



NINA REIS SOARES

**SIMILARIDADE CARIOTÍPICA E AFINIDADE GENÔMICA
ENTRE TRÊS ESPÉCIES DE *Piper L.* NATIVAS DA
AMAZÔNIA**

LAVRAS-MG

2019

NINA REIS SOARES

**SIMILARIDADE CARIOTÍPICA E AFINIDADE GENÔMICA ENTRE TRÊS
ESPÉCIES DE *Piper L.* NATIVAS DA AMAZÔNIA**

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

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres

Orientadora

LAVRAS-MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Soares, Nina Reis.

Similaridade cariotípica e afinidade genômica entre três
espécies de *Piper* L. nativas da Amazônia / Nina Reis Soares. -
2019.

50 p. : il.

Orientador(a): Giovana Torres Augusta.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Piperaceae. 2. FISH. 3. GISH. I. Augusta, Giovana Torres.
II. Título.

NINA REIS SOARES

**SIMILARIDADE CARIOTÍPICA E AFINIDADE GENÔMICA ENTRE TRÊS
ESPÉCIES DE *Piper L.* NATIVAS DA AMAZÔNIA**

**CARIOTYPIC SIMILARITY AND GENOMIC AFFINITY AMONG THREE
SPECIES OF *Piper L.* NATIVES OF THE AMAZON**

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

APROVADA em 1 de julho de 2019.

Dra. Giovana Augusta Torres

Dra. Vânia Helena Techio, UFLA

Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal, UFPE



Profa. Dra. Giovana Augusta Torres

Orientadora

LAVRAS-MG

2019

*Aos meus pais, irmã e avós, **dedico***

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo, por sempre me acompanhar.

Aos meus pais, irmã e avós, pelo apoio e amor incondicional, mesmo nos momentos mais difíceis.

À professora Dra. Giovana Augusta Torres, agradeço pelo acolhimento, dedicação, disponibilidade e atenção. Obrigado por todo o aprendizado e orientação, que sem dúvida foram essenciais para a conclusão dessa etapa.

Ao Jhonata Costa da Silva, meu fiel IC e amigo, que contribuiu enormemente para a execução desse trabalho.

Ao pós-doutorando Guilherme Braz, agradeço aos ensinamentos das técnicas citogenética e pelas sondas, sem elas não teria concluído o trabalho.

À pós-doutoranda Laiane Corsini Rocha, pela grande ajuda e contribuição, estando sempre disponível para minhas dúvidas e sendo uma amiga querida.

Aos amigos do laboratório de citogenética, pelo conhecimento compartilhado e por fazer meus dias mais leves.

À banca, por ter aceito o convite e pelas valiosas contribuições.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos.

Ao técnico Felipe Fogaroli Corrêa, por todo auxílio no laboratório.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram para tornar possível que se cumprisse mais essa etapa da minha vida.

“O espírito sem limites é o maior tesouro do homem”

(J.K.Rowling)

RESUMO

A família Piperaceae é conhecida por ser produtora de óleos essenciais como parte de seu metabolismo secundário. O gênero *Piper* possui 1400 espécies, sendo que 400 ocorrem no Brasil. As espécies nativas do Acre: *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum* são produtoras, respectivamente, de dilapiol, safrol e sarisan, óleos de importância econômica por possuírem atividade bioinseticida, além de uso nas indústrias química e de perfumaria. As espécies são morfologicamente similares, o que gera grande controvérsia taxonômica. Alguns trabalhos classificam *P. aduncum* e *P. hispidinervum* como espécies distintas, outros consideram *P. hispidinervum* como um quimiotipo de *P. aduncum*. A classificação de *P. affinis hispidinervum* também é discutida, sendo classificada como um quimiotipo de *P. hispidinervum*, ou um híbrido entre *P. hispidinervum* e *P. aduncum*. A definição taxonômica prescinde de informações com maior resolução e o estudo dos cromossomos pode auxiliar na distinção das espécies. No presente trabalho, foram avaliadas as espécies nativas do Acre: *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum*, quanto ao seu cariótipo, padrão de bandeamento fluorescente, DNA ribossomal (DNAr) 45S e 5S por hibridização *in situ* fluorescente e afinidade genômica por meio de hibridização *in situ* genômica, a fim de identificar polimorfismos cromossômicos, que possam contribuir para diferenciação das mesmas. As três espécies possuem $2n = 26$, $x = 13$. *Piper aduncum* apresentou cromossomos medindo de 1,41 a 3,32 μm , *P. hispidinervum* de 1,65 a 3,70 μm e *P. affinis hispidinervum* de 1,60 a 4,22 μm . A morfologia dos cromossomos de *P. aduncum* foi metacêntrica e a de *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum* foi composta por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. As três espécies têm genoma com tamanho próximo a 1,00 pg. Todas apresentaram uma banda CMA⁺ proximal em um par de cromossomos homólogos. O bandeamento com o fluorocromo DAPI não produziu bandas. A análise do DNAr identificou, nas três espécies, um par de marcas 45S heteromórficas proximais no cromossomo 4, que co-localizaram com as bandas CMA⁺, e um par de marcas 5S proximais no cromossomo 7. A afinidade genômica por meio de hibridizações recíprocas envolvendo as três espécies revelou padrões de marcas muito similares, predominantemente pericentroméricas e proximais em todos os cromossomos em todas as espécies, revelando a similaridade da fração repetitiva quanto ao tipo e à localização. Conclui-se então que do ponto de vista cariotípico, os táxons *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum* são muito similares não sendo possível uma separação clara entre elas.

Palavras-chave: Piperaceae. FISH. GISH

ABSTRACT

The Piperaceae family is known to be a producer of essential oils as part of its secondary metabolism. The genus *Piper* has 1400 species, of which 400 occur in Brazil. The native species of Acre: *P. aduncum*, *P. hispidinervum* and *P. affinis hispidinervum*, respectively, are producers of dilapiol, safrol and sarisan, oils of economic importance because they have bioinsecticidal activity, besides use in the chemical and perfumery industries. The species are morphologically similar, which generates great taxonomic controversy. Some studies classify *P. aduncum* and *P. hispidinervum* as distinct species, others consider *P. hispidinervum* as a chemotype of *P. aduncum*. The classification of *P. affinis hispidinervum* is also discussed, being classified as a chemotype of *P. hispidinervum*, or a hybrid between *P. hispidinervum* and *P. aduncum*. The taxonomic definition lacks information with higher resolution and the study of the chromosomes can help in distinguishing the species. In the present work, the native species of Acre were evaluated: *P. aduncum*, *P. hispidinervum* and *P. affinis hispidinervum*, for their karyotype, fluorescent banding pattern, 45S and 5S ribosomal DNA (rDNA) by fluorescence in situ hybridization and genomic affinity analysis by means of genomic in situ hybridization, in order to identify chromosomal polymorphisms, which may contribute to their differentiation. The three species have $2n = 26$, $x = 13$. *Piper aduncum* presented chromosomes ranging from 1.41 to 3.32 μm , *P. hispidinervum* from 1.65 to 3.70 μm and *P. affinis hispidinervum* from 1.60 to 4.22 μm . The morphology of *P. aduncum* chromosomes was metacentric and that of *P. hispidinervum* and *P. affinis hispidinervum* was composed of metacentric and submetacentric chromosomes. The three species have a genome with size close to 1.00 pg. All presented a proximal CMA⁺ band on a pair of homologous chromosomes. Binding with the fluorochrome DAPI did not produce bands. rDNA analysis identified a pair of proximal heteromorphic 45S signals on chromosome 4, which co-located the CMA⁺ bands, and a pair of proximal 5S signals on chromosome 7 in all three species. Genomic affinity through reciprocal hybridizations involving the three species revealed very similar patterns, predominantly pericentromeric and proximal signals on all chromosomes in all species, revealing the similarity of the repetitive fraction regarding type and localization. Therefore, from a karyotypic point of view, the taxa *P. aduncum*, *P. hispidinervum* and *P. affinis hispidinervum* are very similar, with no clear separation among them.

Keywords: Piperaceae. FISH. GISH

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Classificação e descrição de <i>Piper</i> L.	14
2.2 Importância econômica do gênero <i>Piper</i>	18
2.3 Caracterização citogenética e conteúdo de DNA do gênero <i>Piper</i>	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Material Vegetal	25
3.2 Preparo das lâminas	25
3.3 Bandeamento cromossômico fluorescente e análise cariotípica	25
3.4 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH) e genômica (GISH).....	26
3.5 Quantificação do DNA por citometria de fluxo.....	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Caracterização cariotípica e tamanho do genoma.....	29
4.2 Afinidade genômica	33
5 DISCUSSÃO	36
5.1 Caracterização cariotípica e tamanho do genoma.....	36
5.2 Afinidade genômica por GISH	39
6 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Piperaceae é uma das famílias mais primitivas de angiospermas, sendo considerada uma angiosperma basal composta por seis gêneros e mais de 2000 espécies (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2016). É uma família predominantemente tropical, composta por plantas herbáceas trepadeiras e arbustos. Dentre os gêneros que a compõem, *Piper* L. tem destacada importância, pois muitas espécies são usadas como medicinais, aromatizantes, ornamentais, condimentos ou no controle de insetos e microrganismos. O gênero possui mais de 1400 espécies (The Plant List, 2013), sendo *Piper nigrum* L., espécie originária da Índia e produtora da pimenta-do-reino, a mais difundida no mundo. No Brasil, estão descritas 450 espécies (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2019). Dentre as espécies brasileiras, *Piper aduncum* L. (nome vulgar: pimenta-de-macaco), *Piper hispidinervum* C. DC. (pimenta longa) e *Piper affinis hispidinervum* C. DC. despertam interesse pelos compostos majoritários presentes em seus óleos essenciais.

Piper aduncum é fonte de dilapiol, uma substância com ação bioinseticida de grande interesse agroquímico (FAZOLIN et al., 2007). *Piper hispidinervum* possui grande valor comercial em decorrência do elevado teor de safrol em seu óleo essencial (FAZOLIN et al., 2007; SILVA; OLIVEIRA, 2000a), que é precursor de compostos com emprego comercial na indústria farmacêutica e química e como componente sinérgico de inseticidas biodegradáveis a base de piretros (LIMA, 2015). *Piper affinis hispidinervum*, por sua vez, é fonte de sarisan, uma substância com potencial bactericida (MASUDA et al., 1991), fungicida (VILLEGA et al., 1988) e bioinseticida (FAZOLIN et al., 2011).

A pimenta-de-macaco, *P. aduncum*, é nativa da América tropical, com ampla distribuição em todo o território brasileiro, principalmente na região sudeste e em diversos estados que compreendem a floresta Amazônica. A pimenta longa, *P. hispidinervum*, é encontrada em condições silvestres no vale do rio do Acre, enquanto *P. affinis hispidinervum* é encontrada em condições silvestres restritas a regiões do Tarauacá, Acre. (JARAMILLO; MARQUIS, 2004; WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004). As espécies são morfológicamente similares embora apresentem diferenças nos compostos majoritários de seus óleos essenciais. *Piper hispidinervum* apresenta teor de safrol suficiente para exploração comercial, ou seja, entre 87% a 97% do óleo essencial, enquanto que *P. aduncum*, apresenta alto teor de dilapiol (31,5% a 91,1%) e teor de safrol entre 0,10% e 3,24% (SILVA; OLIVEIRA, 2000a; SOUSA et al., 2008) e *P. affinis hispidinervum* possui alto teor de sarisan 74,3% e teor de safrol de 18% (BIZZO et al., 2001).

A definição taxonômica de *P. hispidinervum* e de *P. affinis hispidinervum* ainda é controversa, existindo várias hipóteses quanto à classificação desses táxons em relação a *P. aduncum*. Segundo Yuncker (1972), *P. hispidinervum* é considerada uma espécie distinta de *P. aduncum*, entretanto Silva (2000) sugere que *P. hispidinervum* seja um quimiotipo ou variedade de *P. aduncum*. A análise da diversidade genética da coleção de germoplasma da Embrapa-Acre, por meio de RAPD, indicou que as duas espécies formam grupos separados e que provavelmente são duas espécies distintas. Nesse estudo, como *P. affinis hispidinervum* formou um subgrupo com *P. hispidinervum*, foram consideradas as hipóteses de que essa seja uma variedade de *P. hispidinervum* com localização restrita e composição de óleo essencial divergente ou um híbrido entre *P. hispidinervum* e *P. aduncum* (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004).

Os estudos citogenéticos no gênero *Piper* apresentam ampla variação em número básico variando entre $x = 8$ (SHARMA & BHATTACHARYYA, 1959; DASGUPTA & DATTA, 1976; VIJISTELLA & SUBRAMANIAN, 1985), $x = 12$ (JOHANSEN, 1931; TIJO, 1948; YOSHIDA, 1960; JOSE & SHARMMA, 1985; VIJISTELLA & SUBRAMANIAN, 1985; NUNES et al. 2007), $x = 13$ (SHARMA, 1959; MARTIN & GREGORY, 1962; MATHEW, 1973; ONO, 1975; BEDI et al., 1981; SAMPATHKUMAR & NAVANEETHAN, 1981; SAMUEL & BAVAPPA, 1981; JOSE & SHARMMA, 1985; JOSEPH, 1999) e $x = 14$ (MAUGINI, 1950) e somático variando de $2n = 24$ em *P. subpeltatum*, *P. longum* L., *P. futokazura* Sub. Et Zuce., *P. cubeba* (JOHANSEN, 1931; TIJO, 1948; YOSHIDA, 1960; JOSE & SHARMMA, 1985) a $2n = 195$ em *P. betle* (JOSE & SHARMMA, 1985). Dados de citogenética clássica não diferenciaram *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, uma vez que ambas apresentaram $2n = 24$ cromossomos metacêntricos, com tamanhos similares, de 0,80 a 2,05 μm para *P. aduncum* e 0,81 a 2,29 μm para *P. hispidinervum* (NUNES et al., 2007).

O objetivo do trabalho é caracterizar a similaridade cariotípica e a homologia genômica entre *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum* para contribuir com a elucidação da controvérsia taxonômica que envolve essas três espécies. O número e a localização dos locos de DNAr 5S e 45S, descritos pela primeira vez para *Piper* nesse trabalho, podem contribuir para a diferenciação das espécies e inferências quanto a sua filogenia (ROA; GUERRA, 2012). A técnica de GISH fornece um método visual para distinguir genomas parentais e analisar a organização do genoma em híbridos interespecíficos, espécies aloploiploides e linhas de introgressão interespecífica. O fato de haver uma diferença importante no sinal de hibridização entre as espécies parentais levou à ideia de que a GISH poderia ser usada como uma ferramenta para testar a similaridade geral de sequências repetitivas entre as espécies (MARKOVA et al.,

2007). Os dados sobre as espécies testadas podem ser inferidos por comparação da presença, número e intensidade dos sinais nos cromossomos (MARKOVA et al. 2006). Muitos exemplos descrevendo a amplificação e o acúmulo de sequências repetitivas foram descritos em plantas (LENGEROVA et al. 2004, NEUMANN et al. 2006).

A caracterização mais detalhada do cariótipo, especialmente por meio de técnicas citogenéticas moleculares, pode gerar resultados com maior resolução que permitam inferir sobre a similaridade entre as três espécies, contribuindo assim para a definição taxonômica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Classificação e descrição de *Piper* L.

O gênero *Piper* L. segundo a classificação taxonômica de Jaramillo et al. (2008), pertence à divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Magnoliidae, ordem Piperales, família Piperaceae, clado Neotropical, sub-clado Radula. A família Piperaceae é uma das famílias mais primitivas de angiospermas e, por isso, considerada uma angiosperma basal. É composta por cerca por seis gêneros, com mais de 2000 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais no mundo. No Brasil, essa família está representada por cinco gêneros (*Piper*, *Peperomia*, *Potomorphe*, *Ottonia* e *Sarcorrhachis*) e cerca de 460 espécies, sendo 292 endêmicas (The Plant List, 2013; Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2019).

O gênero *Piper* possui mais de 1400 espécies (The Plant List, 2013), dentre elas 292 ocorrem no Brasil, das quais 187 estima-se que ocorrem na Amazônia (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2019). O gênero possui espécies de destaque no cenário econômico. A pimenta-do-reino (*P. nigrum*), originária da Índia, é a especiaria mais comercializada no mundo. Muitas outras espécies possuem atividades farmacológica, inseticida, ou de outros usos econômicos (AMORIM et al., 2007; AGRA et al., 2007; BRANDÃO et al., 2006 & 2008). Apesar dessa variedade, o gênero ainda é pouco estudado, sendo a maior parte das pesquisas voltada para a bioprospecção de produtos naturais, visto que suas espécies são conhecidas por serem grandes produtoras de óleos essenciais utilizados pela medicina tradicional e popular (NEGREIROS; MIQUELONI, 2015).

A maioria das espécies de *Piper* está localizada nas florestas de várzea em regiões quentes e úmidas do mundo e poucas ocorrem fora da faixa tropical. Uma análise biogeográfica da distribuição de espécies americanas de *Piper* revelou três regiões distintas de ocorrência: Amazônica, América Central e Mata Atlântica (JARAMILLO; MARQUIS, 2004). As piperáceas são caracterizadas pela ocorrência de plantas herbáceas trepadeiras, arvoretas, arbustos (maioria) e raramente espécies arbóreas. O fruto é uma drupa pequena, em forma de espiga, com sementes minúsculas (BARRESE, 2005). As plantas alcançam entre 1,8 a 5,5 metros, produzindo em média 40 infrutescências, contendo cerca de 470 sementes por fruto. Os frutos de muitas espécies são grandes recursos frugívoros para insetos e vertebrados. Eles ficam expostos verticalmente acima da copa da planta, facilitando a dispersão quiropterocórica, onde os morcegos são capazes de coletá-los, em pleno voo (JARAMILLO; MANOS, 2001)

P. aduncum, conhecida como pimenta-de-macaco ou aperta-ruão, é uma espécie arbustiva que mede de 1,80 até 3,60 m de altura (NEGREIROS; MIQUELONI, 2015). Os ramos são pubescentes; os pecíolos são verdes medindo de 2 a 4 mm de diâmetro; as folhas apresentam lâmina elíptica ou lanceolada com a base arredondada e o ápice acuminado, ásperas na face adaxial, medindo cerca de 20 cm de comprimento e 7 cm de largura. Ambas as superfícies são pubescentes com consistência membranácea e flexível. As superfícies adaxial e abaxial das folhas de *P. aduncum* possuem células epidérmicas de formato bastante variado como poligonal, cúbicas e retangulares, alongadas, com contorno liso e recoberta por cutícula delgada (DOUSSEAU, 2009). As espigas são sustentadas por pedúnculos que medem de 0,8 a 2 cm, são curvas e apresentam flores protegidas por bractéolas pedicelado-peltadas e os frutos com estigmas sesséis (SILVA; OLIVEIRA, 2000a).

Estudos de populações do banco de germoplasma da Embrapa Acre de *P. aduncum* revelou uma baixa variabilidade genética entre os indivíduos, sendo o grupo muito homogêneo e com um grau de similaridade próximo a 1,00, indicando que não há essencialmente diversidade genética para esta espécie na coleção de germoplasma. O alto grau de monomorfismo sugere a possibilidade de altas taxas de autopolinização (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004). Isso é corroborado por um estudo da ecologia da polinização das Piperáceas do Sudeste do Brasil, no qual *P. aduncum* apresentou níveis elevados de autopolinização espontânea. Além disso, *P. aduncum* tem uma tendência a formar grandes áreas de plantas que se reproduzem vegetativamente (FIGUEIREDO, 1997). Porém, a análise de quatro populações naturais de *P. aduncum* da Amazônia utilizando a técnica RAPD por Gaia et al. (2004) revelou uma ampla faixa de variabilidade genética (0,32 a 0,91), indicando a possibilidade de a espécie apresentar fecundação cruzada. Portanto, ainda não há um consenso sobre o modo de reprodução da espécie.

A espécie é nativa da América tropical com ampla distribuição em todo o território brasileiro, principalmente na região sudeste e em diversos estados da Amazônia, onde ocorre espontaneamente em pastagens e bordas de mata. *Piper aduncum* é uma espécie encontrada em várias formações florestais em locais quentes e úmidos (FIGUEIRÊDO et al., 2004). Esta espécie invade áreas desflorestadas após a exploração da floresta primária (WADT; EHRINGHAUS; KAGEYAMA, 2004), apresentando potencial de utilização na recomposição de áreas degradadas promovendo maior regeneração (BARRESE, 2005).

Piper hispidinervum, conhecida como pimenta longa, caracteriza-se como arvoretas ramificadas, nodosas de 1,80 até 3,50 m de altura (NEGREIROS; MIQUELONI, 2015). Apresenta filotaxia alterna dística, inflorescências com espigas alongadas e curvas de tamanho

semelhante às folhas e flores muito pequenas (MACIEL et al., 2014). O caule e os ramos são glabros; o pecíolo possui de 0,1 a 0,2 cm de comprimento; as folhas apresentam lâmina ovalada, opacas em ambas as faces, a face adaxial é levemente áspera enquanto a abaxial é pubescente e contém tricomas sobre as nervuras primárias e secundárias, variando de 14,5 a 22 cm de comprimento e cerca de 5 cm de largura (MACIEL et al., 2014; SILVA; OLIVEIRA, 2000a).

A espécie é considerada uma espécie alógama. Estudo da estrutura genética de treze populações naturais de *P. hispidinervum*, distribuídas em oito municípios do Vale do Rio Acre, revelou baixo coeficiente de endogamia ($F = 0,05$) e alta variabilidade genética entre os indivíduos que compõem as populações (71,90%) (WADT; KAGEYAMA, 2004). Pode ocorrer também autoincompatibilidade entre os indivíduos por meio de mecanismos que previnem a autofecundação, pois quando comparadas espiguetas ensacadas e não ensacadas, há maior produção de sementes nas espiguetas que não foram ensacadas (SILVA; OLIVEIRA, 2000b).

A espécie é encontrada em condições silvestres no vale do rio Acre, clareiras e bordas de matas, com preferência para ambientes perturbados. O trabalho de zoneamento e caracterização de habitats naturais de *P. hispidinervum*, realizado no Acre, revelou que a maioria dos locais de ocorrência da espécie foi em campos e pastagens abandonadas ou degradadas (SIVIERO et al., 2015), sendo indicada para projetos de recuperação de áreas degradadas (SOUZA; MOSCHETA; OLIVEIRA, 2004).

Em estudo de diversidade genética de genótipos de “pimenta longa” do Banco Ativo de Germoplasma de *Piper* da Embrapa Acre, utilizando marcadores moleculares RAPD, foram identificados seis genótipos do município de Tarauacá que foram nomeados por especialistas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro como *P. affinis hispidinervum*. Não foi possível classificar os indivíduos e a denominação explícita a maior proximidade com *P. hispidinervum*. Na análise de agrupamento, esses genótipos apresentaram maior similaridade também com *P. hispidinervum* (WADT et al., 2004).

A taxonomia de espécies de Piperaceae é considerada complexa (JARAMILLO et al., 2004). Souza & Lorenzi (2005) consideram preliminares os dados atualmente disponíveis sobre a classificação de gêneros e espécies, dentro da família Piperaceae, ressaltando haver possibilidade de mudanças na taxonomia atual. Jaramillo et al. (2004) apresentaram relações filogenéticas dos gêneros da ordem Piperales e ressaltam a necessidade de mais estudos. Kato & Furlan (2007) discutiram a química e a bioatividade dos compostos secundários isolados de membros da família Piperaceae, considerando as suas relações biossintéticas no contexto da taxonomia. Considerando *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum*, a classificação taxonômica atual é controversa, com várias teorias quanto a sua classificação.

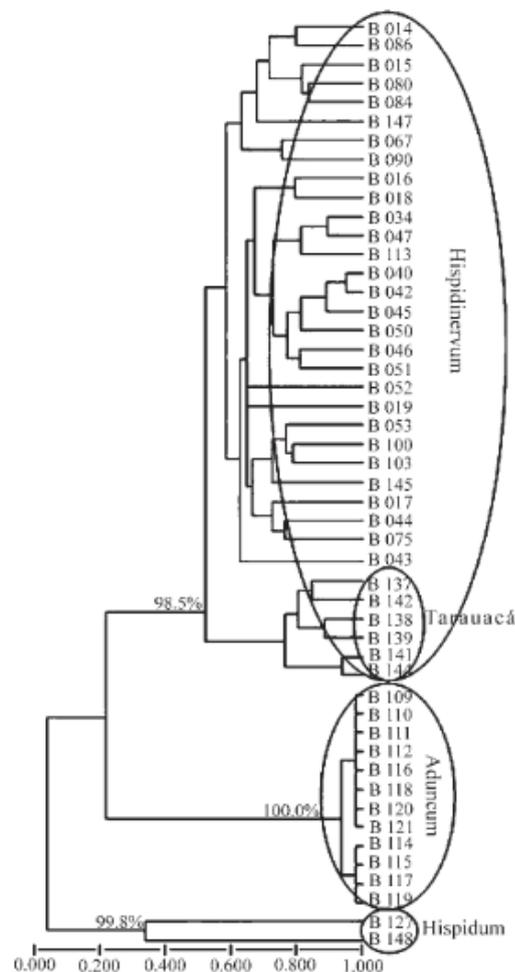
As espécies *P. aduncum* e *P. hispidinervum* são morfologicamente similares, embora apresentem diferenças em seus óleos essenciais. As diferenças morfológicas entre *P. aduncum* e *P. hispidinervum* encontram-se nas características foliares. *Piper aduncum* possui folhas elípticas ou lanceoladas com base redonda ou cardulata, ásperas na face adaxial e pubescentes nas faces abaxial e adaxial, enquanto *P. hispidinervum* apresentam folhas com lâmina ovada, opacas em ambas as faces, levemente ásperas na adaxial, a abaxial pubescente contém tricomas sobre as nervuras primárias e secundárias (YUNCKER, 1972). *Piper hispidinervum* possui alto teor de safrol, atendendo as concentrações para a exploração comercial, 87 a 97% do óleo essencial (SILVA; OLIVEIRA, 2000a). *Piper aduncum*, possui alto teor de dilapiol, sendo esse também em concentrações comerciais, 31,5 a 91,1% do óleo essencial, porém possui baixo teor de safrol, entre 0,10 e 3,24%, (SOUSA et al., 2008).

Yuncker (1972), que em seus estudos analisou a morfologia das espécies, diz que *P. hispidinervum* e *P. aduncum* são espécies distintas, já que possuem diferenças na morfologia das folhas. Por outro lado, Silva (1993), considerando a composição dos óleos essenciais, sugere que sejam apenas uma espécie e que *P. hispidinervum* seja um quimiotipo ou variedade de *P. aduncum*. A hipótese se baseia no fato de *P. aduncum* apresentar óleo essencial com alta teor de dilapiol enquanto *P. hispidinervum* apresenta alto teor de safrol.

Wadt et al. (2004), por meio de análise de diversidade genética do Banco Ativo de Germoplasma de *Piper* da Embrapa Acre, utilizando marcadores moleculares RAPD, considerou *P. hispidinervum* e *P. aduncum* como espécies distintas, uma vez que o grau de polimorfismo entre as duas espécies foi grande (Figura 1). Além disso, o número de marcadores em comum entre ambas foi relativamente baixo, cerca de 13,6%. Os seis genótipos coletados no município de Tarauacá, denominados *P. affinis hispidinervum*, formaram um subgrupo em relação a *P. hispidinervum* (Figura 1), com 63% de semelhança entre as espécies, segundo a análise dos marcadores moleculares. Porém ambas as espécies possuem diferenças como o local de origem, onde *P. affinis hispidinervum* se localiza no município de Tarauacá e *P. hispidinervum* no vale do rio Acre, e a porcentagem de safrol presente no óleo essencial também difere, *P. affinis hispidinervum* com 22,01% e *P. hispidinervum* com 93,7%, sendo que na primeira ocorre a presença predominante de sarisan no óleo essencial, diferente de todas as outras espécies estudadas. Na análise dos marcadores moleculares, 100% dos marcadores genotípicos de *P. hispidinervum* foram identificados em *P. affinis hispidinervum*. Esse dado genético sugere que este genótipo é um ecótipo de *P. hispidinervum*, com características fitoquímicas e genéticas distintas, já que *P. affinis hispidinervum* gerou mais marcas que *P. hispidinervum*. Outra possibilidade é que o subgrupo *P. affinis hispidinervum* represente um

intermediário, possivelmente um híbrido entre *P. hispidinervum* e *P. aduncum*. O germoplasma de *P. aduncum* e o grupo de Tarauacá (*P. affinis hispidinervum*) tiveram nove marcadores (13,6%) em comum, cinco dos quais com maior frequência do que em *P. hispidinervum*, sugerindo que pode haver mais fluxo genético entre as populações de *P. aduncum* do vale do Juruá e o grupo Tarauacá do que entre os grupos *P. hispidinervum* e *P. aduncum*.

Figura 1. Dendograma UPGMA de 49 genótipos de Pimenta Longa baseados na similaridade de Jaccard, mostrando três grupos principais e o subgrupo de Tarauacá. Número nas ramificações representa a consistência do nó gerado com 1000 bootstraps.



Fonte: Wadt et al. (2004)

2.2 Importância econômica do gênero *Piper*

A maioria das espécies do gênero *Piper* apresenta uso na medicina tradicional e popular, despertando interesse pelos óleos essenciais que produzem. Os óleos essenciais fazem parte do metabolismo secundário vegetal e são compostos tidos como não essenciais à vida do

organismo, mas que conferem vantagens adaptativas e\ou reprodutivas. Estão relacionados com a atração de polinizadores e dispersores de sementes, bem como com a proteção em situações de estresse biótico ou abiótico (SANGWAN, N.S., FAROOQI, A.H.A., SHABIH, F., SANGWAN, 2001).

Diversos constituintes fixos como alcaloides, flavonoides, arilpropanoides e lignanas são encontrados em espécies do gênero. Algumas espécies da Amazônia possuem compostos fenólicos responsáveis, em grande parte, pela atividade biológica de apiol, dilapiol, miristicina, elemicina, eugenol, metileugenol, etilpiperonilcetona, safrol e sarisan, todos encontrados em óleos essenciais de *Piper* já estudados (JARAMILLO; MARQUIS, 2004). Dentre as espécies do gênero *Piper* de interesse fitoquímico mais relevante presentes no Acre destacam-se *P. aduncum*, *P. hispidinervum*, *P. affinis hispidinervum*, *P. callosum* e *P. hispidum* (JARAMILLO; MANOS, 2001).

A pimenta de macaco (*P. aduncum*) é fonte de dilapiol, um fenil-éter com ação bioinseticida de grande interesse agroquímico. A espécie é pioneira, ocorrendo naturalmente em áreas antropizadas do Acre, contendo também propriedades medicinais (FAZOLIN et al., 2007). O dilapiol, assim como o safrol, age como sinérgico natural quando combinado com o princípio ativo de outros inseticidas (ESTRELA et al., 2006; FAZOLIN et al., 2005, 2007) sendo de grande interesse econômico na indústria devido à baixa toxicidade em mamíferos (SOUSA et al., 2008). O dilapiol possui ação sobre coleópteros como *Sitophilus zeamais motsch*, praga de grãos armazenados, principalmente de milho, arroz e trigo (ESTRELA et al., 2006); *Cerotoma tingomarianus Bechyne*, causador de desfolhamento severo no feijoeiro (FAZOLIN et al., 2005); *Tenebrio molitor* L., que infesta farinhas, rações e grãos quebrados ou anteriormente danificados (FAZOLIN et al., 2007); atividade inseticida e larvicida contra insetos fitófagos e mosquitos transmissores de dengue e malária (SOUSA et al., 2008).

A pimenta longa, *P. hispidinervum*, possui grande valor comercial devido ao elevado teor de safrol em seu óleo essencial, que é facilmente extraído de suas folhas e ramos (SILVA; OLIVEIRA, 2000a). O safrol é um fenil-éter precursor de compostos orgânicos com emprego comercial na indústria farmacêutica, na produção de perfumes e cosméticos, e como componente sinérgico de inseticidas biodegradáveis a base de piretros, com grande potencial para uso na indústria química.

O Brasil já foi o maior produtor mundial de safrol, extraído da canela sassafrás (*Ocotea pretiosa* Mezz.), planta nativa da Mata Atlântica, no Vale do Itajaí, em Santa Catarina. O safrol era inicialmente extraído das raízes de sassafrás levando à sua morte. Em 1991, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) proibiu o corte de

sassafrás em florestas primárias da Mata Atlântica devido ao risco de extinção da espécie, uma vez que a extração do óleo se dava pelo corte do tronco de árvores com aproximadamente 25 anos (SILVA; OLIVEIRA, 2000a). A descoberta da *P. hispidinervum* como uma espécie promissora para a obtenção de safrol ocorreu na década de 70, por meio do programa de triagem de plantas aromáticas da Amazônia, coordenada pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Rocha & Ming (1999) observaram a presença de safrol como composto majoritário da pimenta longa em seu óleo essencial, com teor superior a 90%. Como em *P. hispidinervum* o óleo essencial pode ser extraído das folhas e galhos finos, a extração é menos agressiva e mais sustentável, com cortes alternados, que mantêm as plantas vivas, quando comparada com a extração do óleo das raízes do sassafrás. Além disso, *P. hispidinervum* possui um rendimento médio de óleo entre 3 e 4%, contra apenas 1% de *O. pretiosa*, o que a torna ainda mais interessante economicamente.

São consumidos anualmente mais de 3.000 toneladas de safrol no mundo (FAZOLIN et al., 2007). Os derivados mais importantes obtidos do safrol são a heliotropina ou piperonal (usado como componente de fragrâncias nas indústrias de cosméticos e perfumarias) e o butóxido de piperonila (usado como agente sinérgico junto com o piretrium), este último sendo constituinte de inseticidas biodegradáveis (LUNZ et al., 1996). O safrol apresenta potencial na utilização em agricultura tendo efeito inibitório no crescimento *in vitro* dos fitopatógenos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* (ZACARONI et al., 2009) e *Alternaria alternata* (NASCIMENTO et al., 2008), também sendo utilizado como inseticida no controle da mariposa oriental, *Grapholita molesta* (OBRZUT; CARVALHO, 2011) e lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (FAZOLINI et al., 2015).

O principal composto do óleo essencial de *P. affinis hispidinervum* é o sarisan, um derivado de fenilpropanoide isômero da miristicina, que constitui de 52,1% a 90,4% do óleo (BIZZO et al., 2001). Essa substância foi descrita como tendo propriedades bactericidas contra *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (MASUDA et al., 1991), antifúngica (*Cladosporium cucumerinum*) (VILLEGA et al., 1988) e potencial uso como bioinseticida para adultos de *C. tingomarianus* e *S. zeamais*, assim como para lagartas de *S. frugiperda* (FAZOLIN et al., 2011).

Apesar das extensas pesquisas acerca dos efeitos do dilapiol, safrol e sarisan como bioinseticidas, essas substâncias ainda não são amplamente utilizadas no setor da agricultura, sendo restritas à experimentos em laboratórios (FAZOLIN et al., 2007). O programa de melhoramento genético de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* é conduzido na Embrapa Acre. Os

genótipos usados nos experimentos são mantidos no Banco Ativo de Germoplasma de *Piper* da Embrapa Acre, que possui acessos de 11 municípios do Estado do Acre. São estudados seus óleos essenciais (NEGREIROS; MIQUELONI, 2013a; NEGREIROS; MIQUELONI; CARTAXO, 2015; NEGREIROS; MIQUELONI; ÁLVARES, 2017), caracteres agronômicos (JUNIOR et al., 2013) e morfológicos (NEGREIROS; MIQUELONI, 2015). Para as espécies de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* já existem programas de melhoramento, onde são realizados estudos de populações para a constatação de variabilidade genética e seleção de genótipos promissores para cruzamentos (GAIA et al., 2004, 2011; NEGREIROS; MIQUELONI, 2013b)

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

A citotaxonomia, utilização de informações citogenéticas em estudos taxonômicos, tem contribuído para o melhor entendimento sobre a relação genética e a divergência entre espécies (GUERRA, 2008). A citogenética possui várias ferramentas que auxiliam na distinção entre grupos morfológicamente similares (DOBIGNY et al., 2004), sendo as mais clássicas: o número, tamanho e morfologia dos cromossomos, presença de constricções secundárias, tamanho do genoma e padrões de distribuição da heterocromatina (ROA; GUERRA, 2012).

A contagem cromossômica é uma tarefa relativamente fácil e que produz dados confiáveis (GUERRA, 2008). O número cromossômico é o dado citotaxonômico mais conhecido para quase todas as famílias de plantas, podendo complementar dados morfológicos e moleculares, detectando variações de ploidia e alterações no genoma que nem sempre são visíveis por outras abordagens. É uma ferramenta útil no estudo da sistemática e evolução das plantas, sendo utilizada para diferenciar espécies de gêneros filogeneticamente próximos ou de grupos polifiléticos com cariótipo variável (ROA; GUERRA, 2012).

Poucos estudos citogenéticos foram realizados com o gênero *Piper* e não existe consenso sobre seu número básico (Tabela 1). Matthew (1958) realizou um trabalho com espécies de *Piper* do Sul da Índia, observando variação no número cromossômico, $2n = 26, 52, 78, 104$, e propondo como número básico para o gênero $x = 13$. Posteriormente, esse número foi confirmado por Smith (1966), por Samuel e Bavapa (1981) e por Okada (1986).

Tabela 1. Número cromossômico e número básico em espécies de *Piper* L.

Espécie	Número cromossômico (2n)	Número básico (x)	Referência
<i>P. aduncum</i> L.	24	12	Nunes et al. (2007)
<i>P. argyrophyllum</i> Miq.	26, 39	13	Samuel & Bavappa (1981)
<i>P. attenuatum</i> Ham.	26, 39	13	Samuel & Bavappa (1981)
	36	12	Vijistella & Subramanian (1985)
	52	13	Jose & Sharma (1985)
<i>P. betle</i>	64	8	Dasgupta & Datta (1976)
	42, 52, 58, 78, 195	13	Jose & Sharmma (1985)
<i>P. brachystachyum</i> Wall.	132	12	Vijistella & Subramanian (1985)
<i>P. chaba</i> Hunter	104	13	Jose & Sharmma (1985)
<i>P. chuuya</i> C.DC.	52	13	Samuel & Bavappa (1981)
<i>P. cubeba</i>	24	12	Jose & Sharmma (1985)
<i>P. colubrinum</i> L.	26	13	Joseph (1999)
<i>P. futokazura</i> Sub. Et Zuce.	24	12	Yoshida (1960)
<i>P. galeatum</i> C.DC.	40	8	Vijistella & Subramanian (1985)
<i>P. geniculatum</i>	28	14	Maugini (1950)
<i>P. grissico-argenta</i> Yunku	22	11	Smith (1966)
<i>P. hispidinervum</i>	24	12	Nunes et al. (2007)
<i>P. hookeri</i> Miq.	60	12	Vijistella & Subramanian (1985)
<i>P. longum</i> L.	24	12	Tijo (1948)
	26	13	Samuel & Bavappa (1981)
	44	13	Sampathkumar & Navaneethan (1981)
	48	12	Sharma & Bhattacharyya (1959)
	48	12	Dasgupta & Datta (1976)
	52	13	Jose & Sharmma (1985)
	60	12	Vijistella & Subramanian (1985)
<i>P. magnificum</i> T.	26	13	Joseph (1999)
<i>P. medium</i>	28	14	Maugini (1953)

<i>P. nigrum</i> L.	22 – 96	13	Sharma (1959)
	36 – 60	12	Dasgupta (1976)
	52	13	Martin & Gregory (1962)
	52 – 104	13	Mathew (1973)
	54	13	Sampathkumar & Navaneethan (1981)
	104	13	Jose & Sharmma (1985)
<i>P. ornatum</i> N.E.Br.	80	8	Sharma & Bhattacharyya (1959)
<i>P. postelsianum</i> Maxim.	26	13	Ono (1975)
<i>P. schmidtii</i> Hook.f.	96	12	Vijistella & Subramanian (1985)
<i>P. subpeltatum</i>	24	12	Johansen (1931)
<i>P. sylvestre</i> Lam.	26, 39	13	Samuel & Bavappa (1981)
<i>P. thwaitesii</i> C.DC.	39	13	Samuel & Bavappa (1981)
<i>P. trineuron</i> Miq.	26	13	Samuel & Bavappa (1981)
<i>P. unguiculatum</i> R. & P.	26	13	Bedi <i>et al.</i> (1981)
<i>P. zeylanicum</i> Miq.	39	13	Samuel & Bavappa (1981)

Dasgupta e Datta (1976), estudaram 15 espécies de *Piper*. Os números cromossômicos ocorreram em múltiplos de 8, 11, 12, 13 e 14, onde 47,3% apresentaram $x = 12$ e 19,04% $x = 13$ cromossomos. *Piper nigrum* apresentou variação no número cromossômico básico, sendo encontrados $2n = 36, 48$ e 60 cromossomos, indicando número básico $x = 12$ e $2n = 26, 52$ e 104 cromossomos, apontando $x = 13$ como número básico. Na maioria das espécies do gênero *Piper* o número básico $x = 12$, embora múltiplos de $x = 8$ tenham sido encontrados em *P. betle* ($2n = 64$). Jose e Sharmma (1985) estudaram oito espécies de *Piper*. Os autores verificaram variação no número somático de *Piper* de $2n = 24$ a 195 cromossomos. Com exceção de *P. cubeba*, que apresentou $2n = 24$, todas as outras foram derivadas de $x = 13$. As variedades de *P. betle* apresentaram variação numérica com $2n = 42, 52, 58, 78, 195$, exibindo uma série poliploide, sendo que a maioria apresentou $2n = 78$. Samuel (1987) avaliou o número cromossômico de 11 espécies de *Piper* e encontrou número básico de $x = 13$ para todas elas, com o número somático variando de $2n = 26, 52$ e 104 . Samuel e Morawetz (1989) realizaram um estudo da evolução cromossômica de três gêneros de Piperaceae (*Piper*, *Peperomia* e *Potomorphe*). Dos gêneros avaliados, *Piper* apresentou os menores cromossomos, de $0,70$ a $3,50 \mu\text{m}$ e número básico $x = 13$. As espécies do gênero exibiram uma série poliploide com números cromossômicos variando de $2n = 26, 52, 65$. Joseph (1999) realizou análise

cariomorfométrica em três espécies de *Piper*: *P. magnificum* T. ($2n = 26$), *P. colubrinum* L. ($2n = 26$) e *P. nigrum* L. ($2n = 52$). As três espécies apresentam cromossomos metacêntricos e submetacêntricos com tamanho relativamente pequeno, variando de 0,32 a 2,46 μm .

Nunes et al. (2007) analisou o cariótipo de duas espécies de *Piper*: *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, as quais apresentaram número cromossômico $2n = 24$, indicando o número básico $x = 12$. O complemento cromossômico das duas espécies possui morfologia metacêntrica, com diferença nos valores de comprimento total do lote haploide, que foi de 15,82 μm para *P. aduncum* e 16,59 μm para *P. hispidinervum*. Goulart (2011) descreveu características citogenéticas e quantidade de DNA nuclear nas espécies *P. aduncum*, *P. affinis hispidinervum* e *P. hispidinervum*. Foi observado $2n = 26$ em todas as espécies. Esse número foi confirmado pela observação de 13 bivalentes na diacinese. A autora considera que a diferença de número com o descrito por Nunes et al. (2007) pode estar relacionada a variabilidade intraespecífica e que mais acessos devam ser avaliados para verificar a existências de citótipos. As espécies diferiram com relação à quantidade de DNA, *P. aduncum* com 1,88 pg e *P. hispidinervum* com 2,10 pg, à morfologia dos cromossomos uma vez que a fórmula cariotípica de *P. aduncum* foi $1\text{sm} + 12\text{m}$ e de *P. hispidinervum* foi $4\text{sm} + 9\text{m}$ e no tamanho dos cromossomos, *P. aduncum* com 1,12 a 3,71 μm e de 0,89 a 4,73 μm em *P. hispidinervum*. As três espécies apresentaram índice meiótico de cerca de 75% e diferiram quanto à viabilidade polínica, sendo que *P. affinis hispidinervum* apresentou o menor valor (9,1%).

A quantificação de DNA para espécies de *Piper* já havia sido realizada por Samuel, Smith e Bennett (1986). A quantificação foi realizada por densitometria de Feulgen e a análise dos núcleos foi em G2 (4C). Os autores verificaram uma variação no valor C de DNA nas espécies diploides de *P. apiculatum*, D.C., *P. cernuum* Vel. e *P. arboreum* Aubl. com 2,43, 4,22 e 3,12 pg de DNA respectivamente. A variação nas espécies tetraploides *P. nigrum* L., *P. longum* L., *P. betle* L., *P. sylvestre* Lam., *P. argyrophyllum* Miq. e *P. ornatum* N. E. Br. foi de 1,02, 0,68, 0,74, 0,98, 1,03, 0,83 pg de DNA respectivamente. A variedade octaploide de *P. nigrum* apresentou 1,20 pg de DNA. Os autores relatam que a quantidade de DNA nas espécies analisadas nem sempre acompanha a ploidia. Espécies silvestres diploides apresentam maior quantidade de DNA que as espécies tetraploides cultivadas. De acordo com os autores, as espécies silvestres tendem a ter maior quantidade de DNA que as espécies cultivadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Foram avaliados três acessos de *P. aduncum*, dois acessos de *P. hispidinervum* e um acesso de *P. affinis hispidinervum*. Os acessos de *P. aduncum* são oriundos de Plácido de Castro-AC (A2000002), Rodrigues Alves-AC (A2060005) e Mâncio Lima-AC (A2000005), os acessos de *P. hispidinervum* são oriundos de Brasília-AC (H679903) e Acre (H829902, H1179904) e o acesso de *P. affinis hispidinervum* tem origem em Tarauacá-AC (H1389602, H1459602 e H1419602). As sementes de todos os acessos foram doadas pela Embrapa Acre, Rio Branco-AC, Brasil. As plantas obtidas a partir da germinação das sementes foram cultivadas em casa de vegetação para obtenção de folhas para extração de DNA e meristemas radiculares para preparo de lâminas.

3.2 Preparo das lâminas

Pontas de raízes coletadas de plantas jovens foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 3 h, a 20°C, lavadas em água destilada gelada, fixadas em solução fixadora 3 metanol: 1 ácido acético e armazenadas a -20°C. A região meristemática foi isolada e submetida a digestão da parede celular em solução enzimática contendo celulase 4% / pectinase 2%, por cerca de 1 h e 15 min, a 37°C. As raízes digeridas foram lavadas com água destilada gelada e fixadas em solução 3 metanol: 1 ácido acético e armazenadas a -20°C por pelo menos 24 h. Os meristemas digeridos e fixados foram macerados sobre lâmina de vidro em solução fixadora usando pinças de ponta ultrafina e secas à chama (DONG et al. 2001).

3.3 Bandeamento cromossômico fluorescente e análise cariotípica

O padrão de distribuição de regiões ricas em GC e em AT foi revelado, respectivamente, pelo bandeamento com os fluorocromos Cromomicina A3 (CMA) e 4',6-Diamidino-2-fenilindole (DAPI), de acordo com protocolo de Guerra e Souza (2002), com adaptações. Lâminas foram armazenadas por sete dias à temperatura ambiente. Após incubação em tampão McIlvaine pH 7,0, por 20 min, as preparações foram incubadas por 1 h em solução contendo CMA 0,5 mg/mL e MgCl₂ 2,5 M e lavadas com tampão McIlvaine pH 7,0. As lâminas foram montadas em meio de montagem Vectashield contendo 1,5 µg/mL de DAPI. As lâminas foram avaliadas após três dias em microscópio de epifluorescência com comprimento de onda de

excitação/emissão 358/461 (DAPI) e 550/575 (CMA). As imagens foram capturadas usando uma câmera QImaging Remove o EXi CCD acoplado a um microscópio de fluorescência Olympus BX 60 e o contraste final feito com o software de edição de imagens.

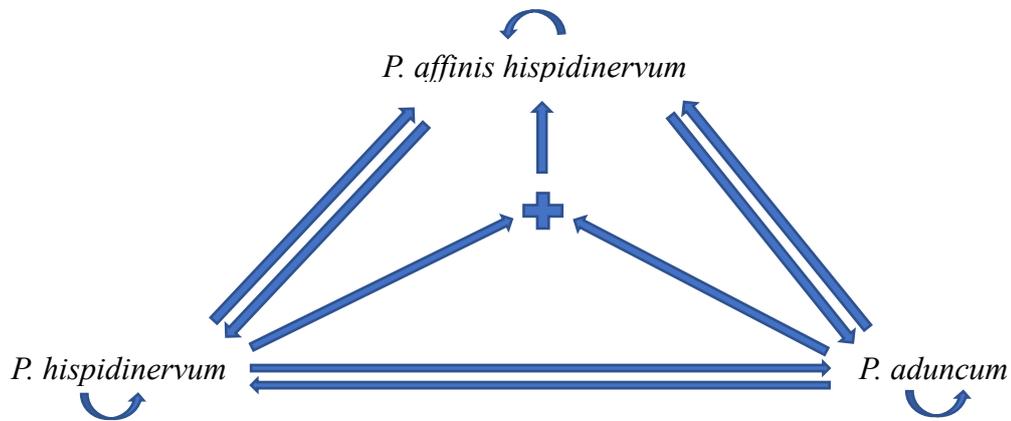
Pelo menos cinco metáfases de cada acesso foram selecionadas para contagem, medição dos cromossomos e avaliação do padrão de bandejamento. Com base nas imagens obtidas, os braços curto e longo (SA e LA, respectivamente) dos cromossomos foram medidos usando o programa Karyotype 2.0 (YU *et al.*, 2018). Os comprimentos médios de BC e BL de cada cromossomo foram obtidos a partir da medição de cinco diferentes metáfases de cada espécie e foram usados para construir os ideogramas e estimar o comprimento total do cromossomo ($CT = BC + BL$), o comprimento total do complemento haploide ($CTLH = \sum Lti$), o índice centromérico ($IC = [BC / (BC + BL)] \times 100$). Os cromossomos foram classificados com base na posição de centrômero de acordo com Levan (1964). A assimetria cariotípica foi calculada segundo Stebbins (1971).

3.4 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e genômica (GISH)

A FISH foi usada para localizar as sequências de DNAr 45S e 5S. Bactérias transformadas com vetores contendo as sequências 45S (pTa71) e 5S (pTa794) de trigo (*Triticum aestivum*) foram cultivadas em meio LB contendo antibiótico seletor ampicilina. A partir de colônias isoladas desta cultura, a cultura líquida e a extração do plasmídeo foram feitas usando o Mini Kit Plasmídeo (Quiagen). As sondas 45S foram marcadas com biotina e as sondas 5S com digoxigenina por meio da técnica de “nick translation”. Cada reação de marcação era composta por 1 µg de DNA sonda, tampão de reação (Tris HCl 0,5 M pH 7,5, MgCl₂ 50 mM), nucleotídeos (dATP, dCTP e dGTP em 0,5 mM cada), nucleotídeo marcado (dTTP 0,33 mM + 0,16 mM dUTP marcado), 0,02 U de ADNase I e 0,5 U de DNA Polimerase I. A reação de marcação gerou fragmentos de 300 a 600pb que foram verificados em gel de agarose 1%.

Para os experimentos de GISH, DNA genômico (DNAg) de um acesso de cada espécie foi extraído conforme protocolo de Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações, para produção das sondas genômicas. As sondas de *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum* foram marcadas com digoxigenina e a sonda de *P. hispidinervum* com biotina por meio da técnica “nick translation” conforme descrito para marcação das sondas de DNAr. Os experimentos envolveram hibridizações com o próprio DNAg, hibridizações recíprocas e hibridização simultânea, conforme Figura 2.

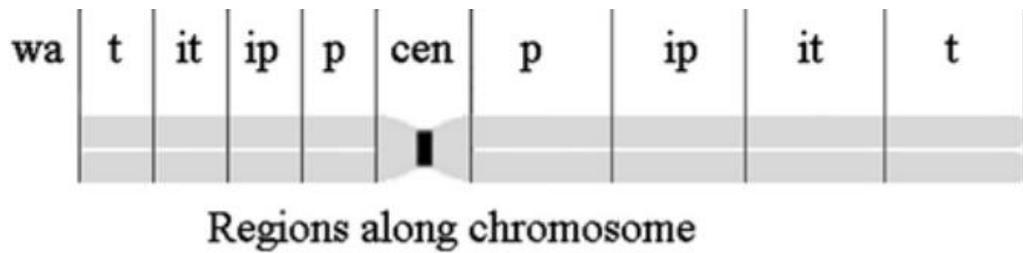
Figura 2. Combinações de genoma e sonda genômica em experimentos de hibridização *in situ* genômica (GISH) envolvendo *Piper aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum*.



As preparações cromossômicas foram tratadas com 100 µL de pepsina a 1% por 25 min e, em seguida, com 100 µL de formaldeído a 4% por 15 min. Os cromossomos mitóticos foram desnaturados com formamida 70% em 2x SSC por cerca de 1 min e 7 s a 85°C e desidratados em série alcoólica a -20°C, por 5 minutos cada: 70%, 90% e 100% de etanol. A mistura de hibridação (50% de formamida, 2x SSC, 10% de sulfato de dextran, 50-100 ng da sonda marcada) foi desnaturada durante 8 min a 95 °C e resfriada em gelo durante pelo menos 5 min. A mistura de hibridação foi aplicada na preparação cromossômica, coberta com lamínula de 22 x 40 mm, selada com adesivo de borracha e colocada em câmara úmida a 37°C, por 48 h.

A localização das sondas de DNAr e das sondas genômicas foi feita em lâminas de dois acessos de cada espécie. A detecção das sondas foi feita com o uso dos anticorpos streptavidina conjugada com alexafluor 488 e antidigoxigenina conjugada com rodamina (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) após lavagens com tampão 2x SSC e PBS. Os cromossomos foram contracolorados com DAPI (diamidinofenilindole) em meio de montagem “antifade” VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). As imagens foram capturadas usando uma câmera QImaging Remove o EXi CCD acoplado a um microscópio de fluorescência Olympus BX 60 e o contraste final feito com o software de edição de imagens. Pelo menos cinco metáfases de cada acesso foram analisadas para determinar a distribuição das sequências 5S e 45S e o padrão de hibridização genômica. Nas lâminas de GISH, os segmentos cromossômicos marcados pela sonda genômica (marcas GISH+) foram mensurados no software Karyotype 2.0 (YU et al., 2018) para avaliar a proporção de genoma hibridizado nas metáfases. Os kariogramas foram construídos com o software de edição de imagens. A região de hibridização das sondas foi definido conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Classificação das regiões cromossômicas. cen, região centromérica; p, proximal; ip, intersticial-proximal; it, intersticial-terminal; t, terminal; wa, todo braço.



Fonte: Roa & Guerra (2012)

3.5 Quantificação do DNA por citometria de fluxo

Três amostras de cada espécie foram quantificadas para estimar o conteúdo de DNA nuclear. Tecido foliar jovem (20-30 mg) foi macerado juntamente com a mesma quantidade de *Pisum sativum* (padrão interno de referência – Quantidade de DNA 2C = 9,09 pg) em placa de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado, para obtenção da suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997). À suspensão nuclear foi adicionado 15 µL de iodeto de propídeo. Para cada amostra foram quantificados pelo menos dez mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson). Os histogramas foram obtidos no software Cell Quest e analisados no software WinMDI 2.9. O conteúdo de DNA nuclear das plantas foi estimado em picogramas (pg) por comparação com a posição do pico G1 do padrão interno de referência.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização cariotípica e tamanho do genoma

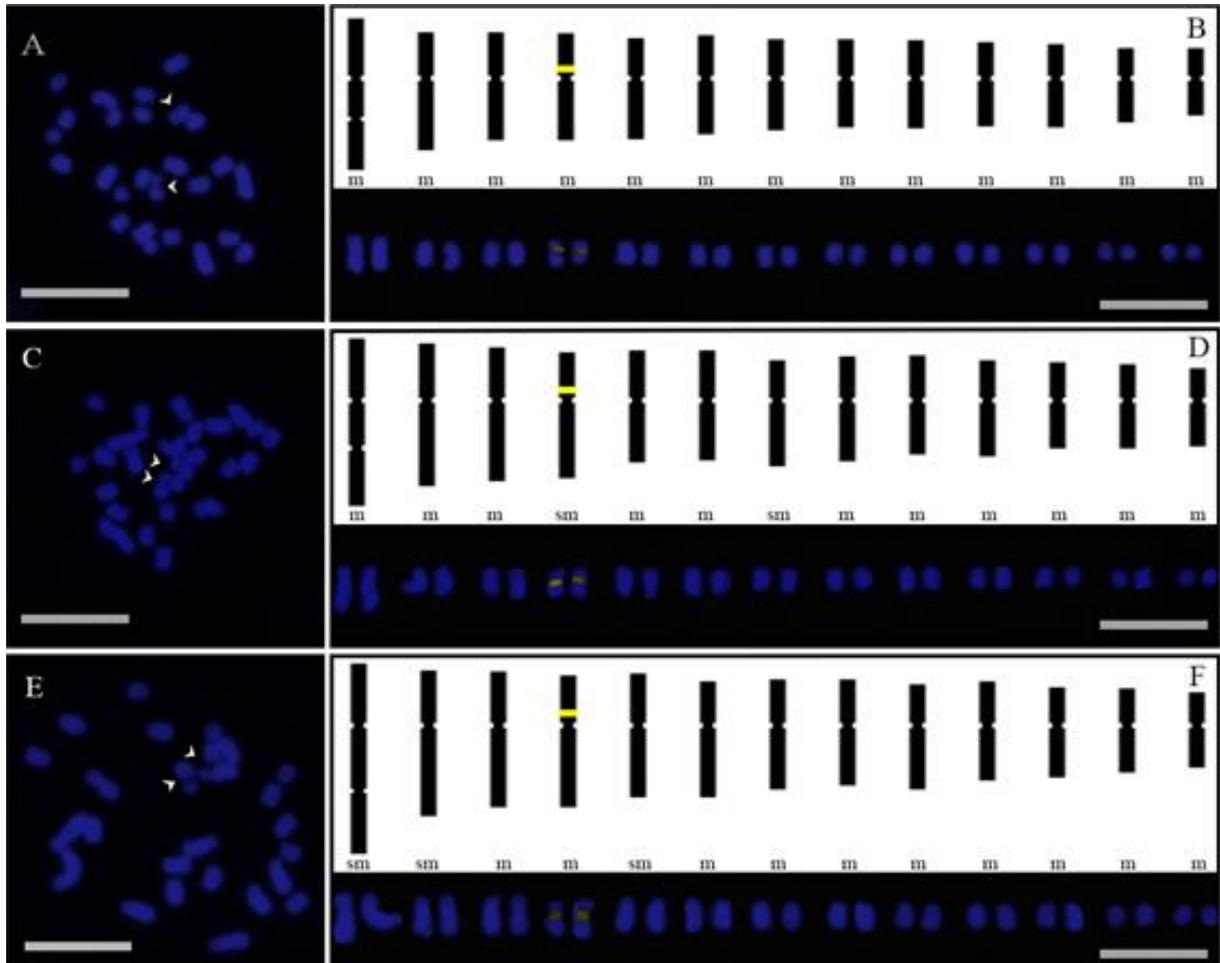
As três espécies apresentaram $2n = 26$ e divergiram quanto ao tamanho dos cromossomos, comprimento total do complemento haploide e fórmula cariotípica (Figura 4 e Tabela 2). As fórmulas cariotípicas foram calculadas a partir de Levan (1964), onde pares cromossômicos com índice centromérico maior que 37,5 são considerados metacêntricos (Tabela 3). Os cromossomos de *P. aduncum* foram todos metacêntricos, medindo de 1,41 a 3,32 μm , sendo o comprimento médio dos cromossomos 2,09 μm e o comprimento total do complemento haploide de 27,24 μm (Figura 4A-B). Em *P. hispidinervum*, o comprimento variou de 1,65 a 3,70 μm , sendo o comprimento médio dos cromossomos 2,42 μm e o comprimento total do complemento haploide 31,49 μm , com fórmula cariotípica $11m + 2sm$ (Figura 4C-D). Em *P. affinis hispidinervum*, o comprimento variou de 1,60 a 4,22 μm , sendo o comprimento médio dos cromossomos 2,52 μm e o comprimento total do complemento haploide 32,87 μm com fórmula cariotípica $10m + 3sm$ (Figura 4E-F).

Tabela 2. Número somático ($2n$), fórmula cariotípica (FC), intervalo do tamanho cromossômico (ITC), média do comprimento cromossômico (CCM) e comprimento total do complemento haploide (CTCH) de *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum*.

Espécie	$2n$	FC	ITC (μm)	CCM (μm)	CTCH (μm)	Valor C (pg)
<i>P. aduncum</i>	26	13m	1,41 - 3,32	2,09	27,24 ^b	2,06 ^a
<i>P. hispidinervum</i>	26	11m + 2sm	1,65 - 3,70	2,42	31,49 ^a	2,14 ^a
<i>P. affinis hispidinervum</i>	26	10m + 3sm	1,60 - 4,22	2,52	32,87 ^a	1,99 ^a

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Figura 4. Metáfase (A, C, E) e ideograma e cariograma (B, D, F) de *P. aduncum* (A, B), *P. hispidinervum* (C, D) e *P. affinis hispidinervum* (E, F). Cabeças de seta indicam a constrição secundária. Barras em B, D e F de 10 μ m.



Com relação ao índice de assimetria cariotípica, *P. aduncum* foi classificada como 1B, ou seja, a espécie apresentou alta simetria cariotípica, tendo os cromossomos com proporções 2:1 – 4:1 (BC/BL). Por outro lado, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum*, foram classificadas como 2B, ou seja, as espécies foram intermediárias com relação à simetria do cariótipo, com 0,99 – 0,51 para os pares cromossômicos (proporção 2:1) e com proporções 2:1 – 4:1 para os cromossomos.

Nas três espécies foi observado no par cromossômico 1, duas constrições, formando três segmentos, uma constrição primária (centrômero) na região mediana e uma segunda terciária menor em tamanho e sem função conhecida, na região do braço longo. Foi observado também uma constrição secundária na região proximal do quarto cromossomo, formando um satélite terminal linear (Figura 4).

Tabela 3. Índice centromérico nos pares cromossômicos de *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum*.

Índice centromérico			
Par cromossômico	<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>P. affinis hispidinervum</i>
1	39.24 (m)	43.82 (m)	32.34 (sm)
2	38.27 (m)	39.16 (m)	37.46 (sm)
3	42.59 (m)	39.62 (m)	38.10 (m)
4	40.87 (m)	37.17 (sm)	41.61 (m)
5	40.44 (m)	45.80 (m)	37.44 (sm)
6	43.98 (m)	43.06 (m)	39.01 (m)
7	41.50 (m)	37.11 (sm)	42.01 (m)
8	44.19 (m)	41.06 (m)	41.92 (m)
9	41.63 (m)	45.32 (m)	38.75 (m)
10	42.64 (m)	43.16 (m)	44.24 (m)
11	40.60 (m)	44.05 (m)	41.15 (m)
12	39.93 (m)	43.03 (m)	43.51 (m)
13	44.21 (m)	40.53 (m)	43.21 (m)

O valor C para *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum* foi estimado, respectivamente, em 1,03, 1,07 e 1,0 pg de DNA. O teste de médias Scott-Knott a 5% de probabilidade revelou que não existe diferença significativa para tamanho do genoma, que corresponde a cerca de 1Gb para as três espécies (Tabela 2).

O bandeamento DAPI revelou que nos cromossomos das três espécies não foram evidenciados blocos heterocromáticos ricos em adenina e timina, uma vez que a coloração foi uniforme. Por outro lado, o bandeamento CMA revelou uma banda CMA⁺ na região proximal do cromossomo 4, coincidente com a constrição secundária, para as três espécies (Figura 4).

A hibridização *in situ* fluorescente foi utilizada para analisar o padrão de distribuição dos sítios de DNAr 5S e 45S nos cromossomos das três espécies estudadas (Figura 5). Foi identificada uma marca DNAr 5S proximal no cromossomo 7 e uma marca DNAr 45S proximal com heteromorfismo entre cromossomos homólogos no cromossomo 4, não havendo diferença no número ou posição de sinais de DNAr nas três espécies (Figura 6). O DNAr 45S co-localiza com a banda CMA⁺ na constrição secundária do par cromossômico 4 nas três espécies (Figuras 4 e 6).

Figura 5. Metáfases de *P. aduncum* (A, D, G, J), *P. hispidinervum* (B, E, H, K) e *P. affinis hispidinervum* (C, F, I, L). Colocação DAPI em azul (A-C), sítios de DNAr 5S em verde (D-F) e 45S em vermelho (G-I) e sobreposição com cromossomos pseudocorados em cinza (J-L). Barra de 10 μ m.

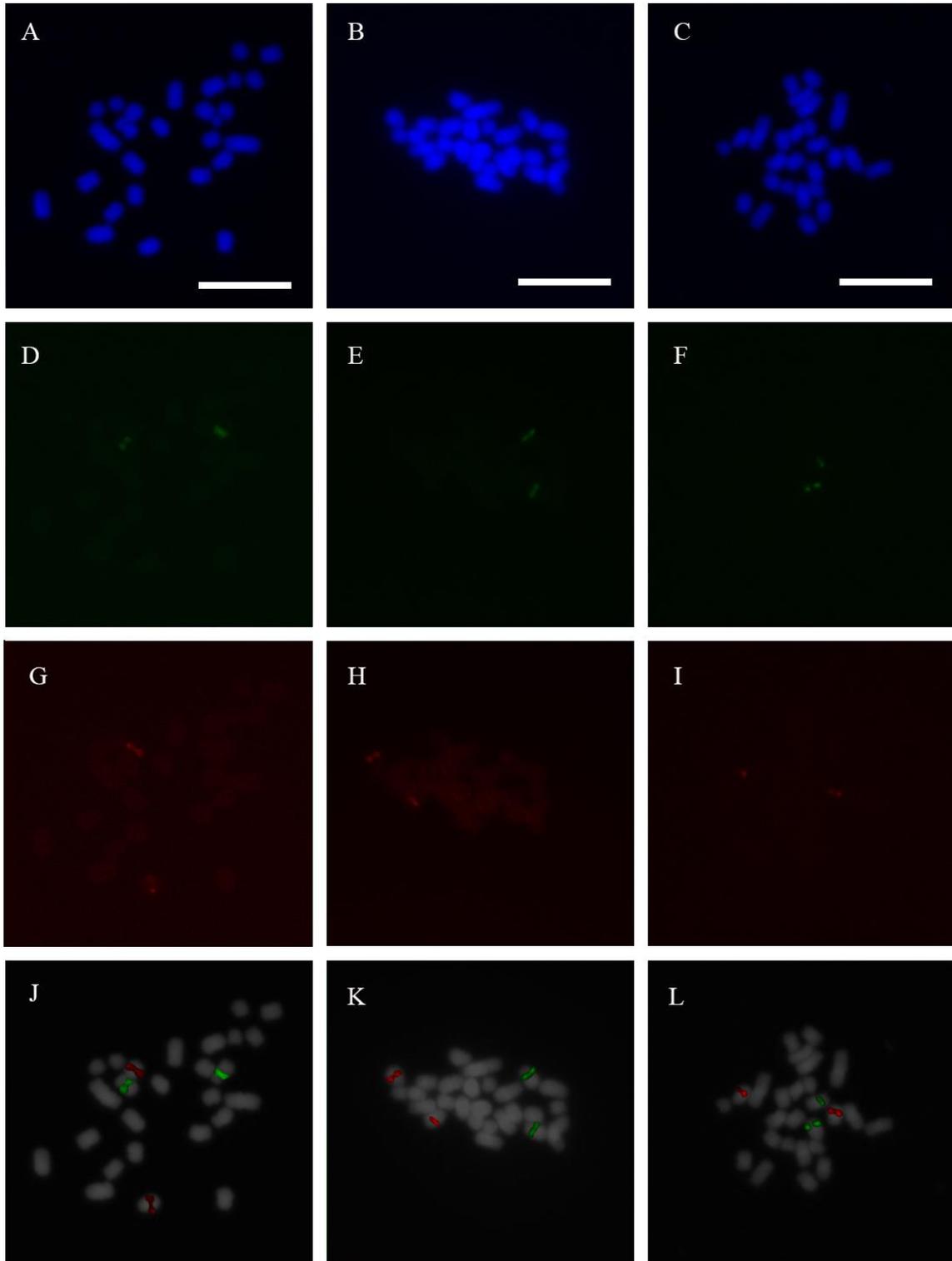
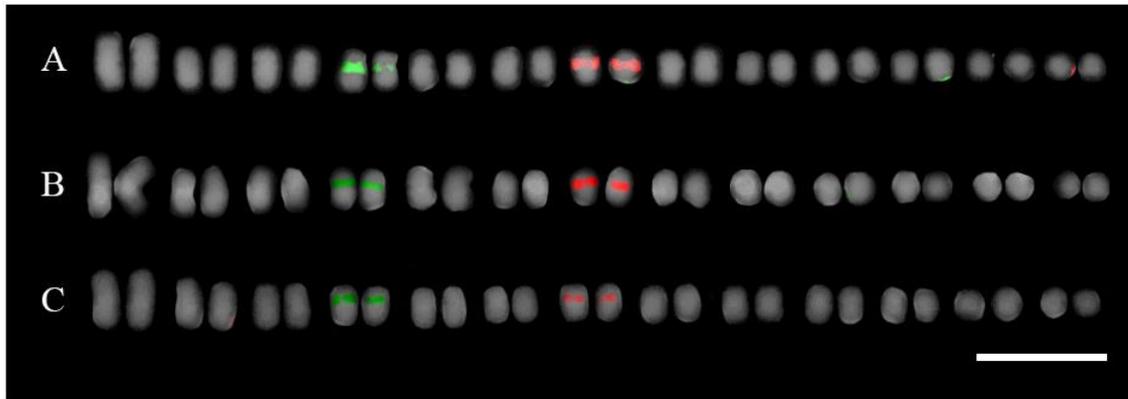


Figura 6. Cariograma de *P. aduncum* (A), *P. hispidinervum* (B) e *P. affinis hispidinervum* (C), com localização das seqüências de DNAr 5S em vermelho e 45S em verde, e cromossomos pseudocorados em cinza. Barra de 10 μ m.



4.2 Afinidade genômica

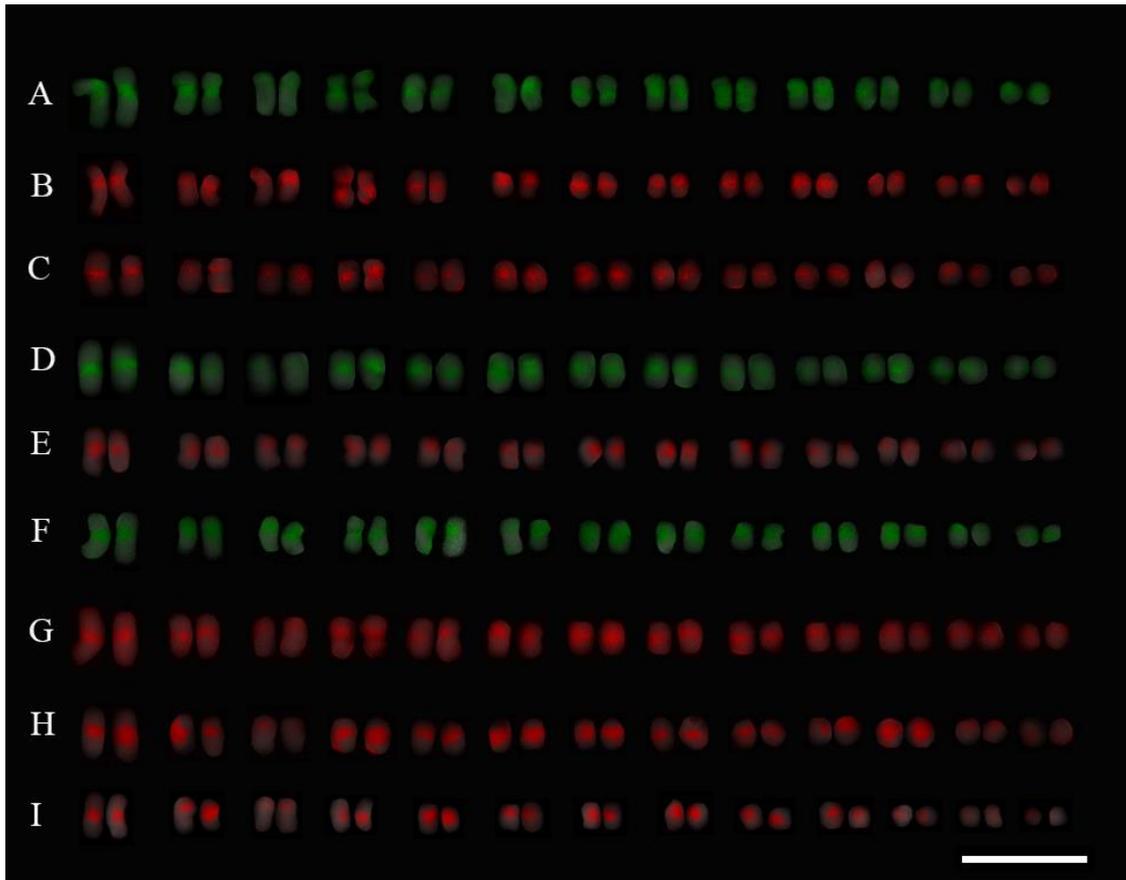
Nas análises da GISH, o DNA genômico (DNAg) de *P. hispidinervum* hibridizou 60,55% em seu próprio genoma e em 54,27% no genoma de *P. aduncum*. O DNAg de *P. aduncum* ao ser hibridizado com seu próprio genoma obteve uma taxa de hibridização de 60,92% e 58,98% no genoma de *P. hispidinervum* (Figura 7, Tabela 4).

O DNAg de *P. affinis hispidinervum* em seu próprio genoma gerou 58,12% de hibridização. Os DNAg de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* produziram, respectivamente, 57,09% e 50,46% de hibridização no genoma de *P. affinis hispidinervum*. A hibridização do DNAg de *P. affinis hispidinervum* no genoma de *P. aduncum* obteve 58% e no genoma de *P. hispidinervum* obteve 48,04% (Figura 7, Tabela 4).

Tabela 4. Proporção média e desvio padrão (%) do DNA genômico hibridizado em cromossomos de *P. aduncum* (*Pa*), *P. hispidinervum* (*Ph*) e *P. affinis hispidinervum*, mediante hibridização *in situ* genômica.

Metáfases	DNA genômico			
	<i>P. aduncum</i>	<i>P. hispidinervum</i>	<i>P. affinis hispidinervum</i>	<i>P. aduncum + P. hispidinervum</i>
<i>P. aduncum</i>	60,92 \pm 1,92	58,98 \pm 1,07	58,00 \pm 1,81	-
<i>P. hispidinervum</i>	54,27 \pm 1,04	60,55 \pm 0,60	48,04 \pm 1,12	-
<i>P. affinis hispidinervum</i>	57,09 \pm 1,91	50,46 \pm 1,77	58,98 \pm 1,33	58,12 \pm 1,61 (<i>Pa</i>) 54,27 \pm 1,07 (<i>Ph</i>) 52,35 \pm 1,34

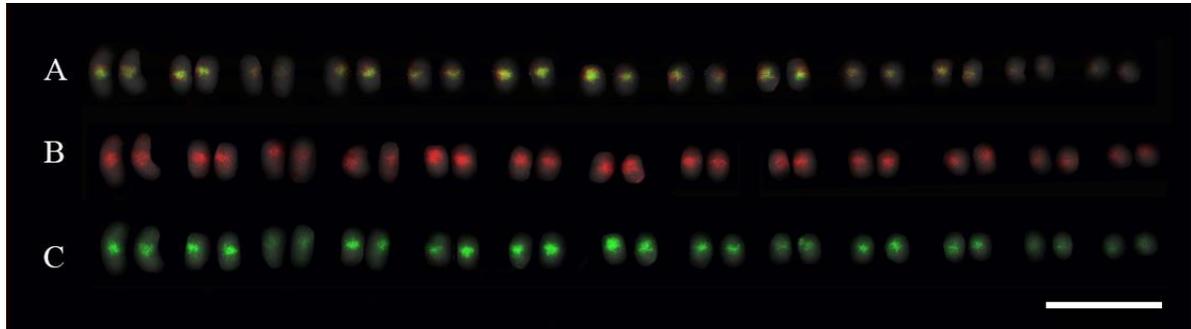
Figura 7. Cariogramas de espécies de *Piper* L submetidas a técnica de hibridização *in situ* genômica (GISH). Cromossomos de *P. hispidinervum* com sonda genômica de *P. hispidinervum* (A) e de *P. aduncum* (B); Cromossomos de *P. aduncum* com sonda genômica de *P. aduncum* (C) e *P. hispidinervum* (D); Cromossomos de *P. affinis hispidinervum* e sonda genômica *P. affinis hispidinervum* (E) e *P. hispidinervum* (F); Cromossomos de *P. hispidinervum* e sonda genômica *P. affinis hispidinervum* (G), cromossomos de *P. affinis hispidinervum* e sonda genômica *P. aduncum* (H), cromossomos de *P. aduncum* e sonda genômica *P. affinis hispidinervum* (I). Cromossomos contracolorados com DAPI (pseudocoloridos em cinza) e sondas genômicas em vermelho e verde. Barra de 10 μ m.



O genoma de *P. affinis hispidinervum* ao ser hibridizado simultaneamente com DNAs de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, como forma de bloqueio mútuo, teve taxas de hibridização de 54,27% de *P. aduncum*, 52,35% de *P. hispidinervum* e 58,12% de *P. aduncum* + *P. hispidinervum* (Tabela 4, Figura 8).

Em todas as hibridizações recíprocas realizadas, as bandas centroméricas/pericentroméricas foram majoritárias, seguidas das intersticiais, terminais e braço inteiro. O padrão de hibridização recíproco foi muito similar para as três espécies. (Figuras 7 e 8).

Figura 8. Cariogramas de *P. affinis hispidinervum* submetida a técnica de hibridização *in situ* genômica (GISH) com sonda genômica *P. aduncum* + *P. hispidinervum* (A); canal isolado da sonda genômica *P. aduncum* (B) e *P. hispidinervum* (C).



5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização cariotípica e tamanho do genoma

Características citogenéticas das espécies *P. aduncum* e *P. hispidinervum* já foram estudadas por Nunes et al. (2007) e Goulart (2011), onde foram encontrados $2n = 24$, $x = 12$ e $2n = 26$, $x = 13$, respectivamente. Os dados do presente trabalho concordam com Goulart (2011), apresentando $2n = 26$, $x = 13$, que confirmou a o número básico $x = 13$ pela formação de treze bivalentes durante a análise da diacinese na meiose. Concorda também com a maioria dos estudos citogenéticos no gênero *Piper*, que reportam o número $x = 13$ como número básico do gênero. A confirmação de $2n=26$ para as três espécies leva à hipótese de que a contagem de 24 cromossomos por Nunes et al (2007) tenha sido equivocada em decorrência do alto grau de condensação e pouca individualização dos cromossomos retratados nas imagens da publicação.

Há grande divergência entre o número somático e número básico para as espécies de *Piper*. Alguns autores descrevem o número básico como $x = 12$ (JOHANSEN, 1931; TIJO, 1948; YOSHIDA, 1960; JOSE & SHARMMA, 1985; VIJISTELLA & SUBRAMANIAN, 1985; NUNES et al. 2007) outros como $x = 13$ (SHARMA, 1959; MARTIN & GREGORY, 1962; MATHEW, 1973;ONO, 1975; BEDI et al., 1981; SAMPATHKUMAR & NAVANEETHAN, 1981; SAMUEL & BAVAPPA, 1981; JOSE & SHARMMA, 1985; JOSEPH, 1999), ocorrendo até casos de $x = 8$ (SHARMA & BHATTACHARYYA, 1959; DASGUPTA & DATTA, 1976; VIJISTELLA & SUBRAMANIAN, 1985). Quanto ao número de cromossomos a variação é maior ainda indo de 24 em *P. subpeltatum*, *P. longum*, *P. futokazura*, *P. cubeba*, a 195 cromossomos, em *P. betle* (SHARMA; BHATTACHARYYA, 1959; SMITH, 1966; DASGUPTA; DATTA, 1976; BAI; SUBRAMANIAN, 1985; SAMUEL; MORAWETZ, 1989; NUNES et al., 2007). Essa variação de número cromossômico se dá pela ocorrência de vários níveis de ploidia nas espécies, $2n$, $3n$, $4n$, $6n$, $8n$, $10n$.

O tamanho e a morfologia dos cromossomos também foram descritos pelas autoras anteriores. Nunes et al. (2007) obtiveram o comprimento médio dos cromossomos para *P. aduncum* e *P. hispidinervum* de 1,32 e 1,38 μm , respectivamente, e ambas as espécies com fórmulas cariotípica de $12m$, não foram observadas constrições secundárias ou terciárias no trabalho, provavelmente devido ao alto nível de condensação cromossômica. Goulart (2011) obteve o comprimento médio dos cromossomos para *P. aduncum* e *P. hispidinervum* 1,94 e 1,74 μm , respectivamente, e as espécies diferiram quanto a fórmula cariotípica, *P. aduncum* com $1m + 12sm$ e *P. hispidinervum* $4m + 9sm$, foi observada uma constrição secundaria no par

cromossômico 5 de *P. aduncum*, porém não foram identificadas constrições terciárias. No presente trabalho, foram encontradas médias cromossômicas maiores quando comparadas com ambas as autoras, *P. aduncum* com 2,09 μm e *P. hispidinervum* com 2,42 μm . Essa diferença pode ser explicada pelo padrão de condensação das metáfases utilizadas para as mensurações. Nunes et al. (2007) utilizou como bloqueador colchicina 0,01%, durante 4 h, Goulart (2011) e o presente trabalho utilizaram 8-hidroxiquinoleína 2 mM, durante 3 h. A diferença de bloqueadores, que possuem diferentes formas de ação e de tempo de bloqueio geram níveis de condensação cromossômica diferentes, alterando os resultados. Enquanto Goulart (2011) e o presente trabalho possuem médias cromossômicas de *P. hispidinervum* maior que *P. aduncum*, o trabalho de Nunes et al. (2007) possui a média de *P. aduncum* maior que *P. hispidinervum*. Outros trabalhos também relatam a ocorrência de cromossomos pequenos em espécies de *Piper*, apesar de haver variação nos tamanhos médios dos cromossomos (DASGRUPTA; DATTA, 1976; JOSEPH; JOSEPH; JOSE, 1999; JOSE; SHARMMA, 1985; NUNES et al., 2007; SAMUEL; MORAWETZ, 1989; SHARMA; BHATTACHARYYA, 1959).

A fórmula cariotípica para *P. aduncum* e *P. hispidinervum* obtida de acordo com critérios de Levan et al. (1964) é 13m e 11m + 2sm, respectivamente. Nunes et al. (2007), usando esse mesmo critério, classificaram todos os cromossomos das duas espécies em metacêntricos. Goulart (2011) utilizou a classificação de Guerra (1986) e descreveu fórmulas cariotípicas diferentes: 1m + 12sm para *P. aduncum* e 4m + 9sm para *P. hispidinervum*. Os dados do presente trabalho quando classificados da mesma forma obtiveram fórmula cariotípica 10m + 3sm e 7m + 6sm. Samuel e Morawetz (1989) identificaram, em nove espécies de *Piper* estudadas, cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, mas sem fornecer informações mais detalhadas do kariograma. Resultados semelhantes foram descritos para *P. colubrinum* ($2n = 13$), *P. magnificum* ($2n = 26$) e *P. nigrum* ($2n = 52$) que apresentaram cromossomos metacêntricos a submetacêntricos (JOSEPH, 1999). Essas diferenças nas fórmulas cariotípicas também podem estar relacionadas com o padrão de condensação dos cromossomos, gerada pelos diferentes bloqueadores e tempos de bloqueios usados.

A descrição do complemento cromossômico de *P. affinis hispidinervum* é inédita. A espécie apresentou o mesmo número cromossômico de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* ($2n = 26$) e fórmula cariotípica 12m + 1sm. Os tamanhos cromossômicos foram mais similares aos de *Piper hispidinervum*, de cuja espécie não se diferenciou com relação ao comprimento do complemento haploide, sendo as duas com tamanho superior ao de *P. aduncum*.

As três espécies possuem no cromossomo 1 duas constrições, uma constrição primária (centrômero) e uma constrição terciária, sem função conhecida, que dividem o cromossomo em

três segmentos. Essa morfologia do cromossomo 1, possuindo a constrição terciária, já foi descrito na família Piperaceae em diversas espécies do gênero *Piper* e *Peperomia*: *P. betle*, *P. cubeba*, *P. longum*, *P. magniflucum*, *P. nigrum*, *Pep. argyreia*, *Pep. metallica*, *Pep. obtusifolia*, *Pep. pelucida*, *Pep. magnoliaefolia* e *Pep. polybotrya* (SHARMA; BHATTACHARYYA, 1959; DASGUPTA; DATTA, 1976; JOSE; SHARMA, 1985; JOSE; THOPPIL; MATHEW, 1992).

No cromossomo 4 ocorre uma constrição secundária heteromórfica nos cromossomos homólogos na região proximal, formando um satélite terminal linear no cromossomo, satélite que tem a forma de um segmento cromossômico longo (HIREMATH; CHINNAPPA, 2015). A constrição secundária formando um satélite já foi descrito em *Pep. argyreia*, *P. betle*, *P. nigrum* e *P. longum* (DASGUPTA; DATTA, 1976).

Associado às características cariotípicas, o conhecimento da quantidade de DNA nuclear pode fornecer informações relevantes para o entendimento da evolução cariotípica e para a taxonomia. A quantificação de DNA para espécies de *Piper* já havia sido realizada por Samuel, Smith e Bennett (1986). Os autores analisaram nove espécies de *Piper* e verificaram uma variação no valor C nas espécies diploides de 1,215 a 2,11 pg de DNA. Por meio de citometria de fluxo, a determinação do valor C em *P. aduncum* (1,03 pg), *P. hispidinervum* (1,07 pg) e *P. affinis hispidinervum* (0,995 pg), valores próximos aos descritos por Goulart (2011) em *P. aduncum* (1,44 pg) e *P. hispidinervum* (1,05 pg). Apesar do valor C não diferir entre as espécies, o comprimento total do complemento haploide difere. O tamanho cromossômico de *P. affinis hispidinervum* ser maior entre as três espécies, ela é também a com a menor quantidade de DNA (0,995 pg). Esse dado pode parecer contraditório, porém pode ser explicado pelo fato de que tamanhos cromossômicos são influenciados pelo grau de condensação, enquanto que a citometria de fluxo é uma medida direta da quantidade de DNA nuclear presente na célula (PEÑA; SÁNCHEZ-MOREIRAS, 2018).

No presente trabalho, o bandeamento DAPI revelou que nos cromossomos das três espécies não foram evidenciados blocos heterocromáticos ricos em adenina e timina, uma vez que a coloração de todos os cromossomos se deu de forma uniforme. O bandeamento CMA revelou uma banda CMA⁺, rica em citosina e guanina, na região proximal do cromossomo 4, coincidente com a constrição secundária, para as três espécies. A variabilidade de bandeamento entre cariótipos é devido a diferenças no genoma, quanto mais distantes geneticamente as espécies, maior chance de variabilidade das marcas. Essa similaridade no padrão de bandeamento é devido à proximidade genética das espécies e à taxa de evolução cariotípica ser próxima, significando que as espécies estão evoluindo em conjunto, não gerando variabilidade

entre as marcas. Somente um estudo utilizando bandeamento CMA/DAPI no gênero *Piper* foi realizado anteriormente. Foysool et al. (2019) relataram diferentes padrões de bandeamento CMA⁺ e DAPI⁺ baseados em número, localização e tamanho de bandas em três espécies de *Piper* nativas de Bangladesh, *P. betle* ($2n = 68$), *P. longum* ($2n = 48$), e *P. retrofractum* ($2n = 72$).

O número e a localização dos locos de DNAr 5S e 45S, descritos pela primeira vez para essas espécies de *Piper* nesse trabalho, podem contribuir para a diferenciação de espécies e inferências quanto a sua filogenia (ROA; GUERRA, 2012). Foi identificada uma marca DNAr 5S proximal no cromossomo 7 e uma marca DNAr 45S proximal com heteromorfismo no cromossomo 4, não havendo diferença no número ou posição de sinais de DNAr nas três espécies. O DNAr 45S se localiza com a banda CMA⁺ na constrição secundária do par cromossômico 4 nas três espécies. Guerra (2000) mostrou que sítios de DNAr 45S, foram preferencialmente distribuídos nos braços curtos e na região subterminal na maioria das espécies de plantas e animais. Em angiospermas, 69,9% dos sítios de DNAr se localizam no braço curto e 50,1% dos sítios ocupam preferencialmente a posição terminal dos cromossomos, tanto em cariótipos com sítio único (36,8%) quanto em cariótipos com múltiplos sítios (52,0%), parecendo haver uma forte seleção positiva favorecendo a localização dos sítios de DNAr 45S na região terminal (ROA; GUERRA, 2012). Dessa forma, a localização proximal do sítio de r DNA 45S em *Piper* é uma posição incomum em angiospermas.

5.2 Afinidade genômica por GISH

As análises da GISH em *Piper* permitiram detectar e descrever o padrão de hibridização das sondas de DNAg das espécies *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum* em GISH recíprocas. A partir disso, os padrões de hibridização nos cromossomos foram classificados como região centromérica, proximal, intersticial-proximal, intersticial-terminal, terminal, braço completo.

A hibridização do DNAg de uma espécie em seu próprio genoma não gerou 100% de hibridização. Isso ocorre porque o DNA repetitivo nas espécies não está distribuído homogeneamente ao longo os cromossomos e sim concentrado em determinadas áreas, onde as sondas contendo o DNAg tendem a hibridizar. Isso pode sugerir uma concentração muito alta de diferentes famílias de DNA repetitivo nas regiões centroméricas/pericentroméricas e proximais, enquanto que o resto do cromossomo não hibridiza distintamente com a sonda

genômica pois os blocos de DNA repetitivo podem não ser grandes o suficiente para gerar sinal visível (MALUSZYNSKA; HASTEROK, 2005).

Em todas as espécies o padrão de hibridização centromérico/pericentromérico, proximal teve predominância, abrangendo 10 dos 13 cromossomos do complemento. Com a GISH, tem sido observado que a marcação preferencial das regiões centromérica e pericentromérica é observada até mesmo em espécies com genomas pequenos, que possuem uma proporção relativamente baixa de famílias de DNA repetitivo, como em *Oryza* (LI et al., 2001), *Brachypodium* (JENKINS et al., 2004), *Brassica* (MALUSZYNSKA; HASTEROK, 2005) e *Hibiscus* (LAERE et al., 2010). Tais resultados indicam a homologia dos *repeats* da região centromérica entre as espécies e reforça a relação de parentesco. Outros estudos indicaram a alta conservação dessas sequências entre diferentes gêneros da família Poaceae, tais como *Secale*, *Hordeum*, *Festuca*, *Semiarundinaria*, *Arundo* e *Zea* (BELYAYEV; RASKINA; NEVO, 2001).

Dois pares cromossômicos, 8 e 10, possuem marcações GISH+ em todo braço curto e na região intersticial-proximal do braço longo, em todas as hibridizações recíprocas nas três espécies. A grande proporção de hibridização nesses cromossomos se deve ao fato de que a maior porção do genoma de plantas (e eucariotos em geral) é formada por DNA repetitivo. Em Poaceae essas sequências podem compor até 85% do genoma (FLAVELL et al., 1993; SCHNABLE et al., 2009; LING et al., 2013). No cromossomo 3 foram observadas marcações GISH+ nas regiões intersticiais-terminais, em todas as hibridizações recíprocas nas três espécies. Apesar de ser uma minoria nessa espécie isso ocorre, pois, essas regiões são compostas por DNA repetitivo e são consideradas altamente conservadas em plantas (WATSON; RIHA, 2010; ROA; GUERRA, 2015).

Apesar de o padrão de hibridização ser conservado entre as espécies, a taxa de hibridização entre sondas e genomas nas diferentes espécies foram diferentes. Essa diferenciação de taxa de hibridização ocorre por meio da diferenciação em grande escala no genoma (passível de ser observada em nível cromossômico) da frequência das várias classes de DNA repetitivo (LÓPEZ-FLORES; GARRIDO-RAMOS, 2012; BISCOTTI; OLMO; HESLOP-HARRISON, 2015). Nesse contexto, é possível que *P. hispidinervum* possua a maior parte dos repeats que estão presentes em larga escala em *P. aduncum*, mas que *P. aduncum* tenha uma variedade maior que não está representada no genoma de *P. hispidinervum*. Quando a sonda genômica de *P. affinis hispidinervum* foi hibridizada com os genomas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum*, houve maior taxa de hibridização no genoma de *P. aduncum* do que no genoma de *P. hispidinervum*, indicando que *P. aduncum* possua a maior parte dos *repeats* que

estão presentes em larga escala em *P. affinis hispidinervum*. O mesmo ocorre para *P. affinis hispidinervum*, que quando hibridizada com sondas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* obteve diferentes níveis de hibridização, indicando que *P. aduncum* possui maior partes dos *repeats* que estão presentes no genoma em *P. affinis hispidinervum*, e *P. hispidinervum* possui menor parte dos *repeats* pois obteve menor taxa de hibridização.

A hibridização simultânea das sondas genômicas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* no genoma de *P. affinis hispidinervum* foi realizada utilizando as duas sondas competindo entre si. Nos experimentos de GISH, um DNA competidor marcado pode ser utilizado para suprimir a hibridação da sonda com sequências repetitivas comuns (KATO et al., 2005). Markova et al. (2007) realizaram experimentos utilizando bloqueio em técnicas de GISH, e revelaram que, se duas sondas genômicas são usadas simultaneamente para GISH, a sonda que é totalmente homóloga aos cromossomos do respectivo genitor funciona como um DNA supressor. A técnica de GISH quando realizada usando duas sondas genômicas diferentes simultaneamente, não só fornece alta resolução na discriminação entre os cromossomos de diferentes genomas em uma espécie aloploide, mas também oferece uma oportunidade para estudar o grau de diferenciação entre os dois genomas. Mesmo com baixo nível de estrigência, a GISH multicolorida produz um ótimo resultado. Aumentar a rigidez da estrigência aumenta ainda mais o poder da técnica (LI et al., 2001).

Como resultado do presente trabalho, a hibridização simultânea de sondas genômicas de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* no genoma de *P. affinis hispidinervum* gerou taxas e padrões de hibridização similares, com pequenas diferenças nas taxas de hibridização gerada por frequência de *repeats* específicos de cada espécie. *P. aduncum* com maior taxa que *P. hispidinervum*, demonstrando que *P. aduncum* possui maior amplificação de *repeats* com *P. affinis hispidinervum*, ou seja, possui famílias de *repeats* que são exclusivas de *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum*, a maior parte das hibridizações gerou sobreposição das sondas (amarelo), indicando que são iguais, porém é possível visualizar nas extremidades sutis seções marcadas em vermelho que correspondem à sonda genômica de *P. aduncum* e em verde que correspondem à *P. hispidinervum*, sendo que existem mais seções em vermelho que em verde, confirmando a existência da maior homologia de *P. aduncum* ao genoma de *P. affinis hispidinervum*.

Os resultados da GISH no presente trabalho são contrários aos resultados dos experimentos de Wadt et al. (2004), que por meio de análise de diversidade genética do Banco Ativo de Germoplasma de *Piper* da Embrapa Acre, utilizando marcadores moleculares RAPD, consideraram *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum* mais próximas, enquanto que a

similaridade genômica indica maior similaridade entre *P. aduncum* e *P. affinis hispidinervum*. Essa diferença entre os resultados pode ser gerada pois marcadores moleculares RAPD geram bandas por meio da amplificação aleatória do genoma. Esse tipo de marcador também é dominante e por isso não é capaz de diferenciar homozigotos dominantes e heterozigotos, por esse motivo, o polimorfismo é subestimado como mostrado em estudos com bancos germoplasma de soja (POWELL et al., 1996), batata (MCGREGOR et al., 2000) e capim-dos-pomares (COSTA et al., 2016), por meio da comparação de vários tipos de marcadores moleculares. Em todos os estudos, os marcadores RAPD obtinham baixa reprodutibilidade, geravam porcentagens de polimorfismo menores quando comparadas com os outros marcadores estudados e, por vezes, geravam árvores filogenéticas diferentes. Porém o principal motivo é o estudo de diferentes partes do genoma, o RAPD amplifica de forma aleatória todo o genoma, enquanto a técnica de GISH mostra a fração repetitiva em comum por meio da afinidade entre os genomas da sonda genômica e da metáfase.

As três espécies estudadas são muito similares citogeneticamente por possuírem o mesmo número cromossômico, tamanho e morfologia cromossômica e quantidade de DNA nuclear semelhantes, padrão de bandeamento CMA/DAPI e número e posição de sinais DNAr 5S e 45S conservados. Os padrões e taxas de hibridização resultantes da GISH foram muito similares, demonstrando que se tratam de espécies muito próximas geneticamente, não sendo possível confirmar a hipótese de que *P. affinis hispidinervum* seja um híbrido entre *P. aduncum* e *P. hispidinervum*. Por isso, não foi possível distinguir as espécies do ponto de vista cariotípico, sendo possível que sejam somente uma espécie composta por três quimiotipos que produzem compostos diferentes em seus óleos essenciais devido aos seus diferentes locais de origem.

6 CONCLUSÃO

Do ponto de vista cariotípico, os táxons *P. aduncum*, *P. hispidinervum* e *P. affinis hispidinervum* são muito similares não sendo possível uma separação clara entre elas.

REFERÊNCIAS

AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacog**, n 17: 114-140, 2007.

AMORIM, M.F.D. et al. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatites. Agra. **Rev Bras Farmacog**, n 17: 448-454, 2007.

BAI, G. V. S.; SUBRAMANIAN, D. Cytotaxonomical studies of south indian Piperaceae. **Citologia**, p. 583–592, 1985.

BARRESE, C. **Fenologia de plantas do gênero *Piper* (Linnaeus, 1737) (Piperales: Piperaceae): implicações em quiropteroecoria**, 2005.

BEDI, Y. S.; BIR, S. S.; GILL, B. S. In Chromosome number reports LXXII. **Taxon** 30: 153, 1981.

BELYAYEV, A.; RASKINA, O.; NEVO, E. Chromosomal distribution of reverse transcriptase-containing retroelements in two Triticeae species. **Chromosome Research**, v. 9, n. 2, p. 129–136, 2001.

BISCOTTI, M.A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON, J. S. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 415–420. Arcona, 2015.

BIZZO, H. R. et al. Sarisan from leaves of *Piper affinis hispidinervum* C . DC. **Flavour and Fragrance journal**, p. 113–115, 2001.

BRANDÃO, M.G.L.; COSENZA, G.P.; MOREIRA, R.A.; MONTE-MOR, R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacog**, n 16: 408-420, 2006.

BRANDÃO, M.G.L.; ZANETTI, N.N.S.; OLIVEIRA, G.R.R.; GOULART, L.O.; MONTE-MOR, R.L.M. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacog**, n 18: 127-134, 2008.

COSTA, R. et al. Comparison of RAPD , ISSR , and AFLP molecular markers to reveal and classify Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L .) germplasm variations. **PLoS ONE**, p. 1–15, 2016.

DASGUPTA, A.; DATTA, P. C. Cytotaxonomy Piperaceae. **Cytologia**, v. 4, p. 697–706, 1976.

DOUSSEAU, S. Propagação, características fotossintéticas, estruturais, fitoquímicas e crescimento inicial de *Piper aduncum* L. (piperaceae). **Dissertação**, p. 140, 2009.

DOBIGNY, G.; DUCROZ, J.F.; ROBINSON, T.J.; VOLOBOUV, V. Cytogenetics and cladistics. **Syst Biol**, 2004.

DOLEZEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **J. Appl. Genet.** 38:285–302, 1997.

DONG, F.; MCGRATH, J.M.; HELGESON, J.P.; JIANG, J.. The genetic identity of alien chromosomes in potato breeding lines revealed by sequential GISH and FISH analyses using chromosome-specific cytogenetic DNA markers. **Genome** 44:729–734,2001.

- ESTRELA, J. L. V. et al. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 217–222, 2006.
- FAZOLIN, M. et al. Toxicidade do Óleo de *Piper aduncum* L. adultos de *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera : Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. June, p. 485–489, 2005.
- FAZOLIN, M. et al. Propriedade inseticida dos óleo essenciais *Piper hispidinervum* C DC; *Piper aduncum* L. e *Tanaeciumnocturnum*, (Bur, Rodr.) Shum, K. Sobre *Tenebrio molitor* L. 1758. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, v. 31, n. 1, p. 113–120, 2007.
- FAZOLIN, M. et al. **Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper affinis hispidinervum* para insetos pragas das culturas do milho e feijão.** [s.l: s.n.].
- FAZOLINI, M. et al. Sinérgico alternativo para o manejo da resistência da lagarta-do-cartucho do milho a piretróides. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 14, n. 3, p. 316–325, 2015.
- FIGUEIRÊDO, F. J. C. et al. secagem da biomassa aérea de pimenta longa sob condições de laboratório e de campo. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2004.
- FIGUEIREDO, R. A. **Fenologia e ecologia da polinização de espécies de piperaceae em mata semidecídua do sudeste brasileiro.** 1997.
- FLAVELL, R. B. et al. Molecular organization of genes and repeats in the large cereal genomes and implications for the isolation of genes by chromosome walking. **Chromosomes today**, p. 199–213, 1993.
- Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 22 Jun. 2019
- FOYSOL, M.A.; BONNA, I.J.; ALAM, S.S.; SULTANA,S.S. Karyotype diversity in three medicinal *Piper* Species in Bangladesh. **Cytologia**, 2019.
- FUKUI, K.;NAKAYAMA, S. **Plant Chromosomes: Laboratory Methods**, CRC Press, 2017.
- GAIA, J. M. D. et al. Similaridade genética de populações naturais de pimenta-de-macaco por análise RAPD. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 1990, p. 686–689, 2004.
- GAIA, J. M. D. et al. Morphologic characterization of spiked pepper's germplasm. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 162–167, 2011.
- GOULART, J. DE C. **Aspectos citogenéticos, morfopolínicos e anatômicos de espécies de *Piper* L. nativas da Amazônia Brasileira.** [s.l: s.n.].
- GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotoxicology: concepts and implications.

Cytogenetic and Genome Research, v. 350, p. 339–350, 2008.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029–1041, 2000.

GUERRA, M. Reviewing the Chromosome Nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética** 9: 741-743, 1986.

GUERRA, M, SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**, 2002.

HIREMATH, S. C.; CHINNAPPA, C. C. **Plant Chromosome Preparations and Staining for Light Microscopic Studies**. [s.l: s.n.].

JARAMILLO, A. M. A. et al. A phylogeny of the tropical genus *Piper* using its and the chloroplast intron psbJ – petA. v. 33, n. 4, p. 647–660, 2008.

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

JARAMILLO, M. A.; MARQUIS, R. Future research in Piper biology. In: **Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution**. [s.l: s.n.]. p. 199–203.

JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S.; ZIMMER, E.A. Phylogenetic relationships of the perianthless piperales: reconstructing the evolution of floral development. **Journal of Plant Sciences**, v.165, n.3, p.403-416, 2004.

JENKINS, G.; MUR, L.; BABLAK, P.; HASTEROK, R.; DRAPER, J. Functional genomics in a new model grass. **Plant Functional Genomics**, 2004.

JIANG, J.; GILL, B.S. Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISW) in plant genome research. **Genome**, 49: 1057- 1068, 2006.

JOSE, J.; SHARMA, A. K. Structure and Behaviour of chromosomes in *Piper* and *Peperomia* (Family Piperaceae). **Cytologia**, n. Erdtman 1952, p. 301–310, 1985.

JOSE, J.; THOPPIL, J. E.; MATHEW, L. Chromosome complement *Peperomia* analysis in five species of Ruiz and Pav. **Cytologia**, v. 57, p. 227–229, 1992.

JOSEPH, A.; JOSEPH, R.; JOSE, J. Karyomorphometrical analysis in *Piper* species usinsg image analysis system. **Cytobios**, v. 97, n. 384, p. 7- 11, 1999.

JUNIOR, F. P. et al. Germination and vigor of long-pepper seeds (*Piper hispidinervum*) as a function of temperature and light. **Revista Ciência Agronômica**, p. 325–333, 2013.

KATO, A. et al. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 2, p. 148–154, 2005.

KATO, M.J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure and Applied Chemistry**, v.79, n.4, p.529-538, 2007.

LAERE, K. VAN et al. Application of GISH to characterize woody ornamental hybrids with small genomes and chromosomes. **Plant Breeding**, v. 447, p. 442–447, 2010.

LENGEROVA, M.; KEJNOVSKY, E.; HOBZA, R.; MACAS, J.; GRANT, S.R.; VYSKOT, B. Multicolor FISH mapping of the dioecious model plant, *Silene latifolia*. **Theor. Appl. Genet.** 108, 2004.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 1964.

LI, B. et al. Identification of genome constitution of *Oryza malampuzhaensis*, *O. minuta*, and *O. punctata* by multicolor genomic in situ hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, p. 204–211, 2001.

LIMA, L. M. Safrole and the versatility of a natural biophore. **Revista Virtual de Quimica**, v. 7, n. 2, p. 495–538, 2015.

LING, H.Q. et al. Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. **Nature**, v. 496, n. 7443, p. 87–90, 2013.

LÓPEZ-FLORES, I.; GARRIDO-RAMOS, M.A. The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. **Repetitive DNA**, v. 7, p. 1–28, 2012.

LUNZ, A.M.P.; OLIVEIRA, M.N. de; PEREIRA, J.B.M.; SOUSA, M.M. de M. Informações gerais sobre a pimenta longa. **Rio Branco: EMBRAPA-CPAF/AC**, 1996.

MACIEL, S. D. A. et al. Anatomia comparada de folhas de pimenta longa (**Piper hispidinervum** C. DC.) e pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.) cultivadas in vitro, ex vitro e in vivo. **Revista Biotemas**, v. 27, n. 4, p. 11–19, 2014.

MALUSZYNSKA, J.; HASTEROK, R. Identification of individual chromosomes and parental genomes in *Brassica juncea* using GISH and FISH. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 314, p. 310–314, 2005.

MARKOVA, M. et al. An interspecific hybrid as a tool to study phylogenetic relationships in plants using the GISH technique. **Chromosome Research**, p. 1051–1059, 2007.

MARTIN, F. W. & GREGORY, L. E. Mode of pollination and factors affecting fruit set in *P. nigrum* L. in Puerto Rico. **Crop Sci.** 2: 295-299, 1962.

MASUDA, T. et al. Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3227–3228, 1991.

MATHEW, P. M. Studies on Piperaceae. **J. Ind. Bot. Soc.** 37: 153-171. 1973.

MAUGINI, E. Ricerche cito-embryologiche sul Genere Piper. **Caryologia** 3: 221-233. 1950.

MCGREGOR, C. E. et al. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm.

Euphytica, p. 135–144, 2000.

NASCIMENTO, F. R. et al. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, p. 503–508, 2008.

NEGREIROS, J. R. DA S.; MIQUELONI, D. P. Teor de dilapiol em função do tipo de biomassa aérea em populações de *Piper aduncum*. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, p. 73–79, 2013a.

NEGREIROS, J. R. DA S.; MIQUELONI, D. P. Divergência genética de populações de *Piper hispidinervum*. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 2013, p. 209–217, 2013b.

NEGREIROS, J. R. DA S.; MIQUELONI, D. P.; ÁLVARES, V. DE S. Comportamento do composto majoritário de óleos essenciais de espécies de *Piper* da Amazônia sob armazenamento. **Caderno de Ciências Agrárias**, p. 17–22, 2017.

NEGREIROS, J. R. DA S.; MIQUELONI, D. P.; CARTAXO, C. B. DA C. Yield of essential oil and safrole content based on fresh and dry biomass of long pepper in the Brazilian Amazon. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 1, p. 75–80, 2015.

NEGREIROS, J. R. S.; MIQUELONI, D. P. Morphological and phytochemical characterization of *Piper hispidinervum* DC. and *Piper aduncum* L. populations in the state of Acre. **Revista Ceres**, v. 62, n. 1, p. 78–86, 2015.

NUNES, J. D. et al. Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 42, n. 7, p. 1049–1052, 2007.

OBRZUT, V. V.; CARVALHO, R. I. N. DE. Utilização do óleo essencial de sassafrás para o manejo da mariposa oriental em pessegueiro. **Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, n. 1, p. 65–71, 2011.

OKADA, H. Karyomorphology and relationships in some genera of Saururaceae and Piperaceae. **Bot. Mag.** 1986.

ONO, M. In Chromosome numbers of some endemic species of the Bonin Islands 1. **Bot. Mag.** 1975.

PEÑA, T. C. DE LA; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. **Advances in plant ecophysiology techniques**. [s.l: s.n.].

POWELL, W. et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, p. 225–238, 1996.

ROA, F.; GUERRA, M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants : Structural and evolutionary implications. **BMC Evolutionary Biology**, 2012.

ROA, F.; GUERRA, M. Non-random distribution of 5s rDNA sites and its association with 45S rDNA in plant chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 3, p. 243–249, 2015.

ROCHA, S. F. R.; MING, L. C. *Piper hispidinervum*: a sustainable source of safrole. **Evaluation**, p. 479–481, 1999.

SALES, V. DOS S. et al. Modulação in vitro da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 22, n. 1, p. 1–10, 2017.

SAMPATHKUMAR, R. & NAVANEETHAN, N. In Chromosome number reports LXXII. **Taxon**, 1981.

SAMUEL, M. R. A.; BAVAPPA, K. V. A. Chromosome numbers in the genus *Piper*. **Current Science**, 50, n. 4, p. 197-198, 1981.

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

SAMUEL, R.; MORAWETZ, W. Chromosomal evolution within Piperaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 166, p. 105–117, 1989.

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

SANGWAN, N.S., FAROOQI, A.H.A., SHABIH, F., SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regul.**, v. 34, n. 1, p. 3–21, 2001.

SCHWARZACHER, T.; LEITCH, A.R.; BENNETT, M.D.; HESLOP-HARRISON, J.S. In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. **Annals of Botany**, 1989.

SHAKOORI, A. R. **Foreword**. [s.l: s.n.].

SHARMA, A. K.; BHATTACHARYYA, N. K. Chromosome studies on two genera of the family Piperaceae. **Genetica**, v. 29, p. 256–289, 1959.

SCHNABLE, P.S. et al. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. **Science**, v. 326, n. 5956, p. 1112–1115, 2009.

SILVA, A; OLIVEIRA, M. Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre. **Embrapa Acre. Boletim de Pesquisa**, n. 23, p. 13, 2000a.

SILVA, A. C. P. R. DA; OLIVEIRA, M. N. DE. **pProdução e dispersão de sementes em pimenta longa (*Piper hispidinervum*)**. [s.l: s.n.].

SIVIERO, A. et al. **Agroecologia no Acre**. [s.l: s.n.].

SMITH, J. B. Chromosome numbers in *Peperomia* Ruiz & Pav . (Piperaceae) and a note on chromosome number of *Piper magnificum* Trelease. **Kew Bulletin**, v. 20, n. 3, p. 521–526, 1966.

SOUSA, P. J. C. et al. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L.

Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 18, n. 2, p. 217–221, 2008.

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

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

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**, 1971.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, p. 1–20, 2016.

The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).

TIJO, J.H.; LEVAN, A. The chromosome number in man. **Hereditas**, 1956.

VIJISTELLA BAI, G.; SUBRAMANIAN, D. Cytochemical studies of South Indian Piperaceae. **Cytologia** 50: 583-592 1985.

VILLEGA, M. et al. Isolation of the antifungal compounds falcarindiol and sarisan from *Heteromorpha trifoliata* H3C = JH2 Demethylpeceyline, a new dimeric indoline alkaloid. **Planta medica**, p. 36–37, 1988.

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

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

WATSON, J.M.; RIHA, K. Comparative biology of telomeres: Where plants stand. **FEBS Letters**, v. 584, n. 17, p. 3752–3759, 2010.

YOSHIDA, O. Embryologische Studien über Ordnung Piperales IV. Embryologie von *Piper futokadsura* Sieb. & Zucc. J. Coll. **Arts & Sc.** 3: 155-162, 1960.

YU, Y.A.N. et al. Karyotype Software. **Taxon**. v. 65. p. 586-592, 2016.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil I: *Piper* -Group I, II, III, IV. **Hoehnea**, 1972.

ZACARONI, L. M. et al. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 193–197, 2009.

