o teor do alcalóide morfina nas sementes.

Adamovic et al. (1992), verificaram a influência de N, P, K, Mg e Ca no acúmulo de substâncias ativas (Glaucine) em plantas medicinais (*Glaucium flavum* Crantz - Papaveraceae). Houve uma correlação positiva entre produção

de glaucine e concentrações de P e K nas folhas, e negativa com a concentração de Mg.

Praszna e Bernáth (1993) examinaram a influência da deficiência dos principais nutrientes (N-P-K) sobre a morfologia e mudanças de produtividade em várias espécies de plantas medicinais, visando responder questões como até onde a produção de óleo essencial de peppermint e a proporção dos principais componentes do óleo volátil (mentol, mentone e metilacetato) pode ser influenciada pela falta dos nutrientes principais (N-P-K). Além disso, foi também examinado se as conseqüências de suprimento incompleto pode ser cessado dentro da vida do vegetal. Os resultados revelam, no caso da falta completa de N e P, que a produção do óleo essencial da peppermint decresce significativamente e muda a proporção dos componentes do óleo essencial. O decréscimo maior de produção de óleo essencial foi mostrado no caso da falta de K. Tratamentos feitos em ordem para cessar as conseqüências do desenvolvimento inicial por causa da falta de N e P, aumentaram significativamente a produção de óleo volátil e variaram a proporção dos principais componentes do óleo. No caso da falta de K, o tratamento aumentou o conteúdo de óleo essencial num grau consideravelmente mais baixo.

Clarkson et al. (1996) observaram que os fluxos de NO_3^- e NH_4^+ através da membrana plasmática das células da raiz das plantas são caracteristicamente grandes, usualmente maior que $4\mu\text{mol/g}$ de matéria fresca de raiz/hora. Estes fluxos são 5 a 10 vezes maiores do que aqueles verificados para PO_4^- ou SO_4^- , mas podem ser comparados com os observados para K^+ . O reservatório citoplasmático de NO_3^- e NH_4^+ , todavia, não é grande.

O balanço entre íons, nitrato e amônio, tem merecido maior destaque nos estudos realizados sobre crescimento e multiplicação “in vitro”, portanto, é necessário determinar uma melhor relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ para um ótimo crescimento de plântulas “in vitro” de *Piper hispidinervium* C.DC.

3.5 MATERIAL E MÉTODOS

3.5.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil, a uma altitude de 900 metros, 21°14'06" de Latitude Sul e 45° de Longitude WGr.

3.5.2 Material botânico e obtenção do explante

Sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) foram utilizadas como fonte de explantes para o cultivo "in vitro". Estas foram desinfestadas em solução comercial de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos, sob agitação, e lavadas quatro vezes em água esterilizada e autoclavada. Foi utilizado o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) a meia força, sem suplementação de reguladores de crescimento, para a germinação. Após a inoculação, foram mantidas em ambiente de sala de crescimento com as seguintes condições microclimáticas: temperatura do ar de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 5\%$, fotoperíodo de 16h/8h (claro/escuro) sob irradiância $25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, utilizando-se NaOH ou HCl a 0,1N e solidificado com agar a 0,7%. O máximo de germinação ocorreu aos 12 dias após a inoculação, quando cerca de 90% das sementes apresentavam cerca de 0,5cm de protusão do sistema radicular.

3.5.3. Experimento

Neste trabalho, foram estudadas as exigências nutricionais da pimenta longa através de variações e combinações de doses de nitrogênio (N) e fósforo (P) do meio de cultura de MS. O experimento constou de quinze tratamentos, mostrados no Quadro 1, (cinco doses de N e três doses de P), em cuja constituição variou em 0, ¼, ½, 1 e 2 vezes a concentração de N do nitrato de amônia (NH₄NO₃) e em ½, 1 e 2 vezes a concentração de P do monofosfato ácido de potássio (KH₂PO₄), que são normalmente usados no meio nutritivo de MS. Os demais constituintes inorgânicos e orgânicos do meio básico de MS foram mantidos constantes e não se utilizou nenhum regulador de crescimento. O pH e a solidificação do meio de cultura foi semelhante ao utilizado para a germinação das sementes de pimenta longa.

QUADRO 1 – Tratamentos com as variações e combinações das doses de nitrogênio e fósforo do meio nutritivo de MS (1962) (UFLA, Lavras, MG, 1999).

Concentrações (mM)					
P (KH ₂ PO ₄)	N (Total) (NH ₄ NO ₃ + KNO ₃)				
	18,80	29,10	39,40	60,00	101,20
0,625	T01	T02	T03	T04	T05
1,250	T06	T07	T08	T09	T10
2,500	T11	T12	T13	T14	T15

A concentração de nitrogênio variou através da manipulação da solução que contém 1650mg.L⁻¹ de nitrato de amônio (NH₄NO₃), permanecendo invariável a solução de 1900mg.L⁻¹ de nitrato de potássio (KNO₃) do meio

nutritivo de MS (Tabela 4). Variou-se a concentração de fósforo pela adição de KH_2PO_4 ao meio MS, em três doses (Tabela 5).

TABELA 4 – Variação das doses de nitrogênio (NH_4NO_3) e a relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ do meio nutritivo de Murashige e Skoog (1962).

Variação NH_4NO_3	mM		N Total		Relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	% de N do MS
	NO_3^-	NH_4^+	mM	mg.L^{-1}		
0	18,80	0,00	18,80	263,20	-	31
¼	23,95	5,15	29,10	407,40	4,65/1,0	49
½	29,10	10,30	39,40	551,60	2,82/1,0	66
1	39,40	20,60	60,00	840,00	1,91/1,0	100
2	60,00	41,20	101,20	1416,80	1,46/1,0	200

TABELA 5 – Variação das doses de fósforo (KH_2PO_4) do meio nutritivo de Murashige e Skoog (1962).

Quantidade de P fornecida ao meio MS	Concentração de KH_2PO_4	
	(mM)	(mg.L^{-1})
½	0,625	85,00
1	1,250	170,00
2	2,500	340,00

A aplicação dos tratamentos (Quadro 1) foi iniciada 20 dias após a inoculação das sementes no meio de germinação, procedendo-se a inoculação das plântulas para tubos de ensaio medindo 25mm de diâmetro x 150mm de comprimento, contendo 10mL de meio de cultura de cada tratamento, em condições de câmara de fluxo laminar, marca VECO. Após a inoculação, as plântulas foram cultivadas em sala de crescimento, cujas condições de ambiente foram as mesmas usadas durante a germinação. As Figuras 9 e 10 mostram

alguns aspectos gerais do desenvolvimento da pimenta longa, durante o curso deste experimento.

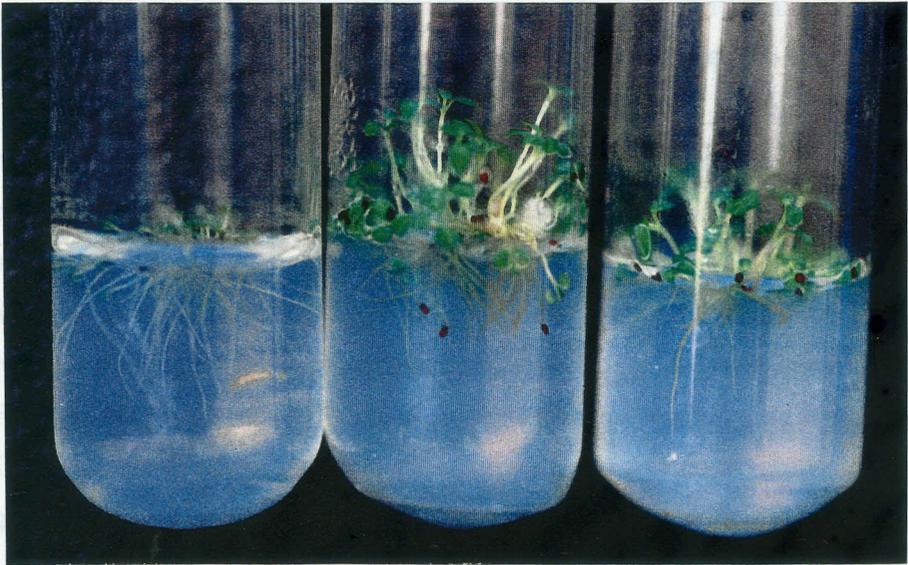


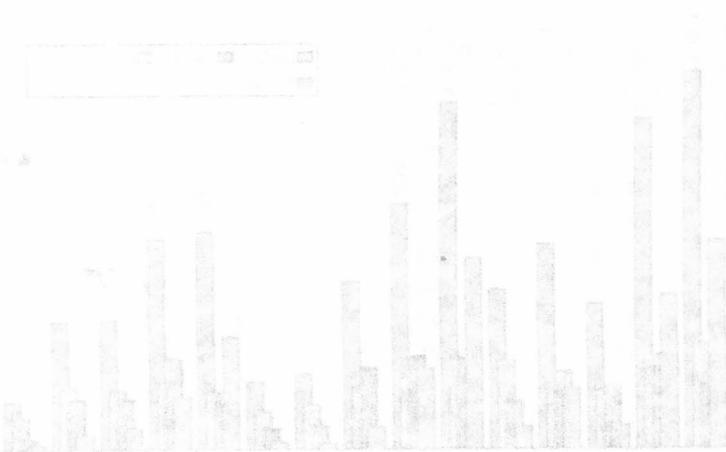
FIGURA 9. Plântula de pimenta longa germinadas “in vitro”, aos 20 dias (UFLA, Lavras, MG, 1999).



FIGURA 10. Pimenta longa “in vitro”, aos 30, 45 e 75 dias após a aplicação dos tratamentos (UFLA, Lavras, MG, 1999).

3.5.4 Delineamento experimental

O experimento teve a duração de setenta e cinco dias e foi conduzido sob delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3 (5 doses de N e 3 doses de P), com três repetições. Cada parcela experimental constou de cinco tubos de ensaio, cada um contendo uma planta. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados através das seguintes variáveis de resposta: matéria fresca da raiz (MFR), caule (MFC) e folha (MFF) e matéria seca da raiz (MSR), caule (MSC) e folha (MSF). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância através do programa estatístico SANEST (Zonta, Machado e Silveira Júnior, 1984; Veiga, 1997).



3.6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.6.1. Matéria fresca total

Observa-se na Figura 11 e na Tabela 6 que o peso da matéria fresca da raiz, caule, folha e total das plântulas de pimenta longa cultivadas “in vitro” tiveram uma tendência de maior crescimento, quando se utilizaram maiores relações $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. No entanto, a retirada do nitrogênio amoniacal foi mais benéfica, salientando que esta espécie prefere assimilação do N na forma de nitrato do que amônio, estando em acordo com a afirmativa de George e Sherrington (1984).

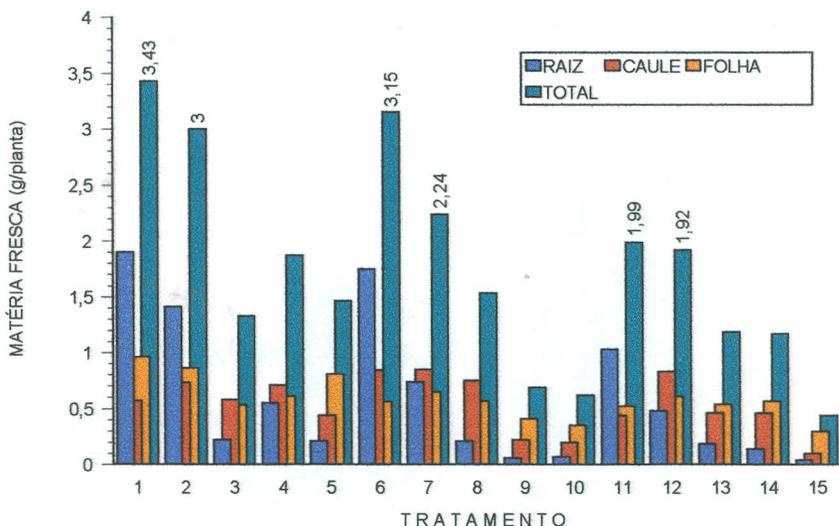


FIGURA 11 – Peso da matéria fresca da raiz, caule, folha e total, avaliado após 75 dias de cultivo através da variação das doses de nitrogênio e de fósforo fornecidos ao meio nutritivo de Murashige e Skoog (1962) (UFLA, Lavras, MG, 1999).

TABELA 6 - Caracteres avaliados em matéria fresca da raiz, caule e folha, através da variação das doses de nitrogênio e de fósforo fornecidos ao meio nutritivo de MS (UFLA, Lavras, MG, 1999).

Tratamento	Total de N (mg.L ⁻¹)	Total de P (mg.L ⁻¹)	Relação NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	Relação N/P
01	263,20	85,00	-	3,10
02	407,40	85,00	4,65	4,80
03	551,60	85,00	2,82	6,49
04	840,00	85,00	1,91	9,88
05	1416,80	85,00	1,46	16,67
06	263,20	170,00	-	1,55
07	407,40	170,00	4,65	2,40
08	551,60	170,00	2,82	3,24
09	840,00	170,00	1,91	4,94
10	1416,80	170,00	1,46	8,33
11	263,20	340,00	-	0,77
12	407,40	340,00	4,65	1,20
13	551,60	340,00	2,82	1,62
14	840,00	340,00	1,91	2,47
15	1416,80	340,00	1,46	4,17

Tratamento	MATÉRIA FRESCA (g)			
	RAIZ	CAULE	FOLHA	TOTAL
01	1,90	0,57	0,96	3,43
02	1,41	0,73	0,86	3,00
03	0,22	0,58	0,53	1,33
04	0,55	0,71	0,61	1,87
05	0,21	0,44	0,81	1,46
06	1,75	0,84	0,56	3,15
07	0,74	0,85	0,65	2,24
08	0,21	0,75	0,57	1,53
09	0,06	0,22	0,41	0,69
10	0,07	0,20	0,35	0,62
11	1,03	0,44	0,52	1,99
12	0,48	0,83	0,61	1,92
13	0,19	0,46	0,54	1,19
14	0,14	0,46	0,57	1,17
15	0,04	0,10	0,30	0,44

Nota-se também que a melhor concentração de nitrogênio total para o melhor desenvolvimento ficou entre 263,20 a 407,40mg.L⁻¹, sem levar em consideração o fósforo. Quando o fósforo é levado em conta, o nitrogênio também manteve as concentrações de 263,20 a 407,40mg.L⁻¹ e o fósforo ficou em 85mg.L⁻¹, mas quando as doses de fósforo foram aumentando, houve uma tendência de queda na produção de matéria fresca total.

A relação N/P influenciou no peso da matéria fresca total, ou seja, quanto menor a relação maior foi o ganho de peso da matéria fresca. Observou-se que a relação N/P atingiu valores máximos de 16,67 para os tratamentos em que foi reduzido pela metade o fósforo do meio MS e 4,17 para tratamentos em que foi dobrada a quantidade, valores que condicionaram a produção de matéria fresca, haja vista que Marchal et al. (1988) recomendam uma relação de N/P de 10,0. Taxas de crescimento relativamente boas, mesmo com a redução do nitrogênio amoniacal e nitrogênio total do meio, também foram encontradas por Nannetti (1994) em cultivo “in vitro” de *Heliconia* sp. (Musaceae).

Os resultados obtidos indicam que a interação entre o nitrogênio e o fósforo é importante para a produção de matéria fresca total e que a relação nitrato e amônio influencia no desenvolvimento da pimenta longa. Sato (1994), trabalhando com propagação de gérbera (*Gerbera jamesonii* Bolus – Asteraceae) através da cultura de tecidos, utilizando material clonal, concluiu que, reduzindo a concentração de nitrogênio do meio MS, haverá melhor indução de brotos adventícios e que estas concentrações estão relacionadas com o material genético, sendo diferentes para os clones estudados.

3.6.2 Matéria fresca da raiz

Os resultados da análise estatística da variável matéria fresca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida às variações e combinações de doses de N e

P, em condições de cultivo “in vitro” são mostrados na Tabela 7. Observam-se efeitos significativos para N e para a interação N*P ($Pr < 0,01$). A não adição do nitrogênio amoniacal resultou no maior peso da matéria fresca da raiz, mesmo com a redução do fósforo. Trabalhando com *Eucalyptus citriodora* Hook (Myrtaceae), Grewal, Ahuja e Atal (1980) reportam que ao reduzir pela metade as concentrações de nitrato de amônia e de nitrato de potássio do meio MS, a taxa de multiplicação dobrou.

TABELA 7 - Resumo da anava para a variável peso da matéria fresca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
N	4	1,5322**
P	2	0,1171 ^{ns}
N*P	8	1,2936**
Resíduo	30	0,1379

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

Os desdobramentos da interação N*P das doses de N dentro do fator P (Tabela 1A) mostraram um efeito quadrático significativo na dose de 85mg.L⁻¹ de P ($Pr < 0,01$) e efeitos lineares significativos nas doses 170mg.L⁻¹ e 340mg.L⁻¹ de P ($Pr < 0,05$). O efeito quadrático observado na Figura 12 e Tabela 2A significa que à medida que a dose de N vai aumentando, há uma diminuição na MFR até que a concentração de P (KH₂PO₄) seja a normal do meio MS (170mg.L⁻¹), voltando a crescer lentamente à medida em que a dose vai aumentando. Murashige (1977) comenta que o nível de fósforo comumente usado no meio MS é considerado baixo. Todavia, o efeito linear observado significa que quando a dose de N aumenta, há uma diminuição na MFR, também observada no decréscimo da relação NO₃⁻/NH₄⁺.

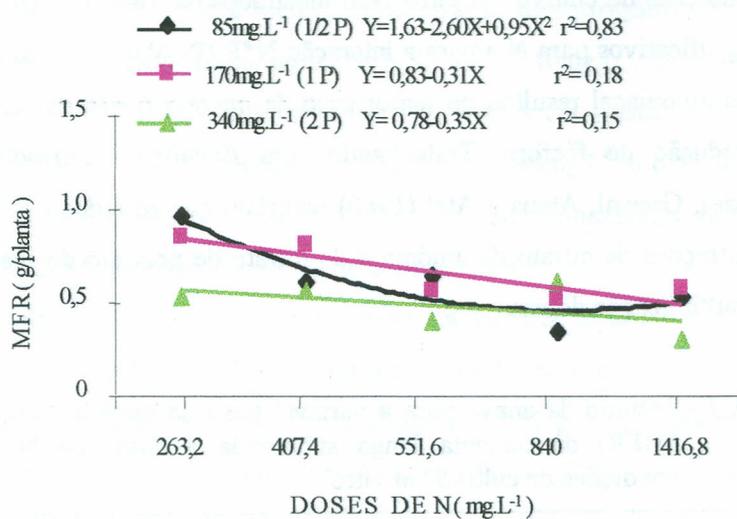


FIGURA 12 – Produção de matéria fresca da raiz de plântulas de *Piper hispidinervium* “in vitro”, em função da dose de N total no meio MS, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

Por outro lado, para o desdobramento das doses de P dentro do fator N (Tabela 3A), observam-se efeitos lineares significativos nas doses 263,2mg.L⁻¹ e 551,6mg.L⁻¹ de nitrogênio, a significância de 5% de probabilidade, quando se reduz a dosagem de nitrato de amônio, e quadráticos significativos nas doses 407,4mg.L⁻¹ e 840mg.L⁻¹ de nitrogênio, ao nível de 1% de probabilidade, ao elevar-se a dosagem de nitrato de amônio. De acordo com a Figura 13, estes efeitos ocasionaram uma maior produção de matéria fresca da raiz na concentração de 31% de N, interagindo com a concentração de 50% de P.

FIGURA 1

As
do fator P
4A), para
determinaç
(340mg.L⁻¹
utilizando
somente pa

3.6.3 Mat

Na
variável m
variações e
cultivo “in
interação N

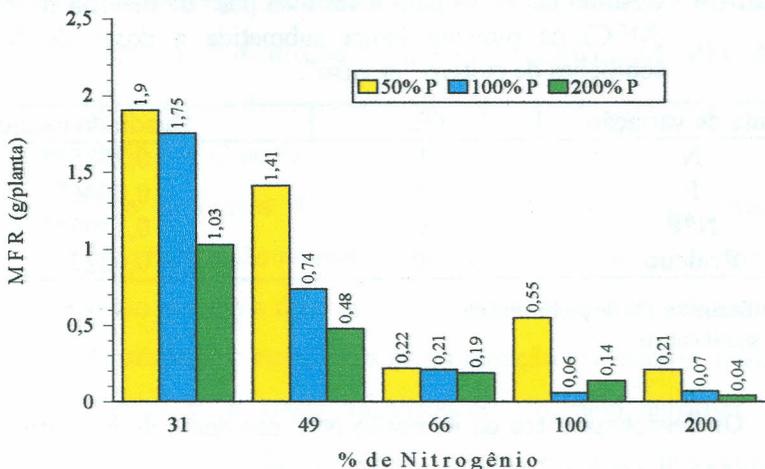


FIGURA 13 – Produção de matéria fresca da raiz de plântulas de *Piper hispidinervium* “in vitro”, em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

As regressões polinomiais obtidas para os níveis de N dentro dos níveis do fator P (Tabela 2A) e dos níveis de P dentro dos níveis do fator N (Tabela 4A), para MFR apresentaram, de um modo geral, os coeficientes de determinação (R^2) altos, com exceção dos obtidos para N (170mg.L⁻¹ de P) e N (340mg.L⁻¹ de P). Este fato poderá ser explicado pelo fator tratamento, utilizando somente três doses de P e cinco de N, embora a regressão seja válida somente para as doses aplicadas.

3.6.3 Matéria fresca do caule

Na Tabela 8, são apresentados os resultados da análise estatística da variável matéria fresca do caule (MFC) da pimenta longa, submetida às variações e combinações de doses de nitrogênio e fósforo, em condições de cultivo “in vitro”. Observam-se efeitos significativos para o nitrogênio e para a interação N*P, ($Pr < 0,01$).

TABELA 8 - Resumo da anava para a variável peso da matéria fresca do caule (MFC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo "in vitro".

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
N	4	0,2085**
P	2	0,0646 ^{ns}
N*P	8	0,1595**
Resíduo	30	0,0223

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

Os desdobramentos da interação N*P das doses de N dentro do fator P (Tabela 5A) mostraram um efeito linear significativo nas doses de 85mg.L⁻¹ e 340 mg.L⁻¹ de P (Pr<0,01), mostrados na Figura 14, enquanto que para o desdobramento nas doses de P dentro do fator N (Tabela 7A), observaram-se efeitos lineares significativos nas doses 551,60mg.L⁻¹, 840mg.L⁻¹ e 1416,80mg.L⁻¹ de N e quadrático significativo na dose 407,40mg.L⁻¹ de N (Pr<0,01).

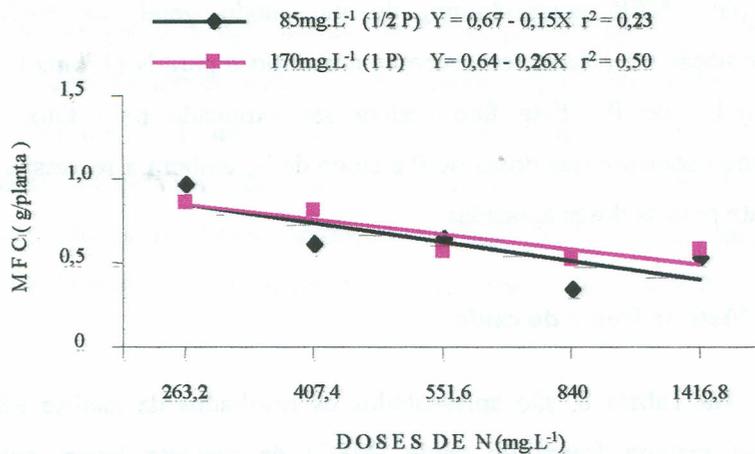


FIGURA 14 - Produção de matéria fresca do caule de plântulas de *Piper hispidinervium* "in vitro", em função da dose de N total no meio MS, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

Nas
(Tabela 6A)
modo geral,
obtidos para
Obser
ocasionaram
31 e 49% de
MS. Na redu
caule concen
resultados são
pedra é uma
econômica de

FIGURA 15 -

MFC (g/planta)

Nas regressões polinomiais obtidas nas doses de N dentro do fator P (Tabela 6A) e das doses de P dentro do fator N (Tabela 8A), para MFC de um modo geral, os coeficientes de determinação (R^2) foram altos, com exceção dos obtidos para N ($\frac{1}{2}$ de P) e N (2 de P).

Observando-se a Figura 15, os efeitos das doses de nitrogênio ocasionaram uma maior produção de matéria fresca do caule na concentração de 31 e 49% de nitrogênio quando a dose de fósforo é a normal do meio básico de MS. Na redução do fósforo a melhor taxa de produção de matéria fresca do caule concentra-se entre 49 a 100% do nitrogênio do meio nutritivo. Estes resultados são confirmados por Becker (1997), quando esclarece que o quebra-pedra é uma espécie responsiva a adubação nitrogenada para a produção econômica de alcalóides.

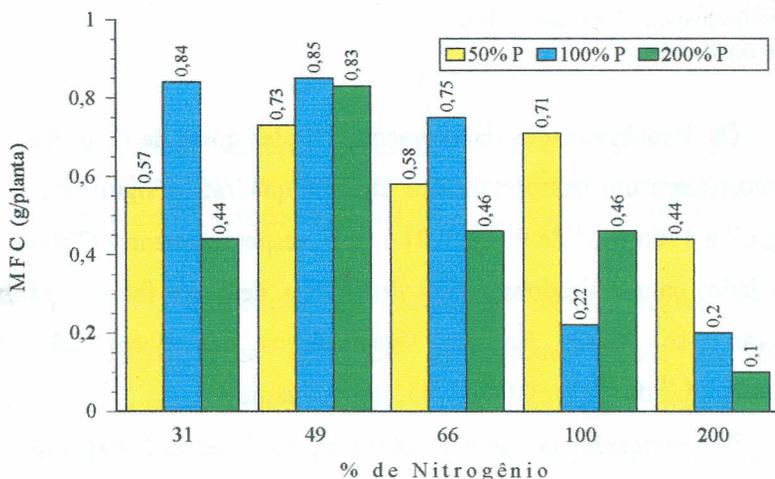


FIGURA 15 – Produção de matéria fresca do caule de plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. “in vitro”, em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

3.6.4 Matéria fresca da folha

O resumo da análise estatística da variável matéria fresca da folha (MFF) da pimenta longa submetida às variações e combinações de doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro” é mostrado na Tabela 9. Observam-se efeitos significativos para N, P ($Pr < 0,01$) e para a interação N*P ($Pr < 0,05$).

TABELA 9 - Resumo da anava para a variável peso da matéria fresca da folha (MFF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
N	4	0,1565**
P	2	0,1403**
N*P	8	0,0576*
Resíduo	30	0,0237

* significativo a 5% de probabilidade.

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

Os desdobramentos da interação N*P das doses de N no fator P (Tabela 9A) mostraram um comportamento linear e quadrático significativo nas doses 85mg.L^{-1} e 170mg.L^{-1} de P ($Pr < 0,01$ e $0,05$, respectivamente) (Tabela 10A). Por outro lado, para o desdobramento dos níveis de P no fator N (Tabela 11A), observaram-se efeitos lineares significativos nas doses $263,20\text{mg.L}^{-1}$ e $1416,80\text{mg.L}^{-1}$ de N ($Pr < 0,01$ e $0,05$, respectivamente).

Nas regressões polinomiais obtidas para doses de N nas doses do fator P (Tabela 10A) e das doses de P nas doses do fator N (Tabela 12A), para MFF, de um modo geral, os coeficientes de determinação (R^2) foram altos, com exceção dos obtidos para N (85mg.L^{-1} de P) e N (340mg.L^{-1} de P). A Figura 16 representa o comportamento quadrático do fator N nas doses de fósforo, nas quais observou-se que a melhor relação nitrato/amônio para a produção de

matéria fresca da folha é aquela em que o nitrogênio amoniacal está ausente. Isto significa que esta espécie tem preferência pela assimilação do nitrogênio na forma de nitrato. O maior acúmulo de biomassa em *Datura stramonium* L. (Solanaceae) tratada com NH_4NO_3 também foi relatado por Demeyar e Dejaegere (1992).

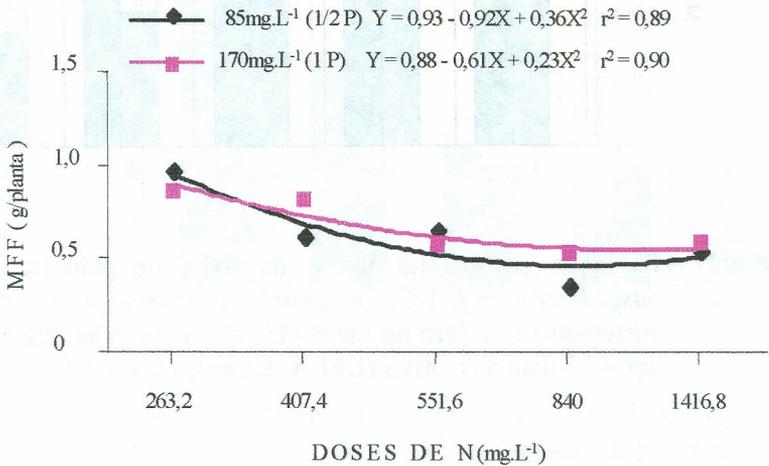


FIGURA 16 – Produção de matéria fresca da folha de plântulas de *Piper hispidinervium* “in vitro”, em função da dose de N total no meio MS, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

Pela Figura 17, a redução do fósforo no meio nutritivo de MS proporciona um aumento na produção de matéria fresca da folha, independentemente da redução ou adição nas doses de nitrogênio, havendo uma tendência de queda, à medida que as doses de nitrogênio aumenta. Nannetti (1994) também obteve taxas de crescimento relativo boas, no cultivo “in vitro” de *Heliconia* sp. (Musaceae), mesmo com a redução do nitrogênio total do meio nutritivo.

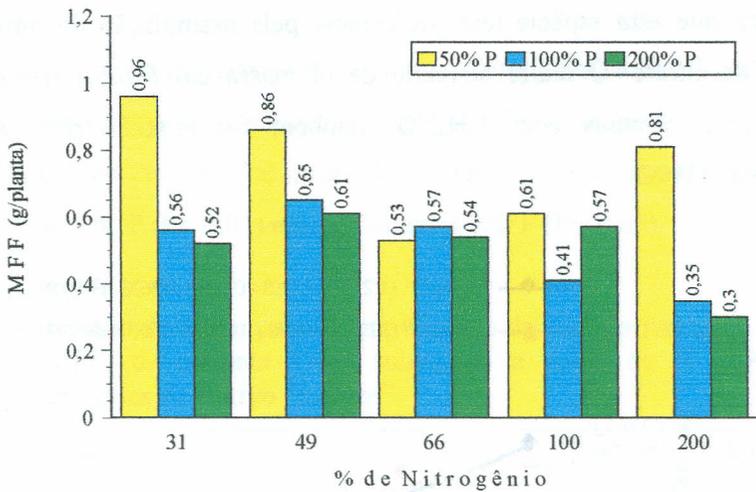


FIGURA 17 – Produção de matéria fresca da folha de plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. “in vitro”, em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

3.6.5 Matéria seca total

As análises geral dos resultados mostraram que, o aumento das doses de N e de P no meio de cultura de MS, resultaram em efeitos depressivos no crescimento da pimenta longa, cultivada “in vitro” durante 75 dias. Vários autores tem demonstrado que a nutrição mineral das plantas é mais influenciada pelas limitações de N e de P. Crescentes doses de nitrogênio influenciaram negativamente na produção da matéria seca total de pimenta longa, dados que são nitidamente observados na Figura 18, resultados que contrasta com os obtidos por Becker (1997) e Lima Filho (1995) citados por Abreu (1998), no cultivo “in vitro” de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) e *Stevia rebaudiana* Hensl. (Asteraceae), respectivamente. Estes autores verificaram que o aumento

crescente nas doses de nitrogênio proporcionou maior ganho de peso na matéria seca das espécies estudadas.

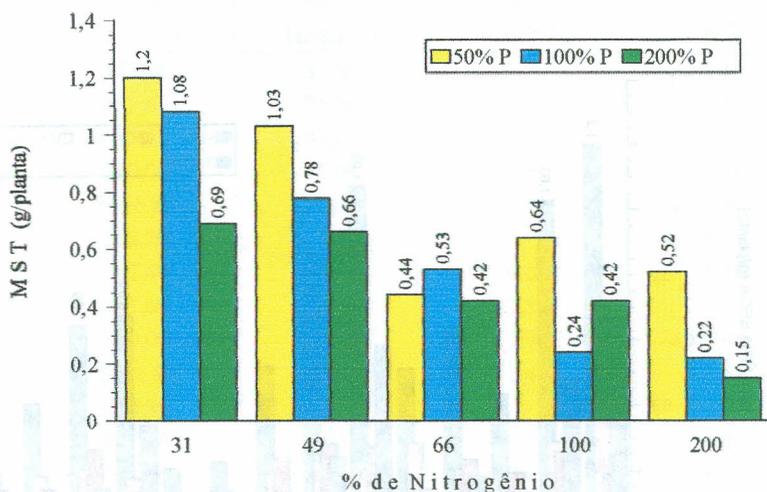


FIGURA 18 – Produção de matéria seca total de plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. "in vitro", em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

O peso da matéria seca da raiz, caule, folha e total de plântulas de pimenta longa cultivadas "in vitro" respondem positivamente, para as doses reduzidas de nitrogênio total do meio nutritivo de MS, mesmo na redução ou adição da fonte de fósforo (KH_2PO_4), conforme observado na Figura 19. É importante salientar que a pimenta longa responde melhor às maiores relações $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, o que significa existir uma interação equilibrada na razão N/P inversamente proporcional (Tabela 10). As plantas podem absorver N sob a forma de NO_3^- ou NH_4^+ . O NO_3^- é a forma preferida, mas ambas têm vantagens e desvantagens características, dependendo das condições de solo e clima, e das espécies de plantas consideradas. Contudo, quando absorvem como NH_4^+ , todo o

N é formado em aminoácidos nas raízes antes de ser translocado, enquanto que a forma de NO_3^- pode ser transportada para as partes de cima da planta como tal, dependendo do potencial de redução de NO_3^- nas raízes (Demeyer e Dejaegere, 1992).

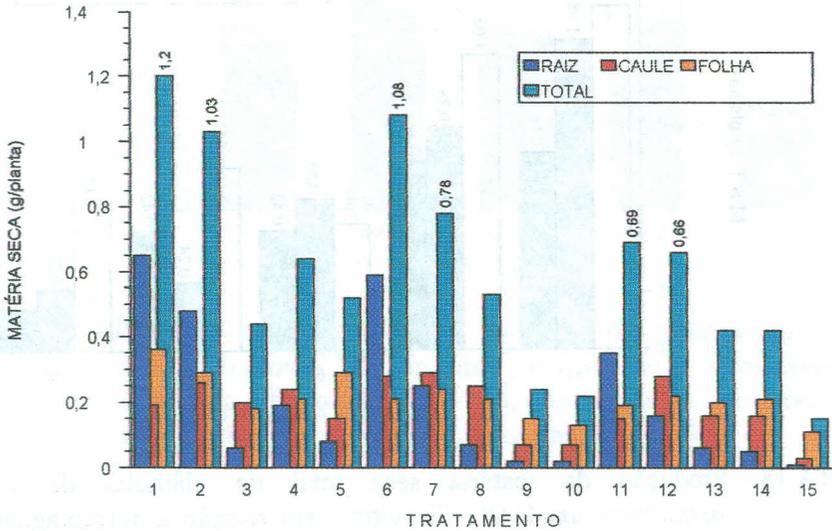


FIGURA 19 – Peso da matéria seca da raiz, caule, folha e total, avaliados após 75 dias através da variação das doses de nitrogênio e de fósforo fornecidos ao meio nutritivo de MS (UFLA, Lavras, MG, 1999).

TABELA 10 - Médias avaliadas quanto ao peso da matéria seca da raiz, caule e folha nos tratamentos, através da variação das doses de nitrogênio e de fósforo fornecidos ao meio nutritivo de MS (UFLA, Lavras, MG, 1999).

Tratamento	Total de N (mg.L ⁻¹)	Total de P (mg.L ⁻¹)	Relação NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	Relação N/P
01	263,20	85,00	-	3,10
02	407,40	85,00	4,65	4,80
03	551,60	85,00	2,82	6,49
04	840,00	85,00	1,91	9,88
05	1416,80	85,00	1,46	16,67
06	263,20	170,00	-	1,55
07	407,40	170,00	4,65	2,40
08	551,60	170,00	2,82	3,24
09	840,00	170,00	1,91	4,94
10	1416,80	170,00	1,46	8,33
11	263,20	340,00	-	0,77
12	407,40	340,00	4,65	1,20
13	551,60	340,00	2,82	1,62
14	840,00	340,00	1,91	2,47
15	1416,80	340,00	1,46	4,17

Tratamento	MATÉRIA SECA (g)			
	RAIZ	CAULE	FOLHA	TOTAL
01	0,65	0,19	0,36	1,20
02	0,48	0,26	0,29	1,03
03	0,06	0,20	0,18	0,44
04	0,19	0,24	0,21	0,64
05	0,08	0,15	0,29	0,52
06	0,59	0,28	0,21	1,08
07	0,25	0,29	0,24	0,78
08	0,07	0,25	0,21	0,53
09	0,02	0,07	0,15	0,24
10	0,02	0,07	0,13	0,22
11	0,35	0,15	0,19	0,69
12	0,16	0,28	0,22	0,66
13	0,06	0,16	0,20	0,42
14	0,05	0,16	0,21	0,42
15	0,01	0,03	0,11	0,15

3.6.6 Matéria seca da raiz

Os resultados da análise estatística da variável matéria seca da raiz (MSR) da pimenta longa submetida às variações e combinações de doses de nitrogênio e fósforo, em condições de cultivo “in vitro” são mostrados na Tabela 11, na qual observam-se efeitos significativos para N, P e para a interação N*P ($Pr < 0,01$).

TABELA 11 - Resumo da anava para a variável peso da matéria seca da raiz (MSR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
N	4	0,0813**
P	2	0,0359**
N*P	8	0,0434**
Resíduo	30	0,0064

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

A produção de matéria seca da raiz (Figura 20) foi afetada pelas crescentes doses de nitrogênio, independente do aumento ou diminuição nas doses de fósforo. Resultados similares também foram obtidos por Brasil e Viégas (1997) na avaliação da biomassa em pimenta longa, quando verificaram efeitos significativos para N e K; para a interação N-P-K, a elevação otimizou a resposta da planta ao N, apesar de não ter efeito significativo de P na produção da matéria seca.

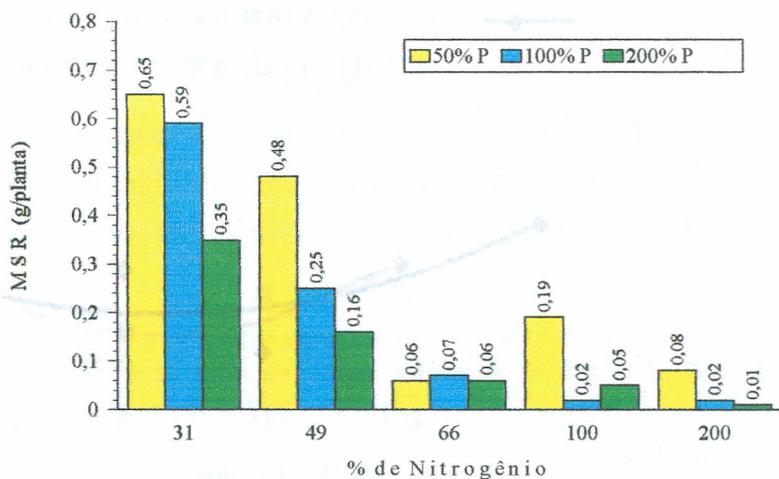


FIGURA 20 – Produção de matéria seca da raiz de plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. “in vitro”, em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

Os desdobramentos da interação N*P das doses de N no fator P mostraram um efeito quadrático significativo nas doses 85mg.L^{-1} e 170mg.L^{-1} de P ($\text{Pr}<0,05$ e $0,01$) (Figura 13A). Por outro lado, para o desdobramento das doses de P no fator N (Tabela 15A), observa-se efeito linear significativo nas doses $263,20\text{mg.L}^{-1}$ e $407,40\text{mg.L}^{-1}$ de N ($\text{Pr}<0,05$) e quadrático significativo nas doses $263,20\text{mg.L}^{-1}$ e 840mg.L^{-1} de N ($\text{Pr}<0,01$ e $0,05$), respectivamente.

Nas regressões polinomiais obtidas para doses de N nas doses do fator P (Tabela 14A), são representados na Figura 21, e das doses de P no fator N (Tabela 16A) para MSR, de um modo geral, os coeficientes de determinação (R^2) foram altos, com exceção do obtido para N (85mg.L^{-1} de P). O comportamento quadrático das curvas mostra que para as doses normais de N e P do meio nutritivo, resulta numa baixa produção de matéria seca da raiz.

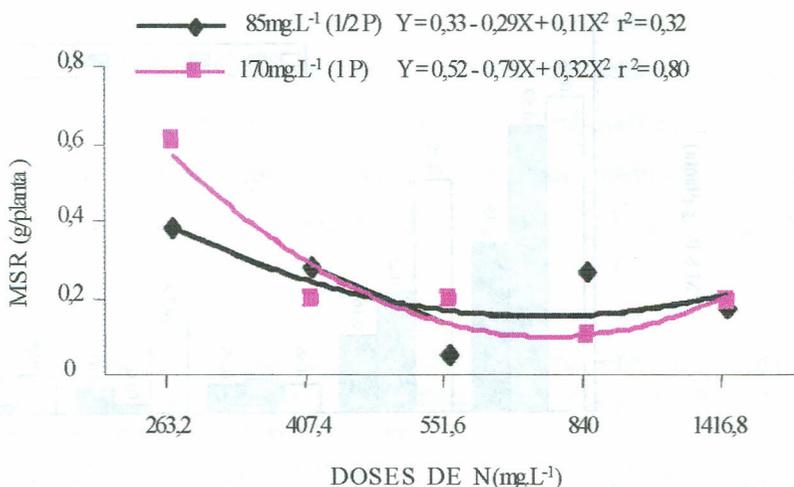


FIGURA 21 – Produção de matéria seca da raiz de plântulas de *Piper hispidinervium* “in vitro”, em função da dose de N total no meio MS, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

3.6.7 Matéria seca do caule

Os resultados da análise estatística da variável matéria seca do caule (MSC) da pimenta longa submetida às variações e combinações de doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”, são mostrados na Tabela 12. Observam-se efeitos não significativos para N, P e para a interação N*P.

TABELA 12 - Resumo da anava para a variável peso da matéria seca do caule (MSC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
N	4	0,0042 ^{ns}
P	2	0,0059 ^{ns}
N*P	8	0,0078 ^{ns}
Resíduo	30	0,0048

^{ns} não significativo.

3.6.8 Matéria seca da folha

Os resultados da análise estatística da variável matéria seca da folha (MSF) da pimenta longa submetida às variações e combinações de doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”, são apresentados na Tabela 13. Observam-se efeitos significativos para o P e para a interação N*P ($Pr < 0,05$).

TABELA 13 - Resumo da anava para a variável peso da matéria seca da folha (MSF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
N	4	0,0067 ^{ns}
P	2	0,0170*
N*P	8	0,0113*
Resíduo	30	0,0044

* significativo a 5% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

Os desdobramentos da interação N*P das doses de P no fator N (Tabela 18A), mostraram um efeito quadrático significativo na dose 840mg.L^{-1} de N ($Pr < 0,05$) e linear significativo nas doses $263,20\text{mg.L}^{-1}$ e $407,40\text{mg.L}^{-1}$ de N, enquanto que as doses de N nas doses de P não apresentaram significâncias (Figura 17A). A maior relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ condicionou uma maior produção de matéria seca da folha (Figura 22), justificada pela menor taxa do nitrogênio amoniacal. A combinação das diferentes formas inorgânicas pode estimular o crescimento de muitas espécies “in vitro”, de modo que a toxidez do amônio não é absoluta, relatam Caldas, Haridasan e Ferreira (1990).

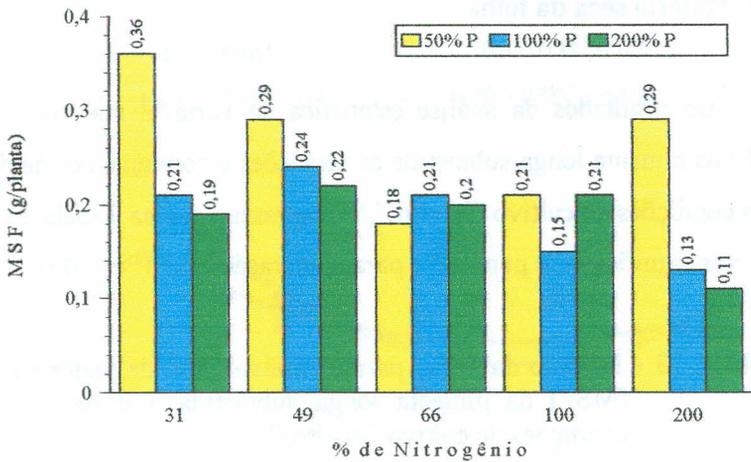


FIGURA 22 – Produção de matéria seca da folha de plântulas de *Piper hispidinervium* C.DC. “in vitro”, em relação a porcentagem de nitrogênio e fósforo no meio MS, observando as interações N*P, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

Nas regressões polinomiais obtidas para as doses de P nas doses do fator N para matéria seca da folha são apresentadas na Tabela 19A que, de um modo geral, registra que os coeficientes de determinação (R^2) foram altos.

O comportamento linear da equação (Figura 23) indica que em doses crescentes de fósforo a normal do meio nutritivo de MS afeta a produção de matéria seca da folha em plântulas de pimenta longa cultivadas “in vitro”, enquanto que, segundo o comportamento quadrático, as doses normais de nitrogênio (840mg.L^{-1}) e fósforo (170mg.L^{-1}) afetam na produção. Os resultados obtidos indicam que a interação de nitrogênio e fósforo é importante para a produção de biomassa, havendo a necessidade de reduzir a concentração de NH_4NO_3 do meio básico de MS. Este resultado é confirmado em várias espécies ornamentais, tais como *Heliconia* sp. (Nannetti, Sato e Pinto, 1994, citados por Sato, 1994).

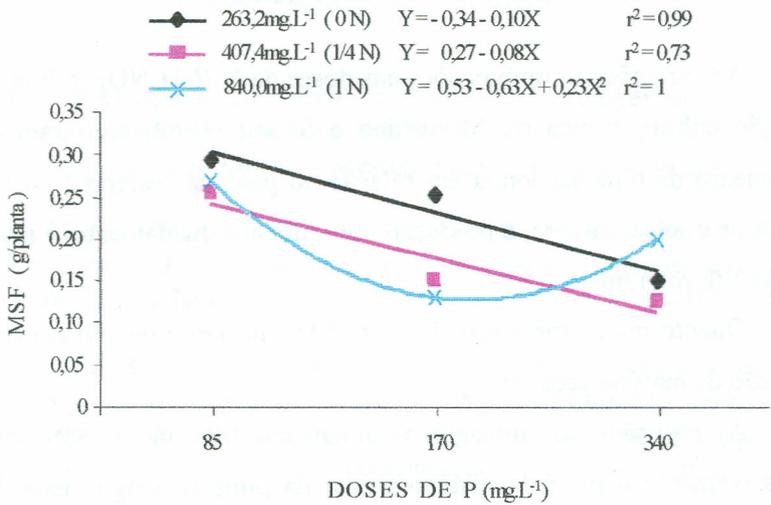


FIGURA 23 – Produção de matéria seca da folha de plântulas de *Piper hispidinerviium* “in vitro”, em função da dose de P total no meio MS, após 75 dias de cultivo (UFLA, Lavras, MG, 1999).

3.7 CONCLUSÕES

As variações e combinações nas doses de N (NH_4NO_3) e P (KH_2PO_4) do meio de cultura básico de Murashige e Skoog (1962) causaram efeitos no crescimento da pimenta longa em relação ao peso da matéria fresca e seca da raiz, caule e folha, ou seja, a produção diminuiu acentuadamente; à medida que a relação N/P foi aumentando.

Quanto maior for a relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ há um aumento considerável na produção de matéria seca total.

A redução do nitrogênio amoniacal do meio MS não afetou expressivamente o peso da matéria fresca da pimenta longa, após 75 dias de cultivo, quando associado à dosagem normal e duplicada de fósforo.

A suspensão do nitrogênio amoniacal do meio MS, mantendo-se apenas o nitrato, proporcionou um maior crescimento em peso fresco e seco de plântulas de pimenta longa, após 75 dias de cultivo "in vitro".

A equação quadrática foi a que melhor explicou os efeitos isolados nas interação N*P.

3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.N. Propagação in “vivo” e “in vitro”, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem de *Cissus sicyoides*. Lavras: UFLA, 1998. 113p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- ADAMOVIĆ, D. S.; GORUNOVIĆ, M.; PEKIĆ, B.; et al. Accumulation of active substance and biogenous elements in medicinal plants (*Glaucium flavum* Crantz). *Acta Horticulturae*, Wageningen, n.306, p.194-199, 1992.
- BECKER, L. Propagação vegetativa “in vivo” de *Phyllanthus corcovadensis* Muell. Arg. e “in vitro”, indução de calos, nutrição, extração e quantificação de alcalóides na espécie *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra). Lavras: UFLA1997. 96p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- BOCSA, I.; MATHE, P.; HANGIEL, L. The effect of high nitrous level and of position and age of leaves on the tetrahyrcannabinol content of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Bulletin of the University of Agricultural Sciences*, Godollo, n.1995/96, p. 91-96, 1996.
- BRASIL, E.C.; VIÉGAS, I. de J.M. Efeito da adubação NPK na produção de matéria seca de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 26, 1997, Rio de Janeiro. Anais...Rio de Janeiro: SBCS, 1997. 1 CD-ROM.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas de aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p.37-63.
- CARNEIRO, I.F. Adequação de técnicas de cultura “in vitro” na obtenção de mudas de bananeira (*Musa AAB*) cultivar maçã. Goiânia: UFG, 1997. 106p. (Tese – Doutorado em Agronomia)
- CLARKSON, D.T.; GOJON, A.; SAKER, L.R.; et al. Nitrate and ammonium influxes in soybean (*Glycine max*) roots: direct comparison of ¹³N and ¹⁵N tracing. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v.19, p.859-868, 1996.
- DEMEYER, K.; DEJAEGERE, R. Effect of the nitrogen form used in the growth medium (NO₃⁻, NH₄⁺) on alkaloid production in *Datura stramonium* L. *Plant and Soil*, Netherlands, n.147, p.79-86, 1992.

- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture- Handbook and directory of comercial laboratories.** Eversley: Exegetics, 1984. 593p.
- GREWAL, S.; AHUJA, A ; ATAL, C.K. In vitro proliferation of shoot spices of *Eucalyptus citriodora* Hook. **Indian Journal Biology**, New Delhi, v.18, p.775-777, 1980.
- GUATHERET, R.J. **Manual thecnique de culture des tissus vigetaux.** Paris: Masson Cie, 1942. 334p.
- KATO, A.K. **Teor e distribuição de N,P,K,Ca E Mg em pimenteiras-do-reino (*Piper nigrum* L.).** Piracicaba: ESALQ, 1978. 75p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)
- KHARWARA, M.P.C.; AWASTHI, O.P.; SINGI, C.M. Effect of nitrogen, phosphorus and time of nitrogen application on yield and quality of opium poppy (*Papaver somniferum* L.). **Indian Journal Agronomy**, New Delhi, v.31, n.1, p.26-28, 1986.
- LAMEIRA, O.A. **Propagação “in vitro” e “in vivo”, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.).** Lavras: UFLA, 1997. 87p. (Tese – Doutorado em Fitotecnia)
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** 2.ed. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319p.
- MARCHAL, J.; TEISSON, C.; ESCALANT, J.V.; et al. Echange d'elements minéraux et carbonés en culture in vitro: cas du bananier. **Fruits**, Paris, v.43, n.9, p.485-490, 1988.
- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; et al. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 1995. 220p.
- MIRANDA, A.M.P. de. **Concentração de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação “in vitro” da samambaia espada (*Nephrolepis exaltata* L. Schott).** Lavras: UFLA, 1997. 42p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)

- MONTANARI Jr., I.; FIGUEIRA, G.M.; MAGALHÃES, P. M. de; et al. Influência da fertilização NPK na biomassa e no teor de alcalóides de *Atropa belladonna* Linn. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.5, n.1, p.71, 1993.
- MURASHIGE, T. Manipulation of organ initiation in plant tissue culture. **Botany Bulletin**. London, Academia Sinica, v.18, p.1-24, 1977.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NAMBIAR, E.P.; NAIR, T.; MONEY, N.S. Preliminary studies on the incidence of wilt disease of papper and its relationship to nitrogen and base statu of the soil. **Indian Journal of Agricultural Science**, New Delhi, v.35, p.276-281, 1965.
- NANNETTI, D.C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação e manutanção de *Heliconia* sp.** Lavras: ESAL, 1994. 106p. (Dissertação - Mestrado em Fitotecnia)
- OLIVEIRA, F. de; AKISSUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. Rio de Janeiro, Atheneu, 1991. 412p.
- PRASZNA, L.; BERNÁTH, J. Correlations between the limited level of nutrition and essential oil production of peppermint. **Acta Horticulturae**, Weeningan, n.344, p.278-289, 1993.
- SATO, A.Y. **Propagação de gérbera de vaso através da cultura de tecidos**. Lavras: ESAL, 1994. 95p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)
- SILBERSTEIN, O.; WITTER, S.H. Foliar application of phosphatic nutrients to vegetable crops. **Procending American Society Horticultural Science**, Mount, VA, v.58, p.179-190, 1951.
- TEXEIRA, P.G.; CARVALHO, M.A.M. de; ZAIDAN, I.B.P.; et al. Effect of mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, São Carlos, v.9, n.2, p.89-96, 1997.

- VEIGA, R. D. **Uso do sanest na análise estatística de experimentos. I PROGRAMA DE VERÃO.** UFLA. Lavras, 1997. 99p. (Adaptação e Editoração)
- WHITE, P.R. **A handbook of tissue culture.** New York: Ronald Press, 1943. 524p.
- YOGARATNAN, N.; ALLEN, M.; GREENHAM, D.W.P. The phosphorus concentration in apple leaves as affected by foliar application of its compounds. **Journal of the Horticultural Science**, London, v.56, p.255-260, 1981.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A.; SILVEIRA JÚNIOR, P. **Sistemas de análise estatística para microcomputadores (SANEST).** Pelotas: UFPEL, 1984. 115p.

CAPÍTULO 4

ESTUDOS COMPARATIVOS ANATÔMICOS DE PLANTAS DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* C.DC.) EM DIFERENTES DOSES DE NITROGÊNIO E FÓSFORO "IN VITRO"

RESUMO

SANTIAGO, E.J.A. de; Estudos comparativos anatômicos de plantas de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) em diferentes doses de N e P “in vitro”. Lavras: UFLA, 1999. 118p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia, área Fitotecnia)

Características anatômicas das folhas, caule e raízes de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C.DC.) cultivadas “in vitro” e submetidas a diferentes concentrações nas doses de nitrogênio e fósforo do meio básico de Murashige e Skoog (1962) foram descritas e ilustradas. O presente trabalho teve como objetivo a revelação de detalhes anatômicos nas estruturas superficiais adaxial e abaxial das folhas e os cortes histológicos de raiz e do caule nas plântulas “in vitro”, através da microscopia eletrônica de varredura. No limbo foliar, a epiderme é plurisseriada constituída de células retangulares e apresentando tricomas tectores pluricelulares concentrados na margem e na nervura intercostal. Na superfície adaxial observamos a presença de estruturas de secreção, idioblástos oleíferos. Os estômatos são anfiestomáticos pois estão localizados tanto na face abaxial como na adaxial. No caule observa-se a presença de epiderme uniestratificada com a presença de numerosos tricomas simples e glandulares, além da presença de células compostas de amido. Na raiz também foram encontradas células compostas de amido e a epiderme é simples. As variações de doses de nitrogênio e fósforo influenciaram no tamanho das células estomáticas, na composição das estruturas e superfícies epidérmicas e nas estruturas dos feixes vasculares variando as intensidades de células contendo grãos de amido.

Termos para indexação: Anatomia; epiderme adaxial e abaxial; *Piper hispidinervium* C.DC.; nutrição mineral; microscopia eletrônica de varredura.

Comitê Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Orientador), Janice Guedes de Carvalho – UFLA, Manuel Losada Gavilanes – UFLA e Evaristo Mauro de Castro – UFLA.

ABSTRACT

SANTIAGO, E.J.A. de. **Comparative anatomical studies of plants of long pepper (*Piper hispidinervium* C.DC.) submitted to different doses of N and P “in vitro”**. Lavras: UFLA, 1999. 118p. (Dissertation - Master's degree in Agronomy/Agriculture)

Anatomical characteristics of leaves, stem and roots of seedlings of long pepper (*Piper hispidinervium*), grown “in vitro” and submitted to different concentrations in the doses of nitrogen and phosphorus of Murashige and Skoog basic medium (1962) were reported and illustrated. The present work was designed to reveal the anatomical details in the adaxial and abaxial surface structures of the leaves and the histological sections of root and stem in the seedlings “in vitro”, through electronic scanning microscopy. In the leaf blade, the epidermis is pluriseriate made up of rectangular cells and presenting pluricellular tector trichomes concentrated at the edge and intercostal rib. On the adaxial surface, the presence of secreting structures, oil-possessing idioblasts, were observed. Stomates are amphistomatic, because they are situated both on the abaxial and adaxial face. In the stem, the presence of unistratified epidermis with the presence of numerous simple and glandular trichomes, besides the presence of starchy cells, is noticed. In the root, also were found starchy cells and the epidermis is simple. The variations of doses of nitrogen and phosphorus influenced the size of stomatic cells, the composition of the epidermic structures and surfaces and the structures of vascular bundles varying the intensity of cells containing starch grain.

Index terms: Anatomy; adaxial and abaxial epidermis; *Piper hispidinervium* C.DC.; mineral nutrition; electronic scanning microscopy.

Guidance Committee: José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA (Major Professor), Janice Guedes de Carvalho – UFLA, Manuel Losada Gavilanes – UFLA and Evaristo Mauro de Castro – UFLA.

4.3 INTRODUÇÃO

O nosso mundo sensorial é primordialmente um mundo visual. Pela visão, obtemos muito mais informações ao nosso redor que pelos demais sentidos. Face ao ponto de reconhecimento das potencialidades da microscopia eletrônica para diferentes áreas de conhecimentos, nenhuma outra ferramenta de pesquisa experimentou tão rápido avanço em toda história da ciência que os microscópios eletrônicos de transmissão (MET) e de varredura (MEV). Embora representem uma conquista espetacular, eles não substituem o microscópio óptico comum (MOC). Ao contrário, cada tipo de microscópio tem seus méritos e deméritos, dependendo do campo de aplicação.

O microscópio eletrônico de varredura oferece uma resolução muitas vezes maior que o microscópio óptico comum, porém menor que o microscópio eletrônico de transmissão. Todavia, como podemos observar espécimens inteiros, a preparação da amostra é muito mais simples que no caso do microscópio eletrônico de transmissão e proporciona profundidade de campo muito maior, o que possibilita a observação e registro da imagem tridimensional do material examinado.

Estudos utilizando microscopia eletrônica de varredura em superfícies foliares de espécies lenhosas do Cerrado e da Amazônia mostram especial atenção a alguns aspectos dos estômatos, esculturas da superfícies dos pêlos e das demais células epidérmicas.

Um número relativamente grande de trabalhos já abordou algumas características quantitativas de folhas, caule e raízes de plantas superiores, especialmente da epiderme foliar, abordando por exemplo, a frequência estomática. A comparação de várias características dessas estruturas deu-se por métodos recíprocos. Ainda que haja algumas relações entre elas, tais como a

relação entre a frequência de estômatos e a área das células epidérmicas, são desconhecidas para a espécie *Piper hispidinervium* C.DC (Piperaceae). Ainda não foram estudadas os efeitos do nitrogênio e fósforo nas estruturas internas dos órgãos vegetativos, em nutrição mineral “in vitro”.

A observação ao microscópio eletrônico de varredura poderá ser um método alternativo para fornecer uma indicação preliminar da composição nas estruturas dos órgãos vegetais, indicativos dos estudos nomenclaturais que permitem uma melhor delimitação das espécies vegetais.

No presente trabalho objetivou-se revelar os detalhes anatômicos nas estruturas superficiais adaxial e abaxial das folhas e os cortes histológicos de raízes e caules de plântulas de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) “in vitro” submetidas a diferentes doses de nitrogênio e fósforo, através da microscopia eletrônica de varredura.

4.4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.4.1 Estudos anatômicos

O estudo anatômico dos órgãos vegetativos da pimenta longa é muito pouco conhecido, principalmente de plântulas micropropagadas “in vitro”. Nascimento (1997) reporta aspectos da anatomia dos órgãos vegetativos da *Piper hispidinervium* e suas estruturas secretoras de plantas “in vivo”, objetivando caracterizar a morfologia externa e a estrutura organizacional analisando quantitativamente os apêndices epidérmicos.

O ambiente de cultivo condiciona as mudanças estruturais de transplantados durante o processo de aclimatização das espécies antes de serem

levadas ao ambiente de campo (Fidelis, 1998). Tomlinson (1969) mencionou que as células epidérmicas das Eriocaulaceae xerófitas apresentam paredes espessadas, além de possuírem hipoderme. Células epidérmicas com paredes espessadas, segundo Pyykkö (1966), estão relacionadas com ambientes secos. Em *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae), Scatena e Menezes (1996) demonstraram a existência de células epidérmicas espessadas com muitas pontuações e sua possível relação com o enrolamento das folhas, além da existência de câmaras subestomáticas multicompartilhadas na altura dos estômatos.

Araújo e Mendonça (1998) estudaram o escleromorfismo foliar de *Aldina heterophylla* Spruce ex Benth (Leguminosae: Papilionoideae) em três campinas da Amazônia Central e reportam, de maneira geral, que em todos os macroambientes a planta desenvolve estruturas escleromorfas. A epiderme da lâmina foliolar é glabra e hipoestomática; a cutícula é espessa, recobrando as paredes celulares periclinais externas e penetrando nas paredes anticlinais. A discussão deste trabalho considera que a cutícula espessa, células epidérmicas com paredes espessadas, estômatos em alta densidade protegidos por ceras, parênquima paliçádico e esclerenquima bem desenvolvidos, são características encontradas nessa espécie que poderiam ser entendidas, do ponto de vista ecológico, como uma adaptação às condições xéricas. Entretanto, nas campinas amazônicas a água não é o único fator limitante do crescimento vegetal, devendo-se levar em consideração outros fatores ambientais que influenciam a estrutura foliar, quais sejam, luz, temperatura, tipo de solo e nutrientes.

Uma das respostas de plantas que têm sido de grande interesse é a mudança na densidade de estômatos devido a elevação da pressão parcial de CO₂. Todavia, a densidade estomática é sujeita a variação em um número de níveis. Grandes diferenças são encontradas entre espécies e cultivares. Em uma planta individual, as folhas completamente expandidas exibem gradientes

ontogenéticos dentro do espaçamento de estômatos. A densidade de estômatos é também fortemente afetada pelas condições de crescimento: influências importantes incluem intensidade de luz (Gay e Hurd, 1975), disponibilidade de água, disponibilidade de nutrientes e nível de CO₂.

Em estudos sobre *Struthanthus vulgaris* Mart. (Loranthaceae), Venturelli (1984) reporta os aspectos anatômicos de raiz adventícia, caule e folha. As folhas apresentam simetria bilateral; os estômatos, do tipo paracítico, ocorrem em maior número na face abaxial. A epiderme que reveste a lâmina foliar é uni-estratificada e acha-se constituída por células irregulares de paredes espessadas. Os estômatos, do tipo paracítico, distribuem-se aleatoriamente em ambas as epidermes; a abaxial apresenta 211 estômatos por mm² e adaxial com aproximadamente 35 por mm².

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura

É relativamente recente o nosso conhecimento sobre a complexa organização das células, tendo sido obtido nos últimos 25 anos, em especial por meio da utilização do microscópio eletrônico, cujo poder de resolução permitiu-nos estudar a ultraestrutura ou morfologia submacroscópica da célula. A maior parte desses conhecimentos foi obtida através da observação de cortes muito finos (de 20 a 50nm de espessura) fixados e contrastados com “contrastantes eletrônicos”, tais como o tetraóxido de ósmio (De Robertis e De Robertis Jr., 1993).

O grau de resolução e a profundidade de campo proporcionados pela microscopia eletrônica de varredura permitem a revelação de detalhes morfológicos e anatômicos insuspeitados após observações através de outras técnicas, de tal sorte que ela hoje representa o método mais indicado para o

estudo da ultraestrutura de superfícies vegetais (Salatino, Montenegro e Salatino, 1986).

A microscopia eletrônica de varredura (scanning) utiliza os elétrons refletidos pela superfície do espécimen e produz uma imagem. Mesmo com imagens obtidas ao microscópio eletrônico de varredura, algumas vezes é difícil compreender-se precisamente alguns detalhes topográficos nos espécimens examinados. Em tais casos, a observação de imagens em estéreo (caracteristicamente tridimensional) pode facilitar o entendimento da estrutura em questão. Além disso, o exame de fotomicrografias em estéreo pode propiciar mais detalhes, mesmo de espécimens com estruturas mais simples. Um par de fotomicrografias pode ser obtido em estéreo da seguinte maneira: um campo de interesse é fotografado novamente com o espécimen inclinado de 5° a 15°, em relação à inclinação anterior. Observa-se essas duas fotos com o auxílio de um par de óculos para observação de imagens em condições estéreo (comum em aerofotogrametria e fotointerpretação), observando-se uma imagem tipicamente tridimensional (Santos, 1995).

Os estudos modernos da matéria viva demonstram que uma série de níveis de organização integrados resultam em manifestações vitais do organismo. Tanto no mundo inerte como no vivo, existem diversos níveis de complexidades, de maneira que “as leis ou regras que se encontram em um nível podem não aparecer em níveis inferiores” (De Robertis e De Robertis Jr., 1993).

4.5 MATERIAL E MÉTODOS

4.5.1 Local

O experimento foi conduzido em dois locais: o cultivo “in vitro” no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras, Estado de Minas Gerais e a análise de eletromicrografia de varredura no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Pesquisa Agroflorestral da Amazônia Oriental, EMBRAPA, no município de Belém, Estado do Pará, Brasil.

4.5.2 Tratamento

Sementes de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) foram utilizadas como fonte de explantes para o cultivo “in vitro”. As sementes foram desinfestadas em solução comercial de hipoclorito de sódio a 2% por 10 minutos, sob agitação e lavadas quatro vezes em água esterilizada e autoclavada. Para a germinação, foi utilizado o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) a meia força, sem suplementação de reguladores de crescimento. Foram inoculadas e mantidas em ambiente de sala de crescimento, nas seguintes condições microclimáticas: temperatura do ar de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 5\%$, fotoperíodo de 16h/8h (claro/escuro) sob $25 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de irradiância. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ utilizando-se NaOH ou HCl a 0,1N e solidificado com agar a 0,7%. O máximo de germinação ocorreu aos 12 dias após a inoculação, quando cerca de 90% das sementes apresentavam cerca de 0,5cm de protusão do sistema radicular.

A aplicação dos tratamentos mostrados no Quadro 2, foi iniciada 20 dias após a inoculação das sementes no meio de germinação, procedendo-se a repicagem das plântulas para tubos de ensaio medindo 25mm de diâmetro x 150mm de comprimento, contendo 10mL de meio de cultura de cada tratamento, em condições de câmara de fluxo laminar, marca VECO. Após a repicagem, as plântulas foram conduzidas para sala de crescimento, cujas condições de ambiente foram as mesmas usadas durante a germinação.

QUADRO 2 – Tratamentos com as variações e combinações das doses de nitrogênio e fósforo do meio nutritivo de MS (1962) (UFLA, Lavras, MG, 1999).

CONCENTRAÇÕES (mM)					
P (KH_2PO_4)	N (Total) ($\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$)				
	18,80	29,10	39,40	60,00	101,20
0,625	T01	T02	T03	T04	T05
1,250	T06	T07	T08	T09	T10
2,500	T11	T12	T13	T14	T15

Os tratamentos apresentaram concentrações variáveis do meio nutritivo de MS, o que proporcionou alterações no balanço dos íons nitrato e amônio e as diferentes relações de nitrogênio e fósforo (Tabela 14). A concentração de nitrogênio foi variada através da manipulação da solução estoque que contém $1650\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrato de amônio (NH_4NO_3), permanecendo invariável a solução estoque de $1900\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrato de potássio (KNO_3) do meio nutritivo de MS. Variou-se a concentração de fósforo pela adição de monofosfato ácido de potássio (KH_2PO_4) ao meio MS em três doses (Quadro 2).

TABELA 14 – Composição e relação nos tratamentos das doses de nitrogênio e de fósforo fornecidos ao meio MS (UFLA, Lavras, 1999).

Tratamento	Total de N (mg.L ⁻¹)	Total de P (mg.L ⁻¹)	Relação NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	Relação N/P
01	263,20	85,00	-	3,10
02	407,40	85,00	4,65	4,80
03	551,60	85,00	2,82	6,49
04	840,00	85,00	1,91	9,88
05	1416,80	85,00	1,46	16,67
06	263,20	170,00	-	1,55
07	407,40	170,00	4,65	2,40
08	551,60	170,00	2,82	3,24
09	840,00	170,00	1,91	4,94
10	1416,80	170,00	1,46	8,33
11	263,20	340,00	-	0,77
12	407,40	340,00	4,65	1,20
13	551,60	340,00	2,82	1,62
14	840,00	340,00	1,91	2,47
15	1416,80	340,00	1,46	4,17

4.5.3 Preparação dos espécimes para a microscopia eletrônica de varredura

Plântulas “in vitro” de pimenta longa foram previamente seccionadas, separando-se as folhas, caule e raízes. Todo o material foi lavado em solução-tampão de cacodilato de potássio a 0,05M e pH 6,8 (Postek et al., 1980, citado por Santos, 1995) e, posteriormente, colocado no fixador, gluteraldeído a 3%, deixado em repouso na geladeira durante 48 horas. Depois, retirou-se o gluteraldeído e lavando-se em solução-tampão cacodilato de potássio a 0,05M e pH 6,8. A desidratação foi realizada pela série alcoólica (álcool 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e álcool etílico absoluto) por 15 minutos em cada concentração. Os materiais foram secos ao ar e a sombra e retiradas as amostras para montagem e levadas à câmara de metalização por camadas finas de ouro. Todas as amostras

foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol JSM-5400 LV.

4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram descritas as observações anatômicas nas estruturas superficiais adaxial e abaxial das folhas e os cortes histológicos de raiz e do caule, nas plântulas “in vitro”, provocadas pelas variações e combinações de doses de nitrogênio (N) e fósforo (P) do meio nutritivo de MS.

4.6.1 Superfície abaxial

A redução na concentração de nitrogênio no meio básico proporcionou maiores células estomáticas, observadas principalmente, nos tratamentos (T1, T6 e T11) em que foi retirado o nitrato de amônio, como mostrados na Figura 24. Isso poderá ser melhor explicado pela estimulação fisiológica da plântula em consequência do suplemento de nitrogênio na forma de nitrato.

Em todos os tratamentos, observou-se a presença de estômatos, tricomas e idioblastos oleíferos, no entanto, os estômatos são mais abundantes. Estes resultados também foram observados por Nascimento (1997), afirmando que em pimenta longa os tricomas secretores concentram-se nas folhas, em ambas as faces e caule jovens e, são diretamente proporcionais aos idioblastos oleíferos, os quais ocorrem em todos os órgãos vegetativos, sendo o afloramento uma característica da superfície abaxial.

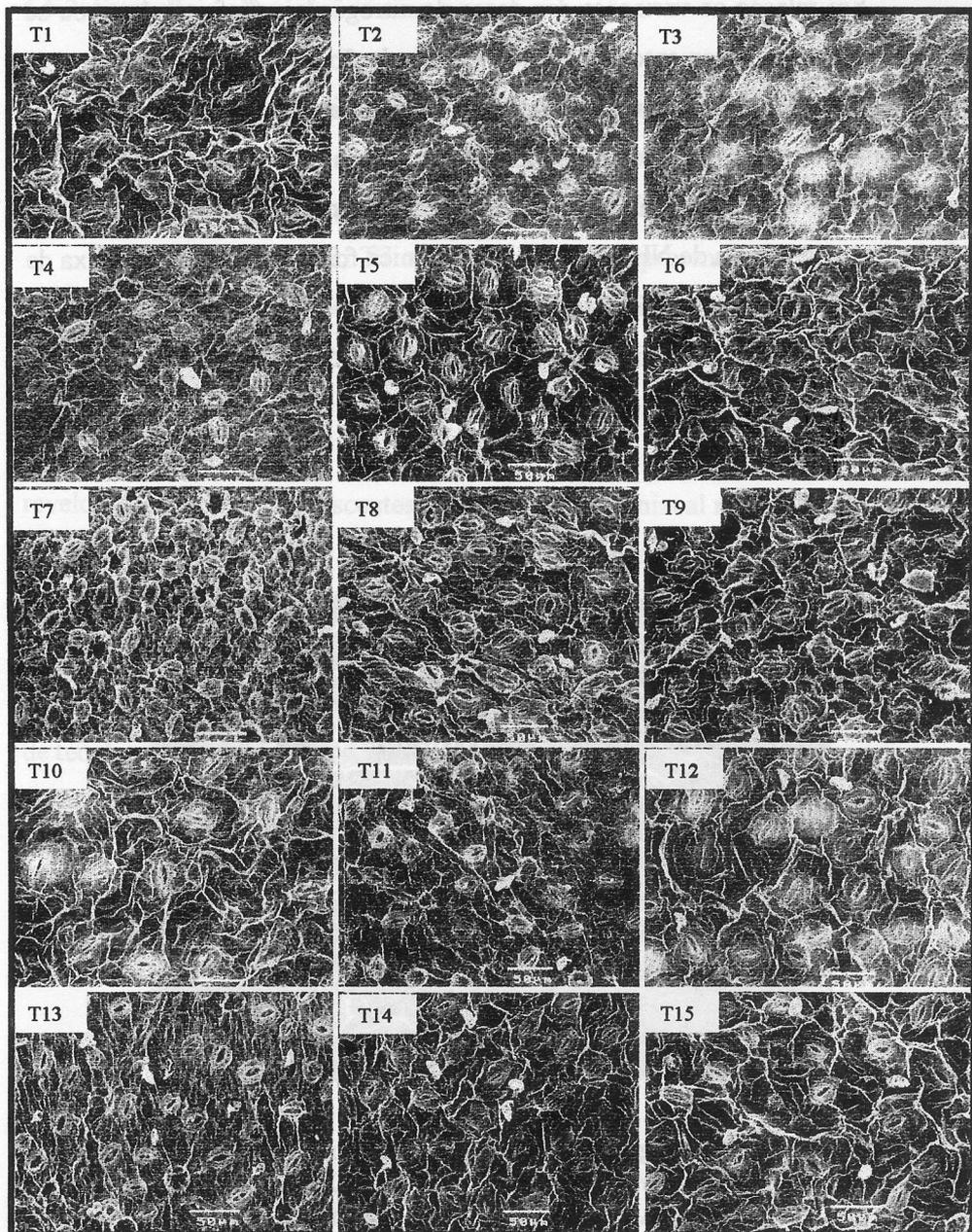


FIGURA 24. Eletromicrografias de varredura da face abaxial de folhas de *Piper hispidinervium* C.DC., nos tratamentos com as variações das doses de $N(NH_4NO_3)$ e $P(KH_2PO_4)$ do meio nutritivo MS (1962). (20kv; X350; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, 1998).

Em relação às variações das doses de nitrogênio e fósforo, observou-se que em todos os tratamentos, a medida que a relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ aumenta, sem levar em consideração a concentração de fósforo, há um fechamento estomático. Mas, quando a concentração de fósforo no meio de cultivo é normal (170mg.L^{-1}) e com a ausência do nitrogênio amoniacal, notam-se perfeitamente os estômatos fechados. A ausência de NH_4^+ torna o NO_3^- a única fonte de N, embora a taxa de absorções líquidas seja mais rápida, como reportam Colmer e Bloom (1998), comparando os fluxos líquidos de NH_4^+ e NO_3^- ao longo das raízes de arroz e milho.

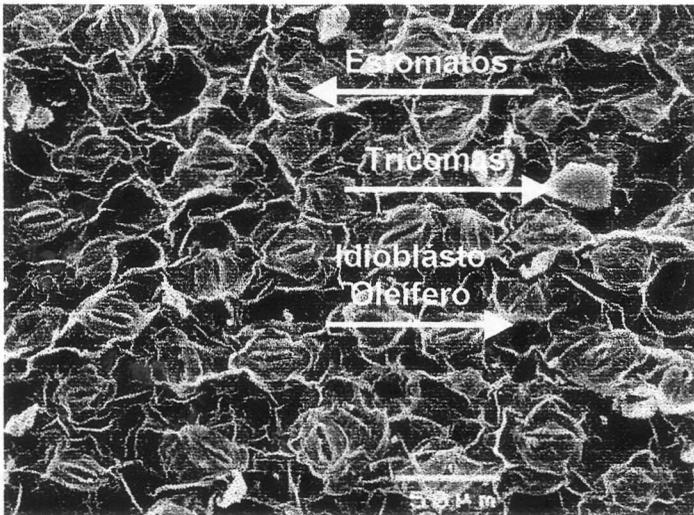


FIGURA 25 – Eletromicrografia de varredura da epiderme abaxial da *Piper hispidinervium* C.DC. (20kv; X3550; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, 1999).

4.6.2 Superfície adaxial

Na superfície adaxial também foram encontrados estômatos e tricomas, porém em menor quantidade que na superfície abaxial (Figura 26), daí caracterizando estas estruturas como sendo anfiestomática.

Os tratamentos (T2, T7 e T12, Figura 26) apresentaram alterações nas superfícies epidérmicas, o que deve-se ao fato da maior relação $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, pela redução a $\frac{1}{4}$ de N (NH_4NO_3), ou seja, a menor concentração de nitrato de amônio, quando interagido com redução e duplicação de fósforo ($\frac{1}{2}$ P=0,625mM e 2P=2,500mM) tanto na abaxial como na adaxial. A análise de estabilidade revelou que as doses decrescentes do nitrogênio amoniacal não influenciaram na atividade estomática, pois as respostas nessas doses foram mais estáveis. A Figura 27 mostra superfície epidérmica abaxial em que as concentrações no meio nutritivo de MS são normais. Mais uma vez, a disponibilidade do nitrogênio é bastante fundamental para o crescimento e morfogênese em cultura de tecidos, como cita (George e Sherrington, 1984).

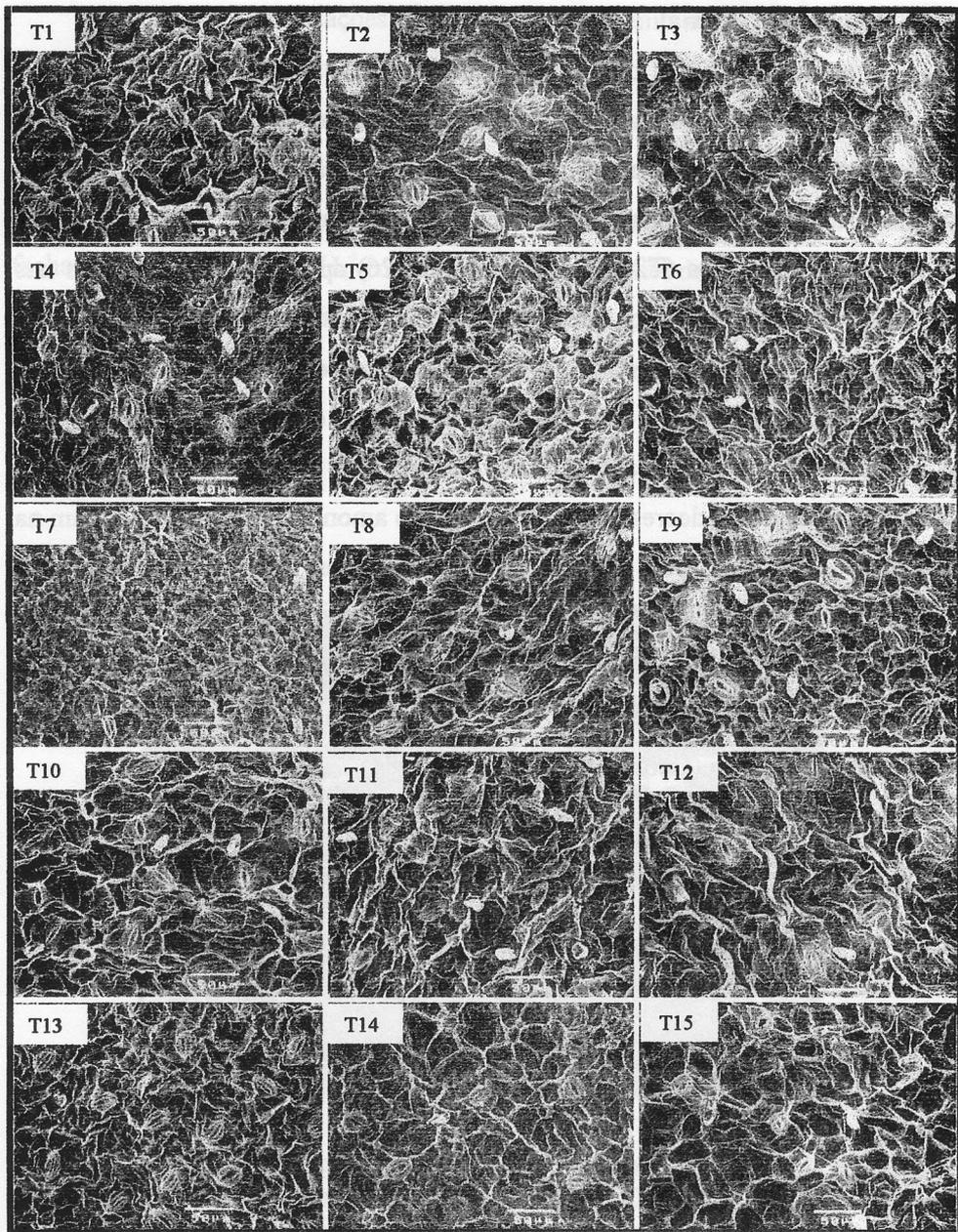


FIGURA 26. Eletromicrografias de varredura da face adaxial de folhas de *Piper hispidinervium* C.DC., nos tratamentos com as variações das doses de $N(NH_4NO_3)$ e $P(KH_2PO_4)$ do meio nutritivo MS (1962). (20kv; X350; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, 1998).

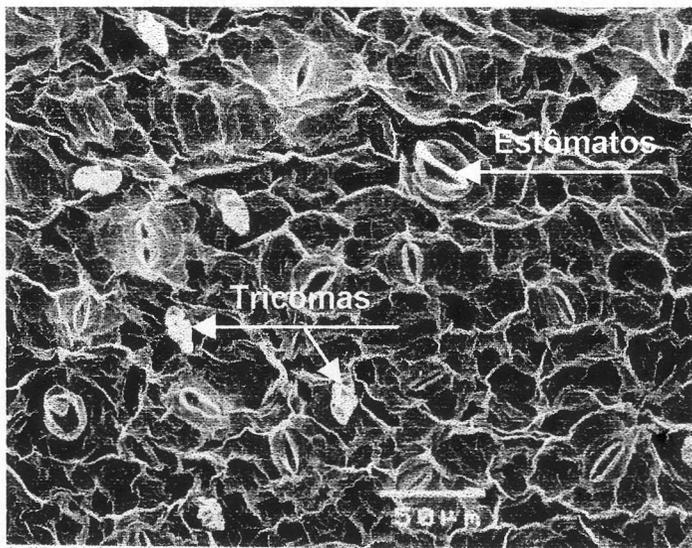


FIGURA 27 – Aspecto geral da epiderme adaxial da pimenta longa vista através de microscopia eletrônica de varredura (20kv; X3550; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, 1999).

4.6.3 Caule

Em todos os tratamentos, os cortes histológicos na região do caule apresentaram, nos feixes vasculares, estruturas esféricas bem características de células com amido, havendo diferenças quanto ao tamanho e número dessas células, de acordo com as variações nas doses de nitrogênio e fósforo do meio nutritivo de MS.

Na Figura 28A, tratamento 13, observa-se que quando duplica-se a dose de fósforo, reduzindo-se a de nitrogênio, há um aumento no tamanho das células que contêm amido, proporcionando menores espaços intercelulares. Enquanto que na Figura 28B, tratamento 04, há redução na dosagem de fósforo multiplicando-se a de nitrogênio, nota-se que as células são de menores volume apresentando maiores espaços intercelulares. Estes resultados explicam os

relatos de Abreu (1998) sobre a importância do fósforo no meio de cultura para o crescimento de células em suspensão e na produção de metabólitos secundários de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae).

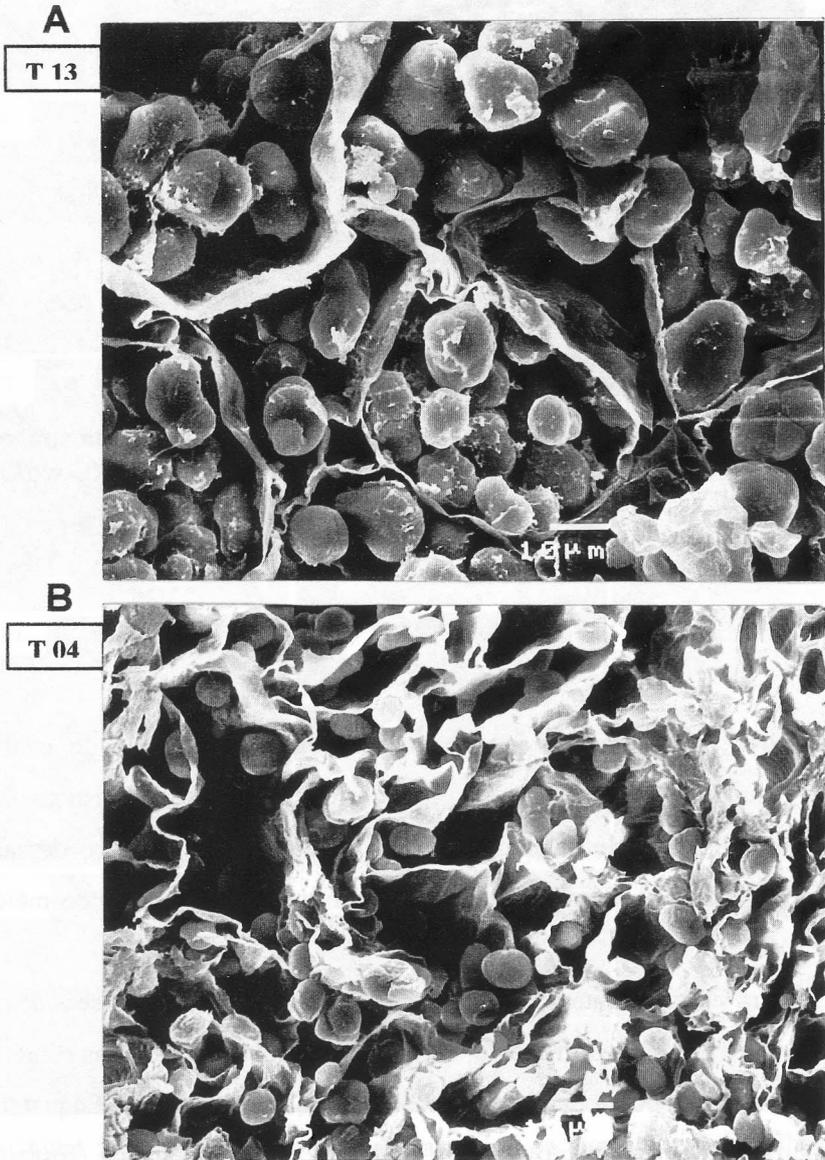


FIGURA 28 – Corte histológico do caule de *Piper hispidinervium* C. DC. através da microscopia de varredura. (20kv; X500; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, 1999).

4.6.4 Raiz

A Figura 29 representa o aspecto do corte histológico transversal, da raiz em estrutura secundária de pimenta longa após 75 dias de cultivo “in vitro” sob condições normais do meio nutritivo de MS, representadas no tratamento T09 (Quadro 2), ausente de reguladores de crescimento. A presença do câmbio vascular e da periderme originada no felogênio é resultado da adição de novas células, ocasionando um crescimento secundário que é característico das gimnospermas e das dicotiledôneas lenhosas.

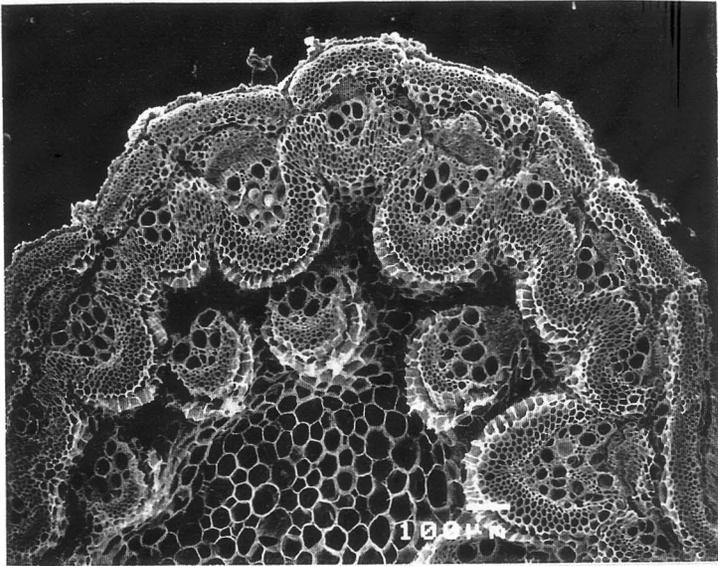


FIGURA 29 - Corte transversal da raiz da pimenta longa (20kv; X75; wd23; MEV; EMBRAPA/Oriental, Belém, 1999)

Na região vascular observa-se floema oposto ao xilema, sendo envolvido externamente pelo periciclo adjacente à endoderme, aspectos relatados também por Nascimento (1997).

Os aspectos anatômicos da raiz de *Piper hispidinervium* cultivada “in vitro” apresentam estruturas do parênquima vascular compostas de células com as mesmas características nas células encontradas no caule, a presença de grãos de amido, porém mais numerosos, o que podemos verificar nas Figuras 27 e 28. As diferenças histológicas entre os tecidos secundários dos caule e das raízes são determinadas, em grande parte, pelas diferenças das condições edafoclimáticas em que se desenvolvem as duas partes do corpo vegetal. Se as raízes de árvores de dicotiledôneas ou gimnospermas forem expostas à luz a ao ar, o lenho que se desenvolve após esta exposição adquire a maior parte das características do lenho do caule (Bannan, 1941; Morrison, 1953, citado por Esau, 1974)

A presença de células com amido não foi afetada pela variação nas doses de nitrogênio e fósforo, o que podemos observar no tratamento 12 (Figura 30) e no tratamento 1 (Figura 31). No entanto, a ausência do nitrogênio amoniacal proporcionou maior densidade dessas células.

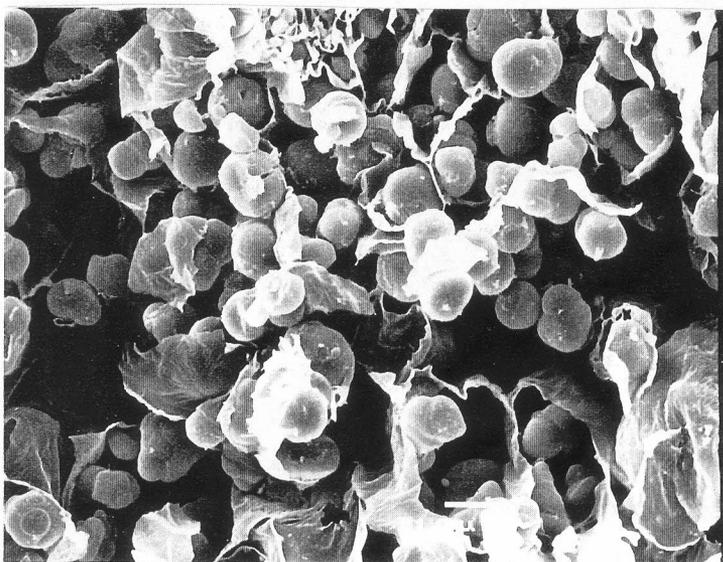


FIGURA 30 – Corte histológico transversal da raiz de *Piper hispidinervium* C.DC. (20kv; X500; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, 1999).

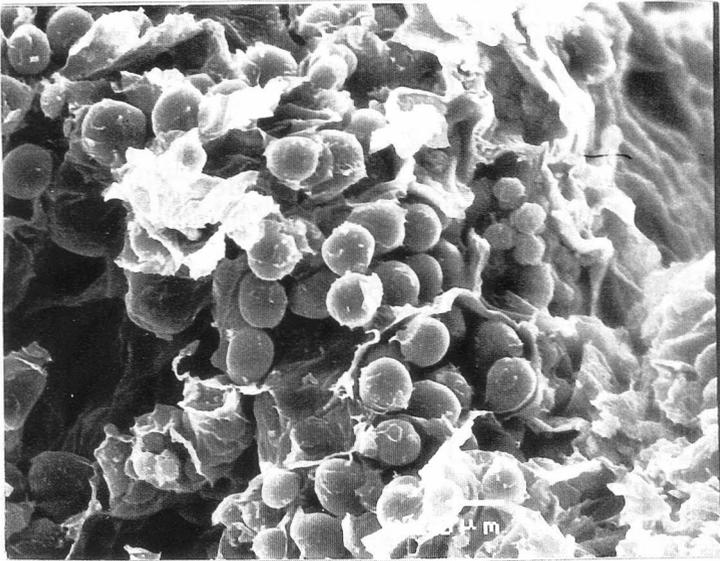


FIGURA 31 – Corte histológico transversal da raiz de *Piper hispidinervium* C.DC. (20kv; X500; wd23; MEV; EMBRAPA/Amazônia Oriental, Belém, 1999).

4.7 CONCLUSÕES

Através dos aspectos anatômicos observados com auxílio da eletrofotomicrografia de varredura, pode-se concluir que:

- A espécie cultivada “in vitro” apresenta estômatos e tricomas, tanto na superfície adaxial como na abaxial sendo mais abundantes na abaxial.

- Ocorre a presença de estruturas epidérmicas de secreção, idioblastos oleíferos, na superfície abaxial.

- As variações de doses de nitrogênio e fósforo influenciam no tamanho das células estomáticas, na composição das estruturas e superfícies epidérmicas e nas estruturas dos feixes vasculares, variando as intensidades de células contendo grãos de amido.

4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, I.N. Propagação in “vivo” e “in vitro”, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem de *Cissus sicyoides*. Lavras: UFLA, 1998. 113p. (Dissertação – Mestrado em Fisiologia Vegetal)
- ARAÚJO, M.G.P. de; MENDONÇA, M.S. de. Escleromorfismo foliar de *Aldina heterophylla* Spruce ex Benth (Leguminosae: Papilionoideae) em três campinas da Amazônia Central. *Acta Amazônica*, Manaus, v.28, n.4, p.353-371, 1998.
- COLMER, T.D.; BLOOM, A.J. A comparison of NH_4^+ and NO_3^- net fluxes along roots of rice and maize. *Plant, Cell and Environment*, Oxford, v.21, p.240-246, 1998.
- DE ROBERTIS, E.; DE ROBERTIS Jr., E.M. **Bases da biologia molecular e celular**. 2.ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 1993. 307p.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: Edgard Blücher, 1974. 293p.
- FIDELIS, I. Micropropagação de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Mamacadela) uma espécie considerada medicinal. Lavras: UFLA, 1998. 109p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia)
- GAY, A.P.; HURD, R.G. The influence of light on stomatal density in the tomato. *New Phytologist*, Cambridge, v.75, p.37-46, 1975.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture- Handbook and directory of comercial laboratories**. Eversley: Exegetics, 1984. 593p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NASCIMENTO, M.E. Aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Piper hispidinervium* C.DC. (Piperaceae) e suas estruturas secretoras. Belém: UFPa/MPEG, 1997. 78p. (Dissertação – Mestrado em Biologia Ambiental)

- PYYKKÖ, M., The leaf anatomy of East Patagonian xeromorphic plants. **Annales Botanici Fennici**, Helsinki, v.3, p.453-622, 1996.
- SALATINO, A.; MONTENEGRO, G.; SALATINO, M.L.F. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.9, p.117-124, 1986.
- SANTOS, J.M. dos. **Microscopia eletrônica de varredura aplicada às ciências biológicas**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1995. 27p.
- SCATENA, V.L.; MENEZES, N.L. de. Anatomia de escapos e folhas de *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae) de campos rupestres. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.56, n.2, p.317-332, 1996.
- TOMLINSON, P.B. Commelinales Zingiberales. In: METCALFE, C.R. **Anatomy of the Monocotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1969. v.3.
- VENTURELLI, M. Estudos sobre *Struthanthus vulgaris* Mart.: aspectos anatômicos de raiz adventícia, caule e folha. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.7, n.2, p.7989, 1984.

A N E X O S

ANEXOS

ANEXOS A		Página
TABELA 1	Resumo da anava para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	112
TABELA 2	Regressão polinomial para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	112
TABELA 3	Resumo da anava para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	112
TABELA 4	Regressão polinomial para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	113
TABELA 5	Resumo da anava para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca do caule (MFC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	113
TABELA 6	Regressão polinomial para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca do caule (MFC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	113
TABELA 7	Resumo da anava para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca do caule (MFC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	114
TABELA 8	Regressão polinomial para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca do caule (MFC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	114

TABELA 9	Resumo da anava para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca da folha (MFF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.....	114
TABELA 10	Regressão polinomial para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca da folha (MFF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	115
TABELA 11	Resumo da anava para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca da folha (MFF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.....	115
TABELA 12	Regressão polinomial para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca da folha (MFF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	115
TABELA 13	Resumo da anava para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria seca da raiz (MSR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.....	116
TABELA 14	Regressão polinomial para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria seca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.....	116
TABELA 15	Resumo da anava para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria seca da raiz (MSR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	116
TABELA 16	Regressão polinomial para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria seca da raiz (MSR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.....	117
TABELA 17	Resumo da anava para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria seca da folha (MSF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	117

TABELA 18	Resumo da anava para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria seca da folha (MSF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	117
TABELA 19	Regressão polinomial para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria seca da folha (MSF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”	118
TABELA 20	Composição química do meio nutritivo de Murashige e Skoog (1962) e suas respectivas concentrações, utilizadas nos experimentos.....	118

TABELA 1A - Resumo da anava para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		½ P	P	2P
Reg. Linear	1	3,1525**	0,7285*	0,9293*
Reg. Quadrática	1	2,1122**	0,0242 ^{ns}	0,0515 ^{ns}
Desvios de reg.	2	0,5276*	1,6345**	2,5775**
Resíduo	30	0,1379	0,1379	0,1379

* significativo a 5% de probabilidade.

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

TABELA 2A - Regressão polinomial para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

N dentro de P	Equação	Coefficiente de Determinação (R ²)
N(1/2 de P)	$Y = 1,6330 - 2,5990x + 0,9458x^2$	0,83
N(1 de P)	$Y = 0,8324 - 0,3117x$	0,18
N(2 de P)	$Y = 0,7760 - 0,3520x$	0,15

TABELA 3A - Resumo da anava para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio				
		0 N	¼ N	½ N	N	2 N
Reg. Linear	1	4,4316**	2,8983**	0,5884*	0,0849 ^{ns}	0,0330 ^{ns}
Reg. Quad.	1	0,0089 ^{ns}	1,0529**	0,1775 ^{ns}	1,3073**	0,00004 ^{ns}
Resíduo	30	0,1379	0,1379	0,1379	0,1379	0,1379

* significativo a 5% de probabilidade.

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

TABELA 4A - Regressão polinomial para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

P dentro de N	Equação	Coefficiente de determinação (R ²)
P(0 de N)	$Y = 2,4850 - 1,1252x$	0,99
P(1/4 de N)	$Y = 1,6222 - 2,8899x + 1,4777x^2$	1,00
P(1/2 de N)	$Y = 0,8183 - 0,4100x$	0,77
P(1 de N)	$Y = - 1,7167 + 4,3900x - 1,6467x^2$	1,00

TABELA 5A - Resumo da anava para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca do caule (MFC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		½ P	P	2P
Reg. Linear	1	0,1688**	0,0864 ^{ns}	0,5161**
Reg. Quadrática	1	0,0376 ^{ns}	0,0123 ^{ns}	0,0002 ^{ns}
Desvios de reg.	2	0,2715**	0,1102*	0,2626**
Resíduo	30	0,0223	0,0223	0,0223

* significativo a 5% de probabilidade.

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

TABELA 6A - Regressão polinomial para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca do caule (MFC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

N dentro de P	Equação	Coefficiente de Determinação (R ²)
N(1/2 de P)	$Y = 0,6712 - 0,1500x$	0,23
N(2 de P)	$Y = 0,6434 - 0,2623x$	0,50

TABELA 7A - Resumo da anava para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca do caule (MFC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio				
		0 N	¼ N	½ N	N	2 N
Reg. Linear	1	0,0013 ^{ns}	0,0613 ^{ns}	0,6732**	0,1110*	0,2272**
Reg. Quad.	1	0,0447 ^{ns}	0,1975**	0,0253 ^{ns}	0,0366 ^{ns}	0,0273 ^{ns}
Resíduo	30	0,0223	0,0223	0,0223	0,0223	0,0223

* significativo a 5% de probabilidade.

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

TABELA 8A - Regressão polinomial para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca do caule (MFC) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

P dentro de N	Equação	Coefficiente de determinação (R ²)
P(1/4 de N)	$Y = 1,3100 - 1,5133x + 0,6399x^2$	1,00
P(1/2 de N)	$Y = 1,1183 - 0,4386x$	0,96
P(1 de N)	$Y = 0,1667 + 0,1781x$	0,75
P(2 de N)	$Y = 0,6383 - 0,2548x$	0,89

TABELA 9A - Resumo da anava para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca da folha (MFF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de Variação	GL	Quadrado médio		
		½ P	P	2P
Reg. Linear	1	0,2245**	0,1442*	0,0765 ^{ns}
Reg. Quadrática	1	0,3081**	0,1223*	0,0311 ^{ns}
Desvios de reg.	2	0,0314 ^{ns}	0,0154 ^{ns}	0,0431 ^{ns}
Resíduo	30	0,0237	0,0237	0,0237

* significativo a 5% de probabilidade.

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

TABELA 10A - Regressão polinomial para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria fresca da folha (MFF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

N dentro de P	Equação	Coefficiente de determinação (R ²)
N(1/2 de P)	$Y = 0,9267 - 0,9180x + 0,3612x^2$	0,89
N(1 de P)	$Y = 0,8809 - 0,6081x + 0,2276x^2$	0,90

TABELA 11A - Resumo da anava para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca da folha (MFF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio				
		0 N	¼ N	½ N	N	2 N
Reg. Linear	1	0,3041**	0,0145 ^{ns}	0,0923 ^{ns}	0,0912 ^{ns}	0,1063*
Reg. Quad.	1	0,0033 ^{ns}	0,0905 ^{ns}	0,000002 ^{ns}	0,0134 ^{ns}	0,0258 ^{ns}
Resíduo	30	0,0237	0,0237	0,0237	0,0237	0,0237

* significativo a 5% de probabilidade.

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

TABELA 12A - Regressão polinomial para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria fresca da folha (MFF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

P dentro de N	Equação	Coefficiente de determinação (R ²)
P(0 de N)	$Y = 1,1283 - 0,2948x$	0,99
P(2 de N)	$Y = 0,6733 - 0,1743x$	0,81

TABELA 13A - Resumo da anava para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria seca da raiz (MSR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		½ P	P	2P
Reg. Linear	1	0,0307*	0,1394**	0,0002 ^{ns}
Reg. Quadrática	1	0,0278*	0,2403**	0,0083 ^{ns}
Desvios de reg.	2	0,0635*	0,0476**	0,0019 ^{ns}
Resíduo	30	0,0064	0,0064	0,0064

* significativo a 5% de probabilidade.

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

TABELA 14A - Regressão polinomial para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria seca da raiz (MFR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

N dentro de P	Equação	Coefficiente de determinação (R ²)
N(1/2 de P)	$Y = 0,3306 - 0,2878x + 0,1085x^2$	0,32
N(1 de P)	$Y = 0,5154 - 0,7943x + 0,3190x^2$	0,80

TABELA 15A - Resumo da anava para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria seca da raiz (MSR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo “in vitro”.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio				
		0 N	¼ N	½ N	N	2 N
Reg. Linear	1	0,115**	0,0275*	0,0169 ^{ns}	0,0010 ^{ns}	0,0030 ^{ns}
Reg. Quad.	1	0,1723**	0,0021 ^{ns}	0,0210 ^{ns}	0,0421*	0,0020 ^{ns}
Resíduo	30	0,0064	0,0064	0,0064	0,0064	0,0064

* significativo a 5% de probabilidade.

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

TABELA 16A - Regressão polinomial para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria seca da raiz (MSR) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo "in vitro".

P dentro de N	Equação	Coefficiente de determinação (R ²)
P(0 de N)	$Y = -0,1389 + 1,3433x - 0,5978x^2$	1,00
P(1/4 de N)	$Y = 0,3067 - 0,0886x$	0,93
P(1 de N)	$Y = 0,5811 - 0,7767x + 0,2956x^2$	1,00

TABELA 17A - Resumo da anava para as doses de N nas doses do fator P para a variável peso da matéria seca da folha (MSF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo "in vitro".

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		½ P	P	2P
Reg. Linear	1	0,0002 ^{ns}	0,0132 ^{ns}	0,0030 ^{ns}
Reg. Quadrática	1	0,0096 ^{ns}	0,0069 ^{ns}	0,0032 ^{ns}
Desvios de reg.	2	0,0326**	0,0061 ^{ns}	0,0018 ^{ns}
Resíduo	30	0,0044	0,0044	0,0044

** significativo a 1% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

TABELA 18A - Resumo da anava para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria seca da folha (MSF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo "in vitro".

Fonte de variação	GL	Quadrado médio				
		0 N	¼ N	½ N	N	2 N
Reg. Linear	1	0,0327*	0,0211*	0,0073 ^{ns}	0,0032 ^{ns}	0,0027 ^{ns}
Reg. Quad.	1	0,0001 ^{ns}	0,0077 ^{ns}	0,0138 ^{ns}	0,0263*	0,0098 ^{ns}
Resíduo	30	0,0044	0,0044	0,0044	0,0044	0,0044

* significativo a 5% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

TABELA 19A - Regressão polinomial para as doses de P nas doses do fator N para a variável peso da matéria seca da folha (MSF) da pimenta longa submetida a doses de N e P, em condições de cultivo "in vitro".

P dentro de N	Equação	Coefficiente de determinação (R ²)
P(0 de N)	$Y = -0,3450 - 0,0967x$	0,99
P(1/4 de N)	$Y = 0,2683 - 0,0776x$	0,73
P(1 de N)	$Y = 0,5267 - 0,6300x + 0,2333x^2$	1,00

TABELA 20A - Composição química do meio nutritivo de Murashige e Skoog (1962) e suas respectivas concentrações, utilizadas nos experimentos.

COMPONENTES		CONCENTRAÇÃO DO MEIO (mg.L ⁻¹)
Macronutrientes	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ 2H ₂ O	440
	MgSO ₄ 7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	MnSO ₄ 4H ₂ O	22,300
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,600
	H ₃ BO ₃	6,200
	KI 0,75	0,830
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,250
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025
FeEDTA	FeSO ₄ 7H ₂ O	27,850
	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37,250
Misturas Orgânicas	Glicina	2,00
	Ácido Nicotínico	0,50
	Piridoxina HCl	0,50
	Tiamina HCl	0,50
	Mio-inositol	100,00
Carboidrato	Sacarose (g.L ⁻¹)	30,00