



**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA
E BIOQUÍMICA DE CALOS DE
PIMENTA LONGA**
(Piper hispidinervium Candolle, De Candolle)

EDSON JOSÉ ARTIAGA DE SANTIAGO

2003

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA
E BIOQUÍMICA DE CALOS DE
PIMENTA LONGA
(*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**

EDSON JOSÉ ARTIAGA DE SANTIAGO

2003

*O que ontem era avanço tecnológico,
Hoje não é mais.
O que ontem era o fato que poucos conheciam,
Hoje não é mais.
O que ontem era urgente,
Hoje não é mais,
Hoje é sempre o começo
do amanhã.*

“O grande desafio da pesquisa, ao lado de contribuir para a questão social, é assegurar ao país o acesso ao conhecimento e às tecnologias mais avançadas que vão mudar as vantagens competitivas nas próximas décadas”.

ALBERTO DUQUE PORTUGAL

EDSON JOSÉ ARTIAGA DE SANTIAGO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E
BIOQUÍMICA DE CALOS DE
PIMENTA LONGA
(*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Renato Paiva, PhD.

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003**

**Ficha catalográfica preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Santiago, Edson José Artiaga de

Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa
(*Piper hispidinervium* Candolle, DeCandolle) / Edson José Artiaga de
Santiago. -- Lavras : UFLA, 2003.

183 p. : il.

Orientador: Renato Paiva.
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Pimenta longa. 2. Calogenese. 3. Citologia. 4. Bioquímica.
5. Anatomia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.883925
-635.643

EDSON JOSÉ ARTIAGA DE SANTIAGO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E
BIOQUÍMICA DE CALOS DE
PIMENTA LONGA
(*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 27 de junho de 2003.

Pesq. Dr. Marcelo Murad Magalhães	UFLA/CNPq-Projeto Genoma.
Prof ^ª . Dra. Lisete Chamma Davide	UFLA/DBI.
Prof ^ª . Dra. Janice Guedes de Carvalho	UFLA/DCS.
Pesq ^ª . Maria de Lourdes Reis Duarte, PhD.	EMBRAPA Amazônia Oriental.

Prof. Renato Paiva, PhD. - UFLA
(Orientador)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2003**

“DEUS

é o invisível evidente” (Victor Hugo).

“Ouve o conselho e recebe a correção,

para que sejas sábio nos teus últimos dias” (Provérbio 19:20).

A toda minha família,

em especial aos meus pais,

Benedito Rodrigues de Santiago (in memoriam) e

Adalziza Artiaga de Santiago,

DEDICO.

À minha esposa, **Auxiliadora Santiago,**

e aos meus filhos **Elayne, Elyene, Euler e Elyne,**

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, a JESUS CRISTO e a NOSSA SENHORA, pela dádiva de uma vida feliz e cheia de realizações.

A meu pai Benedito Rodrigues de Santiago (em memória), exemplo de humildade e otimismo e, à minha mãe Adalziza Artiaga de Santiago, exemplo de garra, fé e determinação.

Aos meus irmãos Edvaldo, Edgar, Eleide, Eurico, Evânia, Ailton, Edilena e Eduardo que sempre me incentivaram com muito amor e compreensão.

À minha esposa, Auxiliadora Santiago, pela presença constante, com amor, carinho, fidelidade e grande colaboração em todas as fases de minha formação profissional.

Aos meus filhos Elayne, Elyene, Euler e Elyne pelo carinho, paciência e compreensão.

A EMBRAPA, em especial ao Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental, pela liberação para a realização do curso, assim como pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional e suporte financeiro.

À Universidade Federal de Lavras, através do Departamento de Agricultura e Biologia, pelo aceite e inúmeras oportunidades de aprendizagens oferecidas na formação profissionais, assim como pelo espaço cedido para a realização das pesquisas nos Laboratórios de Propagação de Plantas, Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, Citogenética, Ciências dos Alimentos e Anatomia e Morfologia de Plantas da Universidade Federal de Lavras.

Ao professor RENATO PAIVA, como companheiro, amigo e mestre, pela valiosa orientação, apoio, convívio agradável e amizade antes e depois do curso, que pacientemente, a mim dedicou especial atenção.

Aos professores, Marcelo Murad Magalhães, Janice Guedes de Carvalho, Lisete Chamma Davide, Geovana Augusta Torres, José Donizeti Alves, Daniel Melo de Castro e Manuel Losada Gavilanes, pelas valiosas orientações na condução deste trabalho, e a todos os professores da Universidade Federal de Lavras que enriqueceram os meus saber.

Aos professores Luiz Édson Mota de Oliveira e Samuel Pereira de Carvalho pela compreensão, apoio, confiança e incentivo, principalmente, nas dificuldades.

À pesquisadora MARIA DE LOURDES REIS DUARTE, PhD, da EMBRAPA Amazônia Oriental, pelo exemplo de vida enfocando apoio e confiança na oportunidade desta realização, como conselheira acadêmica, e pelas sugestões durante a participação na Banca Examinadora.

Ao pesquisador MARCELO MURAD MAGALHÃES pela amizade, convívio, companhia constante e orientações incansáveis durante a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores da EMBRAPA Amazônia Oriental, que depositaram confiança na conquista deste treinamento, principalmente o pesquisador José Paulo Chaves.

Aos companheiros da Família ROTARY pelo companheirismo, agradável convívio e incentivo constante durante este curso.

Ao professor Ronaldo Jatene pelo apoio e certeza deste sonho.

Aos casais amigos César e Gabriela, Enilson e Sônia, Ailton e Elaine, Heraclito e Madalena, e aos amigos Leonardo, Paulo César, Marcos Paiva, Paulo Brasil e Luciano Paiva pela amizade, incentivo, agradável convívio e companheirismo nas dificuldades e em todas as ocasiões no decorrer deste curso.

Ao amigo Nonato Batista, funcionário da EMBRAPA Amazônia Oriental, pela ajuda e auxílio na eletrofotomicrografia de varredura e amizade infinita.

A todos os pós-graduandos do Setor de Fisiologia Vegetal e da Universidade Federal de Lavras pelo convívio agradável.

Aos amigos Mauro, Dartagnan, Izonel, Joel, Odorêncio, Evaristo Guerra e Lena, pelo convívio agradável e companheirismo em todos os momentos.

Aos companheiros dos Laboratórios de Propagação de Plantas (Cultura de Tecidos), Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, Citogenética, Ciências dos Alimentos e Anatomia e Morfologia de Plantas da Universidade Federal de Lavras pela ajuda e convívio durante a realização do curso.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho,

meus agradecimentos.

E seja sobre nós a graça do Senhor, nosso DEUS: e confirma sobre nós a obra das nossas mãos; sim, confirma a obra das nossas mãos.
(Salmo 90:17)

BIOGRAFIA DO AUTOR

EDSON JOSÉ ARTIAGA DE SANTIAGO, filho de Benedito Rodrigues de Santiago (in memoriam) e Adalziza Artiaga de Santiago, nasceu em Porto Velho, Rondônia, onde atualmente funciona a EMBRAPA Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia. É Engenheiro Agrônomo, graduado pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará – FCAP em 1985.

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

Realizou treinamentos, dentre outros, em “Manejo de Solos Tropicais”, no Instituto Nacional de Investigação e Promoção Agropecuária – INIPA, patrocinado pela North Caroline State University - NCSU e Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas - IICA, em Yurimaguas, Peru.

Realizou especialização no Centro de Treinamento Agrotécnica de Tsukuba, Japão, patrocinado pela Japan International Cooperation Agency - JICA.

Concluiu o Mestrado em 1999 pela Universidade Federal de Lavras, MG, onde em maio de 1999 iniciou o doutorado em Agronomia/Fitotecnia área de concentração em Biotecnologia de Plantas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURA	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Considerações gerais.....	5
2.2 Descrição botânica.....	6
2.3 Características edafoclimáticas e importância econômica da pimenta longa	8
2.4 Importância do safrol na indústria	9
2.5 Cultura de tecidos	10
2.6 Obtenção de plântulas <i>in vitro</i>	11
2.7 Obtenção de calos friáveis.	12
2.8 Análises citológicas e bioquímicas.	13
2.9 Estudos comparativos dos órgãos vegetais.	15
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 2	35
ALTERAÇÕES NO TAMANHO E VIABILIDADE DE CÉLULAS E NOS TEORES DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS E NÃO-ESTRUTURAIS E ELEMENTOS MINERAIS DE CALOS DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> Candolle, De Candolle).....	35
RESUMO	35
ABSTRACT	37
1 INTRODUÇÃO.....	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 Local.	44
2.2 Desinfestação de sementes, semeadura e obtenção do explante.....	44

2.3 Obtenção do meio de cultura para indução de calos friáveis.....	45
2.3.1 Delineamento experimental.....	46
2.3.2 Análises estatísticas.....	47
2.4 Desenvolvimento dos calos.....	47
2.5 Estabelecimento da curva de crescimento.....	48
2.6 Determinação do número, diâmetro e viabilidade de células nos calos.....	48
2.7 Determinação de carboidratos não-estruturais totais e amido.....	50
2.8 Determinação das proteínas.....	51
2.9 Extração e doseamento dos compostos de parede celular.....	52
2.9.1 Doseamento dos açúcares totais não celulósicos.....	53
2.9.2 Substâncias pécnicas.....	53
2.9.3 Hemicelulose.....	54
2.9.4 Celulose.....	55
2.9.5 Determinação das frações de fibras.....	55
2.9.6 Lignina.....	56
2.9.7 Determinação dos elementos minerais.....	57
2.10 Análises estatísticas.....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
3.1 Indução e desenvolvimento de calos friáveis.....	59
3.2 Análise da curva de crescimento médio da matéria seca de calos.....	63
3.3 Análises citológicas.....	67
3.4 Análises bioquímicas.....	73
3.4.1 Carboidratos não-estruturais.....	73
3.4.2 Proteína e amido.....	76
3.4.3 Análises dos compostos de parede celular.....	78
3.4.4 Análises dos elementos minerais.....	85
3.4.4.1 Macronutrientes.....	86
3.4.4.2 Micronutrientes.....	92
4 CONCLUSÕES.....	97
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

CAPÍTULO 3.....	112
-----------------	-----

ESTUDOS ANATÔMICOS DE PLANTAS DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> Candolle, De Candolle) CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> E ACLIMATIZADAS.....	112
---	------------

RESUMO.....	112
ABSTRACT.....	113
1 INTRODUÇÃO.....	114
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	119

2.1 Condições de cultivo.....	119
2.2 Estudos anatômicos.....	119
2.3 Delineamento experimental	122
2.4 Análise estatística.	122
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	123
3.3.1 Descrição anatômica foliar	123
3.3.1.1 Mesofilo	123
3.3.1.2 Epiderme.....	126
3.3.2 Descrição anatômica do caule.....	130
3.3.3 Descrição anatômica da raiz	132
3.4 CONCLUSÕES	134
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135
PERSPECTIVAS PARA O FUTURO	140
ANEXOS	141

LISTA DE ABREVIATURA

ANA: (Ácido α -naftalenoacético).
2,4-D: (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético).
BAP: (6-benzilamonopurina).
CIN: (Cinetina).
TDZ: (Thidiazurum uréia).
BSA: (Bovine serum Albumine).
SDS: (Dodecilsulfato de sódio).
DMSO: (Dimetilsufóxido).
TFA: (Ácido trifloroacético).
EDTA: (Etilenodiamino tetra-acético).
FDA: (Fluoresceine Diacetate).
FDA: (Fibra de detergente ácido).
FDN: (Fibra de detergente neutro).
DECALINA: (Decaidronaftaleno).
CTAB: (Brometo-cetil-trimetillanônico).
DNA: (Ácido desoxirribonucléico).
RNA: (Ácido ribonucléico).
HPLC: (High Performance Liquid Chromatography).
RAPD: (Random amplified polymorph DNA).
PG: (Poligalacturonase).
PME: (Pectinamtilesterase).
AFLP: (Amplified Fragment Length Polymorphism).
pH: (Concentração de hidrogênio).
ATP: (Adenosina trifosfato).
NADP: (Nicotinamida adenosina difosfato).

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2 ALTERAÇÕES NO TAMANHO E VIABILIDADE DE CÉLULAS E NOS TEORES DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS E NÃO-ESTRUTURAIS E ELEMENTOS MINERAIS DE CALOS DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> Candolle, De Candolle).	
TABELA 1 Composição química do meio nutritivo de Murashige & Skoog (1962) e suas respectivas concentrações, utilizadas nos experimentos com pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.	45
TABELA 2 Composição dos meios de cultura utilizados para indução de calos em discos foliares de plântulas de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.	46
TABELA 3 Efeitos de diferentes concentrações entre auxinas e citocinina na indução de calos provenientes de discos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.....	59
CAPÍTULO 3 ESTUDOS ANATÔMICOS DE PLANTAS DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> Candolle, De Candolle) CULTIVADA <i>IN VITRO</i> E ACLIMATIZADA.	
TABELA 1 Características do mesofilo de plantas cultivadas <i>in vitro</i> e aclimatizadas de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.	124
TABELA 2 Quadro de médias para o índice estomático (<i>Ie</i>), obtido na avaliação de folhas de pimenta longa sob diferentes condições de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2002.....	125

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 2 ALTERAÇÕES NO TAMANHO E VIABILIDADE DE CÉLULAS E NOS TEORES DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS E NÃO-ESTRUTURAIS E ELEMENTOS MINERAIS DE CALOS DE PIMENTA LONGA (<i>Piper hispidinervium</i> Candolle, De Candolle).	
FIGURA 1	Peso e aspecto de calos friáveis (VC=Verde Claro, V=Verde, VE=Verde Escuro, MC=Marrom Claro e M=Marrom) formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa em diferentes meios de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2002. 62
FIGURA 2	Curva de crescimento de calos de pimenta longa com base na matéria seca durante 63 dias sob cultivo contínuo. UFLA, Lavras, MG, 2003. 64
FIGURA 3	Crescimento relativo e absoluto de calos formados com base na matéria seca a partir de segmentos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2003. 65
FIGURA 4	Aparência de calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa até 63 dias de cultivo contínuo. UFLA, Lavras, MG, 2003. 66
FIGURA 5	Calos de pimenta longa de coloração verde obtidos de explantes foliares classificados como de alta capacidade de regeneração (ACR). UFLA, Lavras, MG, 2003. 67
FIGURA 6	Calos de pimenta longa de coloração marrom obtidos de explantes foliares classificados como de baixa capacidade de regeneração (BCR). UFLA, Lavras, MG, 2003. 68
FIGURA 7	Relação entre o número, diâmetro e viabilidade de protoplastos de pimenta longa registrada a intervalo semanal, até 63 dias. UFLA, Lavras, MG, 2003. 69
FIGURA 8	Proporções distintas dos diâmetros de protoplastos obtidos de calos de pimenta longa provenientes de explantes foliares. UFLA, Lavras, MG, 2003. 70

FIGURA 9	Viabilidade de protoplastos de alta (ACR) e baixa (BCR) capacidade de regeneração, corados com azul de metileno aos 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2003.	72
FIGURA 10	Teores de açúcares solúveis totais (A), redutores (B) e não-redutores (C) registrados durante o crescimento de calos de pimenta longa com meio de cultura MS enriquecido com 2,4-D e ANA combinado com BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.	74
FIGURA 11	Teores de proteína (A) e amido (B) registrados durante a formação de calos de pimenta longa proveniente de segmentos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.	76
FIGURA 12	Teores de pectina solúvel, insolúvel e total registrados durante o crescimento de calos de pimenta longa, com meio de cultura MS enriquecido com 2,4-D e ANA combinado com BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.	79
FIGURA 13	Teores de celulose (A) e hemicelulose (B) registrados durante o crescimento de calos de pimenta longa com meio de cultura MS enriquecido com 2,4-D e ANA combinado com BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.	82
FIGURA 14	Teores de fibra de detergente ácida (FDA), fibra de detergente neutra (FDN) e lignina em função da formação de calos proveniente de segmentos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.	84
FIGURA 15	Teores de nitrogênio (A), fósforo (B), potássio (C), cálcio (D) e magnésio (E) registrados durante o crescimento de calos de pimenta longa com meio de cultura MS enriquecido com 2,4-D e ANA combinado com BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.	87
FIGURA 16	Teores de cobre (A), manganês (B), zinco (C) e ferro (D) durante o desenvolvimento <i>in vitro</i> de calos proveniente de segmentos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.	93

CAPÍTULO 3 ESTUDOS ANATÔMICOS DE PLANTAS DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle) CULTIVADA *IN VITRO* E ACLIMATIZADA.

FIGURA 1	Fotomicrografias do corte transversal da lâmina foliar de pimenta longa de plântulas aclimatizadas (A) e cultivadas <i>in vitro</i> (B). Detalhe do mesofilo (A ₁ e B ₁); nervura intercostal (A ₂ e B ₂); limbo foliar (A ₃ e B ₃); epiderme adaxial (ead) e abaxial (eab); tricomas tectores (tt); idioblastos oleíferos (io); feixes vasculares (fv). UFLA, Lavras, MG, 2002.	127
FIGURA 2	Eletromicrografias de MEV da borda da lâmina foliar, face adaxial, de pimenta longa em plântulas aclimatizadas (A) e cultivadas <i>in vitro</i> (B); estômatos (es); tricomas tectores (tt); tricomas secretores (ts). EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém, PA, 2002.	129
FIGURA 3	Corte transversal do caule, quinto internódio, de pimenta longa em plântulas aclimatizadas (A) e cultivadas <i>in vitro</i> (B). Idioblasto oleífero (Io); Colênquima (Co); Feixe vascular interno (Fvi); Feixe vascular externo (Fve); Floema (Fl); Xilema (Xi). UFLA, Lavras, MG, 2002.	131
FIGURA 4	Corte transversal da raiz adventícia de pimenta longa em plântulas aclimatizadas (A) e cultivadas <i>in vitro</i> (B). UFLA, Lavras, MG, 2002.	133

RESUMO

SANTIAGO, Edson José Artiaga de. **Caracterização morfológica e bioquímica de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**. 2003. 162 p. Tese (Doutorado em Agronomia / Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A Amazônia, uma das regiões de maior biodiversidade do planeta, abriga inúmeras plantas detentoras de propriedades aromáticas, embora a maioria seja pouco conhecida cientificamente. Dentre essas, destaca-se a pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.), espécie que contém nas folhas e ramos jovens óleos essenciais denominados de safrol. Estudos de espécies vegetais através da organogênese, partindo de uma célula ou tecido, ou ainda através de cultura de protoplastos, tornam-se necessários para conhecer os processos de indução, diferenciação e competência celular, bem como para entender o crescimento desses tecidos e células para que possam ser aplicados eficazmente no processo industrial. Esse trabalho visa a estudos de caracterização citológica, quantificação dos níveis de carboidratos estruturais e não estruturais e minerais durante o desenvolvimento de calos formados a partir de tecidos foliares. Inicialmente adaptou-se uma metodologia para indução de calos utilizando auxinas (ANA e 2,4-D) e citocininas (BAP). A fim de entender melhor o desenvolvimento dessa massa celular, calos com alta (ACR) e baixa (BCR) capacidade de regeneração foram comparados. Os resultados indicaram que o diâmetro médio foi de 25µm e >35µm, respectivamente. A viabilidade dos protoplastos foi diferente entre esses tipos de calos indicando perda com o desenvolvimento. Calos com ACR apresentaram alta solubilização das pectinas, níveis mais elevados de amido, proteínas e hemiceluloses e maior teor de cálcio em relação aos calos com BCR. Essa diferença possivelmente permitir aos calos com ACR uma maior atividade de divisão celular. A manipulação *in vitro* basicamente não causou expressivas alterações nas características anatômicas nas condições avaliadas em relação às plantas aclimatizadas.

* Comitê Orientador: Renato Paiva, PhD (Orientador) - UFLA, Dr. Marcelo Murad Magalhães – UFLA/CNPq-Projeto Genoma.

ABSTRACT

SANTIAGO, Edson José Artiaga de. **Morphological and biochemical callus characterization of long pepper (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**. 2003. 162 p. Thesis (Doctorate in Crop Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The Amazon, one of areas with the highest biodiversity in the planet, has many plants with aromatic properties. Although most are still unknown. Among these, is the long pepper (*Piper hispidinervium* C. DC.), a species that contains in leaves and young branches essential oil denominated saffrole. Organogenesis studies starting with a cell, tissue or protoplast culture needs information regarding the induction process, differentiation and cellular competence, as well as to understand the growth of these tissues and cells that can be applied efficiently, in the industrial process. The objective of this work was to perform the cytological characterization, the quantification of structural and non-structural carbohydrate levels and minerals during the development of callus originated from leaf segments. First, a methodology for callus induction using auxin (NAA and 2,4-D) and cytokinin (BAP) were adapted. In order to better understand the development of this cellular mass callus with high (HRC) and low capacity of regeneration (LRC) were compared. The results indicated that medium diameter was 25µm and higher than 35mM, respectively. The viability of the protoplasts separated these type of callus, and decreased with its development. The callus with HRC presented high solubilization of the pectins and higher levels of calcium in relation to callus with LRC. These differences possibly makes callus with HRC to have a higher activity of cellular division. The *in vitro* manipulation caused no expressive alterations in the evaluated characteristics in relation to acclimatized plants.

* Guidance committee: Renato Paiva, PhD (Major Professor) - UFLA, Dr. Marcelo Murad Magalhães – UFLA/CNPq-Projeto Genoma.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Uma das regiões de maior biodiversidade do planeta, a Amazônia, abriga inúmeras plantas detentoras de propriedades fitoquímicas. A Amazônia apresenta-se como um manancial, devido ao grande número de espécies disponíveis, embora a maioria seja pouco conhecida e ainda não pesquisada. A avaliação agrônômica também é da mais alta relevância em busca da caracterização morfológica e bioquímica, da conservação, da propagação e da utilização como matéria-prima industrial (Santiago, 1999). Num futuro próximo, as plantas dessa região servirão de material para prospecção gênica em larga escala.

Dentre as espécies com propriedades farmacêuticas, destacamos a pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle), de ocorrência natural em áreas de pouso (capoeiras) no estado do Acre, que possui uma flora abundante no cenário nacional, dada a sua localização em uma área de transição entre dois biomas (Peru e Brasil), sendo considerada uma espécie pioneira, despertando interesse na atualidade (Barros & Oliveira, 1997). As folhas e ramos jovens a pimenta longa contêm óleo essencial, apresentando aproximadamente 90 a 94% de safrol, com um rendimento que pode chegar a 4% em relação ao peso fresco das suas folhas e ramos (Pescador et al., 2000). Existe uma grande demanda no mundo por heliotropina e por butóxido de piperonila, os dois principais subprodutos derivados do safrol (Rocha & Ming, 1999).

A descoberta desta nova fonte natural de safrol, não agressiva à natureza, poderá viabilizar o crescimento da demanda e, conseqüentemente, o acréscimo

da produção mundial. Estudos agronômicos e fisiológicos estão em andamento no Centro de Pesquisa Agroflorestal do Acre, Embrapa-Acre, em parceria com a Embrapa Amazônia Oriental, e com suporte financeiro do DFID (Department for International Development), entidade de fomento da Inglaterra que vem patrocinando pesquisas com pimenta longa desde a fase de testes no Museu Paraense Emilio Goeldi (MPEG), a fim de oferecer uma nova alternativa de cultivo e de renda para os pequenos produtores rurais do Estado do Acre.

Diversas estratégias de pesquisa têm sido propostas envolvendo fertilidade do solo, aspectos fitotécnicos, ecofisiológicos e levantamento da entomofauna e identificação de patógenos associados à pimenta longa, reportam Brasil et al. (1998). Wadt (2001) desenvolveu trabalho com pimenta longa, visando um programa de melhoramento e, conhecer a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações nativa no Estado do Acre.

O acelerado processo extrativo das plantas com propriedades fitoterápicas nas áreas de ocorrência natural deve-se à grande demanda pelos alcalóides produzidos por essas espécies. Indústrias de fármacos e cosméticos as têm colocado na linha de frente e explorado de forma extensiva. A implementação dessas indústrias poderá gerar muitos empregos e divisas para a Região Norte. Nessas condições, a regeneração é lenta e o processo de desmatamento tem provocado a diminuição da oferta do produto bruto (raízes, caules e folhas) no mercado industrializador.

Na região Norte, a Embrapa e as Universidades estão desenvolvendo programas que visam o desenvolvimento sustentável das espécies nativas. No entanto, esses estudos ainda possuem um caráter exploratório. Pesquisas em nível celular, tanto para multiplicação e diferenciação de células e tecidos, ainda são escassas e não conclusivas.

A biotecnologia compõe áreas, como a cultura de tecidos vegetais, que é a técnica extremamente versátil na propagação de planta, com maior êxito no

cenário mundial. Como exemplo dessa versatilidade pode-se citar a regeneração de plantas via organogênese ou embriogênese somática partindo de uma célula ou tecido, ou ainda através de cultura de protoplastos.

É de grande importância a adaptação de um sistema de suspensão embriogênica para possibilitar a produção de princípio ativo em escala industrial. No entanto, processos que visam selecionar plantas elites precisam ser otimizados para possibilitar uma seleção precoce do material nativo com alta capacidade embriogênica.

A caracterização citológica de calos durante o desenvolvimento não tem sido feita regularmente em cultura de tecidos, como também o emprego de metodologias para isolar protoplastos, quantificar células viáveis e não viáveis. A grande aplicação dessa metodologia é fornecer informações que, associadas a parâmetros morfológicos e bioquímicos, visam separar as células viáveis e descartar as células não viáveis numa fase inicial do processo de regeneração de plantas elites. Esse processo minimiza os gastos com reagentes químicos e mão-de-obra qualificada, e a massa celular viável selecionada em desenvolvimento teria melhor capacidade de regeneração. Mesmo em países desenvolvidos, essa estratégia integrada da pesquisas ainda é recente. Um dos grupos de pesquisa pioneiro nesse assunto é o do Dr. Gmitter (University of Florida) que tem trabalhado com protoplastos em citros (Grosser & Gmitter Jr., 2000; Tao et al., 2002; Hao, et al., 2002). Um aspecto positivo dessa pesquisa é que abre perspectivas para trabalhos envolvendo marcadores moleculares nas plantas matrizes regeneradas de calos previamente selecionados. No entanto, para a pimenta longa é necessária, inicialmente uma otimização do meio de cultura para a indução de calos friáveis. Paralelamente, a otimização de metodologia para isolamento e quantificação de protoplastos se faz necessária, a fim de avaliar a eficiência dos métodos de indução de calos formados. A caracterização de componentes da parede celular desses calos, bem como dos elementos

minerais e carboidratos estruturais e não estruturais durante o desenvolvimento destes, fornecerá subsídios para a escolha da massa celular adequada para regenerar a planta com alta capacidade embriogênica, tanto para produzir o princípio ativo, safrol, por suspensão de células, como também para regenerar plantas elites selecionadas.

Do ponto de vista anatômico, a família Piperaceae, por sua grande importância econômica, tem recebido a atenção de vários pesquisadores, que empregam a anatomia como uma ferramenta efetivamente importante para sua classificação. No entanto, trabalhos voltados para a comparação anatômica de órgãos vegetais em desenvolvimento não foram encontrados na literatura, principalmente, quando se referem às condições de cultivo. A compreensão apropriada da estrutura básica de um órgão é extremamente essencial na interpretação de qualquer trabalho experimental, para se chegar a um estreito conhecimento associado entre estrutura interna e processos fisiológicos.

A adaptação evolutiva das plantas aos diferentes habitats, especialmente no que diz respeito à disponibilidade de luz, pode estar associada a características estruturais diferentes. O ambiente de luz em que uma planta cresce é de fundamental importância, pois a adaptação dessa ao ambiente depende do ajuste do seu aparelho fotossintético, de modo que a luminosidade ambiental seja utilizada de maneira mais eficiente possível, as respostas dessas adaptações serão refletidas no crescimento global da planta (Engel & Poggiani, 1991).

Neste contexto e devido, à falta de estudos básicos com a pimenta longa, esse trabalho visa, obter a caracterização citológica, bioquímica e dos elementos minerais em calos friáveis formados a partir de segmentos foliares, durante o desenvolvimento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais

A pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle - Piperaceae) é uma planta nativa da Amazônia, característica de vegetação secundária e natural nos campos de pastagem e solos pobres. É considerada uma espécie promissora em biomassa renovada e apresenta floração precoce no Estado do Acre (Alencar et al., 1971). É produtora de óleo essencial volátil correspondente a 2,7% da sua massa verde total (Simionatto et al., 1997), que apresenta concentrações superiores a 80 % do importante metabólito secundário, safrol (Pescador et al., 2000).

O safrol era extraído de uma espécie arbórea chamada sassafrás [*Ocotea pretiosa* (Nees) Mez. – Lauraceae], no estado de Santa Catarina (Alencar et al., 1971). Porém, com a exploração abusiva e desordenada, o risco de extinção da espécie era quase certo, visto que a mesma era arrancada e cortada no tronco para a extração do óleo. Diante do problema, o Governo Federal, em 1991, através do Decreto número 1557, publicado no Diário Oficial da União de 25 de setembro de 1991, proibiu a derrubada das árvores desta espécie (Santiago, 1999).

Entre muitas outras atividades farmacológicas específicas descritas para os óleos essenciais, ainda são dignas de menção as atividades inibidoras do crescimento de células neoplásticas (Saens et al., 1996; Siani et al., 1999) e de alguns tipos de vírus do tipo 1, incluindo *Herpes simplex* (Siddiqui et al., 1996), *influenza* e *HIV* (Hayashi et al., 1995). Recentemente vêm sendo realizados com sucesso alguns testes biológicos de repelência a insetos vetores de doenças como os mosquitos do gênero *Aedes*, transmissores da dengue (Matsuda et al., 1996), e o transmissor da doença de Chagas (Fournet et al., 1996), assim como também a

Leishmania amazonensis (LV79) no uso de leishmanicida (Moura et al., 2001).

Alguns óleos essenciais foram ativos em testes *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum*, agente infectante da malária, relatam Siani et al. (2000); segundo Milhau et al. (1997), provavelmente este efeito é atribuído a um sinergismo entre as substâncias terpenóides neles presentes.

Estudos de identificação botânica ligados ao uso popular comprovado em busca da caracterização, identificação dos princípios ativos, da conservação, da propagação, do cultivo econômico apropriado e da utilização como matéria-prima industrial, segundo Santiago (1999), terão sucesso em trabalhos organizados, sistemáticos e permanentes através da seleção de plantas matrizes.

Uma opção estratégica para esse problema seria a utilização de técnica de cultura de tecidos, as quais têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de plantas superiores (Ferreira et al., 1999), uma tecnologia de custos razoáveis e que reproduz fielmente os progenitores (Grattapaglia & Machado, 1999). Alguns laboratórios comerciais têm dado especial atenção ao uso destas técnicas para a propagação de plantas matrizes (Debergh, 1990; Debergh & Read, 1993) e de plantas com potencial econômico (Hu & Wang, 1983; Jones, 1987; Bhojwani, 1990).

2.2 Descrição botânica

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

Divisão: Angiospermae;

Classe: Dicotyledoneae;

Ordem: Piperales;

Família: Piperaceae;

Gênero: *Piper*.

A classificação da espécie em estudo foi efetuada no herbário IAN–Belém, Pará, Brasil, localizado na Embrapa Amazônia Oriental, cuja exsicata tem o registro 165651; no herbário ESAL-UFLA da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil, exsicata n.º.15594 (Santiago, 1999) e no Herbário João Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi, sob o número MG 148368 e MG 148667 (Nascimento, 1997).

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

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

Segundo Burger (1972) a pimenta longa está entre as espécies mais evoluídas do gênero *Piper*. O autor descreve, em seu trabalho sobre as tendências evolutivas das espécies de *Piper* (Piperaceae) na América Central e México. Entre as 150 espécies estudadas, a *Piper sagittifolium* C. DC. é o

representante mais primitivo, com base em alguns caracteres, tais como peças florais grandes, inflorescência em espiga com aproximadamente 1 cm de espessura, antera estreita e relativamente longa (1 mm), com deiscência lateral, pólen grande (50-100 µm). Yuncker (1972) relata que outras espécies semelhantes deste gênero representam um grupo mais avançado, como *Piper hispidum*, pois apresentam peças florais compactadas, antera com deiscência apical e pólen pequeno.

2.3 Características edafoclimáticas e importância econômica da pimenta longa

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

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

Poltronieri et al. (1997) detectaram a resistência de mudas de pimenta longa após a inoculação com diferentes isolados do patógeno *Fusarium solani*, causador da podridão das raízes, em áreas onde plantio de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) foram dizimados pela doença, a qual poderá ser indicativa da possibilidade de plantio comercial nessas áreas. Possibilitando a recuperação dessas áreas para formar futuros plantios de pimenta-do-reino, gerando divisas ao estado e ao país, haja vista que o Brasil é o maior exportador de pimenta-do-reino.

O atual governo reconhece a importância dos produtos regionais como geradores de emprego e de renda na agricultura e forte inibidores do processo de êxodo rural (Passarinho, 1999). No caso específico da espécie *Piper*, destaca-se, ainda, sua expressiva participação como fonte de produto para exortação, além da manutenção da renda de milhares de pequenos produtores.

2.4 Importância do safrol na indústria

O safrol é um fenil éter encontrado como componente volátil em algumas espécies de plantas e que em sua forma mais pura, à temperatura ambiente, é um líquido viscoso de aroma canforáceo (Maia et al., 1987). Segundo Pescador et al. (2000), o safrol é um éter fenólico do grupo dos anilpropanóides, com fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_2$, ponto de ebulição entre $232^{\circ}C$ e $235^{\circ}C$ e se solidifica à temperatura de $11^{\circ}C$. Para esses autores, trata-se de uma matéria-prima importante para indústria química por causa de dois derivados: heliotropina, que é extensamente usado como um agente fixador de fragrância e de condimento, e butóxido de piperonil, ingrediente vital em inseticidas piretróides. O safrol possui muitas aplicações na aromatização em produtos domésticos como ceras de assoalho, polimentos, sabões, detergentes e agentes de limpeza, sendo bastante usado como ingrediente em bebidas populares e como um tóxico anti-séptico, pediculicite e carcinogênico.

Em sua forma natural foi largamente utilizado nos Estados Unidos para aromatizar cervejas (Anya, 1974) e como agente de fragrâncias em alguns produtos como ceras, sabões e desinfetantes (Anon, 1992). Atualmente, o safrol natural é utilizado na forma de heliotropina como componente de fragrâncias e de butóxido de piperonila, na composição de inseticidas (Castro & Poveda, 1983), sendo que o butóxido de piperonila apresenta-se como o principal agente sinérgico para o piretrum natural, o qual é a base para inseticidas biodegradáveis e que, isolado, tem efeito reduzido. O piretrum natural associado ao butóxido de piperonila é a única formulação permitida para o uso no armazenamento e processamento de alimentos em todos os países do desenvolvidos (Arctander, 1960). Segundo Maia et al. (1993), a demanda por butóxido de piperonila tende a crescer cada vez mais devido às suas características de baixa toxicidade e por ser biodegradável.

Japão, Itália e Estados Unidos são os mercados mais importantes para óleo de sassafrás, sendo a demanda calculada ao redor 2.000 toneladas/ano, com preço variando entre US\$ 4 a 6 por quilo de matéria bruta. O Brasil tem capacidade industrial para produzir heliotropina e piretróide (aproximadamente 500 toneladas/ano), embora a escassez em forma da produção doméstica, conduz a importações da República Federativa da China. A demanda é determinada pelo mercado para heliotropina e piretróide, ocasionando o aumento de consumo, particularmente na Europa Oriental, Ásia, e alguns países em desenvolvimento (Rocha & Ming, 1999).

2.5 Cultura de tecidos

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

órgãos vegetais. A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* está associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos. O manejo da planta matriz, as características do explante utilizado, o procedimento de subcultura adotado, as condições ambientais e microambientais dentro do frasco de cultura e o transplante são etapas influenciadas por diversas variáveis imponderáveis que frequentemente restringem a repetição dos resultados, dificultando a determinação de um protocolo efetivamente comercial de micropropagação (Grattapaglia & Machado, 1999).

2.6 Obtenção de plântulas *in vitro*

A germinação de sementes *in vitro* favorece a obtenção de plântulas isentas de microorganismos, já que as mesmas se desenvolveram em condições assépticas. O máximo de germinação da pimenta longa, cerca de 90%, ocorre aos 12 dias após a semeadura *in vitro* (Santiago, 1999). Outra grande vantagem em se usar sementes, é a obtenção de explantes jovens favorecendo a formação de calos para o cultivo em meios nutritivos contendo reguladores de crescimento.

A manutenção das plântulas *in vitro* depende muito da espécie e do meio de cultivo. O meio de cultura mais popular é o MS, proposto por Murashige & Skoog (1962) justamente porque a maioria das espécies reagem favoravelmente. Para Caldas et al. (1999), os meios nutritivos utilizados para a cultura de tecidos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em parte, o padrão do desenvolvimento. Esses autores comentam que as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas que funcionam nas plantas são conservadas nas células cultivadas, embora alguns processos, como fotossíntese, possam ser inativados pelas condições de cultivo e pelo estado de diferenciação das células. Por isso, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas

quanto aos nutrientes minerais, com algumas modificações para atender às necessidades específicas da espécie no cultivo *in vitro*.

2.7 Obtenção de calos friáveis

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

A regeneração de plantas vasculares pode ser feita via formação de calos em cultura Mantell et al., (1994) definem calos como sendo tecidos constituídos por células dediferenciadas, que se desenvolvem como resposta a uma lesão química ou física sob determinadas condições nutricionais e hormonais.

Em geral, calos friáveis são induzidos a partir de calos compactos, obtidos inicialmente em meio sólido. A liberação de células a partir de calos friáveis é mais rápida que de calos compactos (Cid, 1999). Para Liau & Boll (1970) e Armstrong & Green (1985) é provável que a característica friável sejam favorecidas por uma alta relação auxina/citocinina, porém Taira et al. (1977) relatam que o genótipo também pode influir na coloração e na facilidade de formar calos friáveis.

Vários autores investigaram o desenvolvimento de calos friáveis e compactos quanto à liberação de células em meios nutritivos e pressupõe-se que essas características estejam relacionadas com a histologia do calo, sendo o tipo friável meristemático, como relatam Besse et al. (1992), e com maiores proporções de substâncias pécticas e hemicelulose que os compactos (Grant & Fuller, 1968).

No caso da pimenta longa, em que as pesquisas são recentes, escassas e de grande interesse, é extremamente necessária a caracterização de calos

utilizando parâmetros morfológicos e bioquímicos. A viabilidade e diâmetro de células associadas a doseamentos de componentes de parede celular e açúcares podem favorecer mais embasamento na seleção de protoplastos com maior atividade embriogênica. Essa estratégia é relativamente nova e tem sido utilizada para citros (Guo & Deng, 1999 e Liu & Deng, 2000).

Para analisar a viabilidade dos protoplastos dessa espécie, uma opção é o uso do azul de metileno, corante básico do grupo da triagena, o qual apresenta solubilidade de 1,55% em água e 1,48% em álcool (Gavilanes, 1995). Apesar desse corante ser mais utilizado para leveduras (Smart et al., 1999; Boyd et al., 2002) e ratos (Sugihara et al., 2000), já foi empregado em células vegetais (Widholm, 1972) e foi utilizado para verificar o isolamento de protoplastos de camadas de aleurona de carvalho (*Quercus robur*) após a aplicação de ácido giberélico exógeno (Hooley, 1982). Outra aplicação é na verificação da viabilidade de protoplastos antes de serem submetidos à eletroporação (Martins, 2003). Para o sistema da pimenta longa, a utilização do azul de metileno necessita de uma otimização, já que sua faixa de uso pode variar de 0,01% (p/v) a 0,5% (p/v) conforme Widholm (1972).

2.8 Análises citológicas e bioquímicas

Durante o crescimento da célula, forma-se sobre a lamela média a parede primária, constituinte de pectinas, hemicelulose e celulose, além de proteínas e compostos fenólicos (Carpita & Gibeaut, 1993). A parede celular aumenta em espessura pelo preenchimento de espaços da estrutura com o novo material sintetizado. É na parede primária que ocorrem as principais mudanças na estrutura e composição dos polímeros durante a expansão celular (Brett & Waldron, 1996). Completada a divisão celular, as células aumentam em extensão como resultado dos aumentos de volume do protoplasto e organelas, junto com a inclusão de água nos vacúolos (Rodionova & Bezborodov, 1997).

Davide et al. (1999) reportam que as proteínas estão presentes nas paredes em duas formas, estrutural e enzimática, sendo sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e secretadas para a região da parede através de vesículas provenientes do complexo de Golgi. Essas autoras chamam a atenção para a atividade metabólica das paredes celulares, que apesar do nome parede e de sua localização, estas são, na grande maioria, metabolicamente ativas, apenas não apresentando atividades as paredes de células suberificadas e lignificadas, cujas células não são ativas.

Os minerais constituem o grupo de nutrientes mais importante, após a fonte de carboidratos, para o desenvolvimento *in vitro* (Torres et al, 2001). Os autores comentam ainda que a solução nutritiva componente do meio de cultivo nem sempre é favorável para o crescimento, devido a alta composição dos sais minerais. Os elementos minerais exigidos em maiores quantidades para o crescimento de plantas inteiras são incluídos nos meios nutritivos na forma de sais inorgânicos, podendo o nitrogênio também ser adicionado como componente de suplementos orgânicos (Caldas et al., 1999). Estes elementos são fatores de estresse que podem interferir nos constituintes bioquímicos de uma planta, assim, a deficiência e/ou excesso pode promover maior ou menor produção de metabólitos. Assim, o conhecimento das funções exercidas pelos elementos químicos na planta é fundamental para se entender como vive a planta e também os métodos destinados a avaliar o estado natural (Malavolta et al., 1997), como também a quantidade de nutrientes exigida pela planta em função dos seus teores no material vegetal e do total de matéria seca produzida.

Na propagação *in vitro*, o material coletado é selecionado casualmente em locais de crescimento espontâneo, que diante da variabilidade genética, não apresentam um completo balanceamento nas suas características morfológicas, químicas e substâncias ativas (Kerbaudy, 1999). No tecido parenquimatoso, a

planta deposita os nutrientes, que apresentam características texturais e que facilitam a liberação dessas substâncias nutritivas quando submetidos à ruptura mecânica ou química, porém, a textura específica apresentada pelo parênquima depende de fatores inerentes às células, tais como: forma, tamanho, volume dos espaços intercelulares, presença de compostos intracelulares, relação entre citoplasma e vacúolo e pressão osmótica (Ilker & Szczesniak, 1990).

Pescador et al. (2000) reportam que a possibilidade de manipular sistemas *in vitro* para clonagem de genótipos superiores de espécies vegetais depende de vários fatores, desde o conhecimento da fisiologia do desenvolvimento celular, que é de fundamental importância para se obter respostas morfogenéticas aos sistemas de cultura *in vitro*, correlacionados aos parâmetros morfológicos, fisiológicos, genéticos, bioquímicos e citológicos existentes em uma planta intacta, são rompidos.

Apesar de todo o conhecimento acumulado sobre as características morfológicas e anatômicas das espécies amazônicas (Bonates, 1993; Santiago et al., 2001), não foram encontrados relatos na literatura sobre a morfogênese relacionada aos aspectos bioquímico e citológico da pimenta longa. Estudos nessa área fornecerão subsídios para um melhor entendimento da técnica de propagação *in vitro* dessa espécie, com vistas à exploração comercialmente viável.

2.9 Estudos comparativos dos órgãos vegetais

No corpo vegetal, os vários sistemas de tecidos distribuem-se segundo padrões característicos de acordo com o órgão considerado, o grupo vegetal ou ambos (Esau, 1985). Essa autora comenta ainda que o desenvolvimento varia consideravelmente nos diversos grupos de planta e muitas discordâncias existem quanto às divisões iniciais e à interpretação de determinadas partes do vegetal. Por outro lado, encontram-se apenas informações esparsas no que se refere aos

estádios mais avançados, durante os quais os sistemas de tecidos e os meristemas apicais atingem sua organização embrionária final.

Desde que o mecanismo da fotossíntese passou a ser mais bem compreendido e estudado, as exigências lumínicas das espécies nativas em processo de domesticação têm merecido atenção por parte de pesquisadores de todo o mundo. A adaptação das espécies à luz na fase de plântula é especialmente importante porque condiciona mudanças morfológicas e fisiológicas na sua estrutura e função (Whatley & Whatley, 1982) e determina o sucesso ou não da regeneração (Inoue, 1983).

Estudos comparativos de estruturas dos órgãos vegetais, tais como folhas, caule e raiz, têm mostrado diferentes respostas anatômicas em relação a esses órgãos, a despeito de alterações nos níveis de luminosidade no ambiente de cultivo. Em espécies adaptadas à sombra, quando se aumenta a intensidade da luz, observa-se um aumento na quantidade de tecidos no mesofilo, favorecendo o desenvolvimento de tecido paliçádico, o que se evidencia pelo aparecimento de várias camadas bem organizadas, as quais levam a aumentos significativos na capacidade fotossintética (Chabot et al., 1979). Para esses autores, o plano de divisão celular é controlado pela quantidade de luz fotossinteticamente ativa e muitos diferentes processos de desenvolvimento estão associados a modificações no comportamento anatômico da planta.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITCHISON, P. A.; MacLEOD, A.; YEOMAN, M. M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. 2. ed. California: Blackwell Scientific Publication. 1977. p. 267-306.

ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D. J.; ENGLISH, P. D.; KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 5, p. 340-345, 1967.

ALENCAR, R. de; LIMA, R. A. de; CORREA, R. G. C.; et al. Óleos Essenciais de Plantas Brasileiras. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 1, n. 3, p. 41-43, dez. 1971.

ALONSO, J.; HOWELL, N.; CANET, W. Purification and characterization of two pectinmethylesterase from persimmon (*Diospyros kaki*). **Journal Science of Food Agriculture**, London, v. 75, n. 3, p. 352-358, Nov. 1997.

AMIDON, T. E. Effect of the wood properties of hardwoods on Kraft paper properties. **Tappi**, Atlanta, v. 64, n. 3, p. 123-126, Mar. 1981.

ANON, A. **Marketing reports in tissues of the chemical marketing reporter**. New York: Schnell publishing, 1992.

ANYA, A. L. Study of the allelopathic activity in the essential oil of *Piper auritum*. In: CONGRESS OF ESSENTIAL OILS, 6., 1974, Oak Park. **Proceedings...** Oak Park: Alhured Published Corporation, 1974.

ARCTANDER, S. **Perfume and flavour materials of natural origen**. Elisabeth, New Jersey, 1960.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, Berlin, v. 164, n. 2, p. 207-214, 1985.

ASKEW, H. O.; CHITTENDEN, E. T.; MONK, R. J.; WATSON, J. Chemical investigations on bitter pit of apples. I. Physical and chemical in leaves and fruits of Cox's orange variety during the season. **New Zealand Journal Agricultural Research**, Wellington, v. 2, p. 1167-1186, 1959.

BARROS, L. S.; OLIVEIRA, M. N. de. **Avaliação da variabilidade genética em populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervium*) no estado do Acre.** Embrapa / Centro Nacional de Pesquisas Agroflorestal do Acre. Rio Branco: EMBRAPA-CNPAP, 1997. 2 p. (EMBRAPA.CNPAP. Pesquisa em Andamento, PA/114).

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** Viçosa: Imprensa Universitária, 1984. 3 v.

BECKER, L. **Propagação *in vitro* e *in vivo*, indução de calos, nutrição e quantificação de alcalóides nas espécies *Phyllanthus niruri* L. *Phyllanthus corcovadensis* Muell Arg. (Quebra-pedra).** 1997. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BEN-ARIE, R.; SAKS, Y.; SONEGO, L.; FRANK, A. Cell wall metabolism in gibberellin-treated persimmon fruits. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 19, n. 1, p. 25-33, June 1996.

BESSE, I.; VERDEIL, J. L.; DUVAL, Y.; SOTTA, B.; MALDINEY, R.; MIGINIC, E. Oil palm (*Elaeis guinnensis* Jacq.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indoleacetic acid in embryogenic callus cultures, **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, n. 25, p. 983-989, July 1992.

BHOJWANI, S. S. **Plant tissue culture: applications and limitations.** Amsterdam: Elsevier, 1990. 461 p.

BICALHO, U. O. **Vida útil pós-colheita de mamão submetido a tratamento com cálcio e filme de PVC.** 1998. 145 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BIO-RAD LABORATORIES. **Pulsed field electrophoresis systems: instructions manual and applications guide.** United States of America: Bio-Rad Laboratories, 1992. (Catalog numbers 170-3612 through 170-3729).

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Chemistry**, New York, v. 4, n. 4, p. 330-334, 1962.

BONATES, L. M. C. Estudos ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazônia, II-. Anatomia ecológica foliar de espécies com metabolismo CAM de uma campina da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 23, n. 4, p. 315-348, dez. 1993.

BOYD, A. R.; GUNASKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; SIMIC, K.; VINCENT, F. S.; VEAL, A. D. A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 11-16, Mar. 2003.

BRADFORD, J. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, p. 248, 1976.

BRASIL, E. C.; VIÉGAS, I. de J. M.; POLTRONIERI, L. S.; CARVALHO, J. E. U. de; ROCHA, O. G. da. **Manejo fitotécnico, nutrição e adubação para a cultura da pimenta longa (*Piper hispidinervium*) no Estado do Pará**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1998. 19 p. (Embrapa. Programa 07 – Matéria-prima, subprojeto 07. 098. 006. 07). Projeto em andamento.

BRESSANI, R.; ESTRADA, E.; JARQUIN, R. Pulpa y pergamino de café. I. Composición química contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. **Turrialba**, San José, n. 3, p. 299-304, jul./set. 1972.

BRETT, C.; WALDRON, K. Physiology and biochemistry of plant cell walls. In: BLACK, M.; CHAELWOOD, B. **Tropics in plant functional biology**. 2. ed. Londres: Cambridge, Chapman & Hall, 1996. v. 1, 194 p. (Series Editors)

BURGER, W. C. Evolutionary trends in the Central American species of *Piper* (Piperaceae). **Brittonia**, Bronx, v. 24, n. 4, p. 356-362, 1972.

BURNS, J. K.; PRESSEY, R. Calcium in cell wall of ripening tomato and peach. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 5, p. 783-787, Sept. 1987.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/CNPH, 1999. v. 1, p. 87-132.

CARNEIRO, V. T. de C.; CONROI, T.; BARROS, L. M. G.; MATSUMOTO, K. Protoplasto: Cultura e Aplicação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**, Brasília: Embrapa-SPI/CNPH, 1999. v. 1, p. 87-132.

CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v. 47, p. 445-476, 1996.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 1-30, 1993.

CASTRO, C.; POVEDA, L. *Piper auritum* H. B. K. Estudo preliminar de aceite essencial de sus hojas. **Instituto de Ciências Químicas de Produtos Naturais**, v. 7, n. 1/2, p. 24-25, 1983.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso?. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 19, p. 16-22, mar./abr. 2001.

CID, L. P. B. Suspensão celular. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1999. v. 1, p. 331-354.

COOIL, B. J. **Leaf composition in relation to growth and yield of coffee in Kona**. Kona, Hawaii: Coffee Information Exchange, 1954. 13 p.

COOIL, B. J.; NAKAYAMA, M. **Carbohydrate balance as a major factor affecting yield of coffee tree**. Hawaii: Agricultural Experiment Station of University of Hawaii, 1953. 15 p. Progress report, 91.

COOMBE, B. G. The development of fleshy fruits. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 27, p. 507-528, 1976.

CURTIS, L. T.; SMARELLI, J. Jr.; Metabolite control of nitrate reductase activity in cultured sorbean cells. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 127, n. 1/2, p. 31-39, Mar. 1987.

CHABOT, B. F.; JURIK, T. W.; CHABOT, J. F. Influence of instantaneous and integrated light-flux density on leaf anatomy and photosynthesis. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 66, n. 8, p. 940-945, Aug. 1979.

DAVIDE, L. C.; PEREIRA, I. A. M.; TORRES, G. A. **Citologia**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 144 p. (Curso de Pós-graduação "Lato Sensu" Especialização a Distância – Biologia).

DEBERGH, P. C. Recent trends in the application of tissue culture to ornamentals. In: GREEN, C. G.; SOMERS, D. A.; HACKETT, W. P.; BLESBOER, D. D. **Plant tissue and culture**. New York: A. R. Liss, 1990. p. 383-393.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Ed.). **Micropropagation** – technology and application. London: Kluwer Academy Publishers, 1993. cap. 1, p. 1-13.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, London, v. 18, n. 1, p. 26-31, Jan. 2000.

DIAS, D. R. **Seleção de leveduras para fermentação alcoólica do mosto de frutas tropicais**. 2001. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-512.

ELZENGA, J. T. M.; KELLER, C. P.; VAN VOLKENBURGH, E. Patch clamping protoplasts from vascular plants: method for the quick isolation of protoplasts having a high success rate of gigaseal formation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 4, p. 1537-1575, Dec. 1991.

ENCICLOPÉDIA MICROSOFT ENCARTA 99, **CD-ROM**. Microsoft Corporation, 1999.

ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 3, n. 1, p. 39-45, jun. 1991.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Trad. Berta Large de Morretes. São Paulo: Edgard Blücher, 1985. 293 p.

EVANGELISTA, R. M.; CHITARRA, A. B.; GOLDONI, J. S. Efeito da aplicação de ceras comerciais na pós-colheita de manga (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 18, n. 1, p. 105-114, 1996.

FAHN, A. Secretary tissue in vascular plants. **New Physiologist**, Cambridge, v. 108, n. 3, p. 229-257, Mar. 1988.

FERREIRA, C. P.; JARROUGE, M. G.; TUNDISI, M.; MARTIN, N. F. **Bioquímica básica**. 4. ed. rev. e ampl. São Paulo, 2000. 413 p.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR para windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**, Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1999. v. 1, p. 21-43.

FINK, H.; KUHLES, R. Beitrage zur methylemblau farbung der hefezellmembran. **Hoppe-Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, Strassburg, v. 218, n. 1, p. 65-66, 1933.

FOURNET, A.; ARIAS, R. de; CHARLE, B.; BRUNETON, J. Chemical constituent of essential oils of Muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticide properties against Chagas' disease vectors. **Journal of Ethnopharmaceutical**, Clare, v. 52, n. 3, p. 145-149, July 1996.

GAVILANES, M. L. **Notas complementares ao livro texto da disciplina: histologia e anatomia vegetal (Bio 104)**. Lavras: UFLA, 1995. 67 p.

GEORGE, E. F.; PUTTOCK, J. M.; GEORGE, H. J. **Plant culture media: commentary and analysis**. Exegetics, 1988. v. 2, 420 p.

GORSKI, P. M.; CREASY, L. L. Color development in Golden Delicious apples. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 102, n. 1, p. 73-75, Jan. 1977.

GOTTLIEB, O. R.; SALATINO, A. Função e evolução dos óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, Campinas, n. 39, v. 8, p. 707-716, Ago. 1987.

GOU, W. W.; DENG, X. X. Intertribal hexaploid somatic hybrid plants regeneration from eletrofusão between diploids of *Citrus sinensis* and its sexually incompatible relative, *Clausena lansium*. **Theoretical Applied Genetic**, Berlin, v. 98, n. 3/4, p. 581-585, Mar. 1999.

GRANT, M. E.; FULLER, K. W. Tissue culture of root cells of *Vicia fava*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 19, n. 61, p. 667-680, 1968.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/CNPH, 1999. v. 1, p. 183-260.

GROVER, M.; SHARMA, A. K.; DHINGRA, A.; MAHESHWARI, S. C.; TYAGI, A. K. Regulation of plastid gene expression in rice involves calcium and protein phosphatase/kinase for signal transduction. **Plant Science**, Clare, v. 137, n. 2, p. 185-190, Oct. 1998.

HAO, Y. J.; YOU, C. X.; DENG, X. X. Cell size as a morphological marker to calculate the mitotic index and ploidy level of citrus callus. **Plant Cell Report**, New York, v. 20, n. 3, p. 1123-1127, Oct. 2002

HAYASHI, K.; KAMIYA, M.; HAYASHI, T. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, Influenza Virus and HIV. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, n. 3, p. 237-241, June 1995.

HELLER, R.; DARPAS, A.; DEVILLERS, P.; RICHEZ, M. Absorption et exsorption des tissus et fragments végétaux en culture. In: **Les cultures de tissus de plantes**. Paris: CNRS, 1968. p. 149-169.

HOOLEY, R. Protoplasts isolated from aleurone layers of oat (*Avena fatua* L.) exhibit the classic response to gibberellic acid. **Planta**, Berlin, v. 154, n. 1, p. 29-40, 1982.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and cultures. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of plant cell culture** – techniques for propagation and breeding. New York: MacMillan Publishing Company, 1983. v. 1, p. 177-277.

ILKER, R.; SZCZENIAK, A. S. Structural and chemical bases of texture of plant foodstuffs. **Journal of Texture Studies**, Trumbull, v. 21, n. 1, p. 1-36, 1990.

INOUE, M. T. Bases fisiológicas para a silvicultura de espécies nativas. In: INOUE, M. T.; REICHMANN NETO, F.; CARVALHO, P. E. R.; TORRES, M. A. V. (Ed.). **A silvicultura de espécies nativas**. Curitiba: FUPEF, 1983. p. 1-18.

INSTALLE, P.; CESAR, G.; HOFINGER, M.; GASPAR, T. Evolution dans la composition en macroelements des milieux de culture pour tissus végétaux. **Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent**, Gent, v. 50, n. 2a, p. 317-325, 1985.

JANARDHAN, K. V.; GOPAL, N. H.; RAMAIAH, P. K. Carbohydrates reserves in relation to vegetative growth, flower bud formation and crop levels in arabica coffee. **Indian Coffee**, Bangalore, v. 35, n. 1, p. 145-148, Apr. 1971.

JARVIS, M. C. The proportion of calcium-bound pectin in plant cell walls. **Planta**, Berlin, v. 154, n. 4, p. 344-346, 1984.

JOHNSON, D. S.; MARKS, M. J.; PEARSON, K. Storage quality of cox's orange pippin apples in relation to fruit mineral composition during development. **Journal Horticulture Science**, Ashford, v. 62, n. 1, p. 17-25, Jan. 1987.

JONES, L. H. Clonal propagation of plantation crops. In: ABBOT, A. J.; ATKIN, R. K. **Improving vegetatively propagated crops**. London: Academic Press, 1987. p. 385-405.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**, Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1999.v. 2, p. 519-531.

KIBBLEWITE, R. P.; RIDDELL, M. J. C.; SHELBORNE, C. J. A. Kraft fiber and pulp qualities of 29 trees of New Zealand grown *Eucalyptus nitens*. **Appita Journal**, Carlton, v. 51, n. 2, p. 114-121, Mar. 1998.

KIKUCHI, A.; SATOH, S.; NAKAMURA, N.; FUJI, T. Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli. **Plant Cell Reports**, New York, v. 14, n. 5, p. 279-284, Feb. 1995.

KNEE, M.; SARGENT, J. A.; OSBORNE, D. J. Cell wall metabolism in development strawberry fruits. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 28, n. 103, p. 377-396, Apr. 1977.

LARGURA, G.; WENDHAUSEN JÚNIOR, R.; TAVARES, L. B. B.; PESCADOR, R.; CARDOSO, A. Imobilização de células vegetais de *Piper hispidinervium* em crisotila para a produção de safrol. In: PIBIC/CNPq, FURB – Universidade Regional de Blumenau - SC. **Livros de Resumos...** Blumenau, 2002.

LARVAL-MARTINS, D.; QUENNEMENT, J.; MONEGER, R. Pigment evolution in *Lycopersicum esculentum* fruits during growth and ripening. **Phytochemistry**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 2357-2362, Nov. 1975.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. 2. ed. São Paulo, 2000. 839 p.

LIAU, D. F.; BOLL, W. G. Callus and cell suspension culture of bush bean (*Phaseolus vulgaris*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 48, n. 6, p. 1119-1130, 1970.

LIMA, L. C. O. **Bioquímica das transformações de manga ‘Tommy Atkins’ na ocorrência de colapso interno tipo “spongy tissue”**. 1997. 147 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LIU, J. H.; DENG, X. X. Regeneration of tetraploid intergeneric somatic hybrid plants via protoplast electrofusion. **China Agricultural Science**, Taipei, v. 33, p. 98-100, 2000.

MACHADO, R.A.F. **Fósforo e zinco na nutrição e crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)**. 1998, 93p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MAGALHÃES, M. M. **Desenvolvimento e carboidratos constituintes do fruto de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg cv. “Sabará”)**. 1991. 77 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MAGALHÃES, M. M.; BARROS, R. S.; FINGER, F. L. Changes in structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, Oxford, v. 66, p. 17-22, 1996.

MAGNAVAL, C.; NOIROT, M.; VERDEIL, J. L.; BLATTES, A.; HUET, C.; GROSDEMANGE, F.; BEULÉ, T.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutritional requirements of coconut calli (*Cocos nucifera* L.) during somatic embryogenesis induction. **Journal Plant Physiology**, Amsterdam, v. 150, n. 3/4, p. 719-728, Oct. 1997.

MAIA, J. G. S.; GREEN, C. L.; MILCHARD, M. J. New Sources of Natural Safrole. **Perfumer and Flavorist International**, Weaton, v. 18, n. 1, p. 19-22, 1993.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. I. da; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em Safrol. **Química Nova**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 200-204, maio/jun. 1987.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319 p.

MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas**: uma introdução à engenharia genética, 1994. 344 p.

MARQUES, E. et al. **Técnica laboratoriais de biologia**, Bloco I. Porto: Proto Editora, 1999.

MARRIOTT, J.; PALMER, J. K. Bananas: physiology and biochemistry of storage and ripening for optimum quality. **CRC Critical review in Food Science and Food Nutrition**, Boca Raton, v. 13, n. 1, p. 41-88, Jan. 1980.

MARTINS, F. A. dos S. Eletroporação de protoplastos. **Transgênicos**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/bioano01/div34.htm>>. Acesso em: 14 jan. 2003.

MATSUDA, B. M.; SURGEONER, G. A.; HEAL, J. D.; TUCKER, A. O.; MARCIARELLO, M. J. Essential oil analysis and field evaluation of the citrus plant *Pelargonium citrosum* as repellent against populations of *Aedes* mosquitoes. **Journal American Mosquitoes control Association**, Lake Charles, v. 12, n. 1, p. 69-74, Mar. 1996.

MATSUI, T.; KITAGAWA, H. Effects of ethylene absorbent on polygalacturonase activity of persimmon fruit. **Journal Japan Society Horticultural Science**, Kagawa, v. 57, n. 4, p. 697-701, 1989.

McCREADY, R. M.; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, Dec. 1952.

McKEE, H. S.; ROBERTSON, R. N.; LEE, J. B. Physiology of pea fruits. I. Developing fruit. **Australian Journal of Biological Science**, Melbourne, v. 82, n. 2, p. 137-163, Feb. 1955.

MILHAU, G.; VALENTIN, A.; BENOIT, F.; MALLIÉ, M.; BASTIDE, JEAN-MARIE. *In vitro*antimalarial activity of eight essential oils. **Journal Essential Oils Research**, Carol Stream, v. 9, n. 4, p. 329-333, July/Aug. 1997.

MITCHAM, E. J.; McDONALD, R. E. Cell wall modification during ripening of “Keitt” and “Tommy Atkins” mango fruits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 6, p. 919-924, Nov. 1992.

MONRO, J. A.; LEE, J. Change in elements, pectic substances and organic acids during development of boysenberry fruit. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 38, n. 3, p. 195-207, Mar. 1987.

MOURA, V. C.; TORRES-SANTOS, E. C.; SANTOS, P. R. D.; ROSSI-BERGMANN, B.; KAPLAN, M. A. C. Fitoquímica e atividade leishmanicida de espécie Piperaceae. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Núcleo de Produtos Naturais, **Resumo**. . . Rio de Janeiro, RJ. 2001.

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

NACIF, S. R. **Ontogenia e crescimento do fruto de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*)**. 1991. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

NASCIMENTO, M. E. **Aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Piper hispidinervium* C. DC. (Piperaceae) e suas estruturas secretoras**. 1997. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Ambiental) – Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

NASH, D. T.; DAVIES, M. E. Some aspects of growth and metabolism of Paul’s Scarlet Rose cell suspensions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 23, n. 67, p. 75-92, Jan. 1972.

NELSON, N. A. Photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 135, n. 1, p. 136-175, Jun. 1944.

NII, N.; COOMBE, B. G. Structural and development of the berry and pedicel of the grape *Vitis vinifera* L. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 139, p. 129-140, 1983.

NUTMAN, F. G. The root system of *Coffea arabica*. II. The effect as some soil conditions in modifying the normal root-system. **Empire Journal of Experimental Agriculture**, Oxford, v. 11, p. 285-296, 1933.

OJIMA, K.; OHIRA, K. Nutritional requirements of callus and cell suspension cultures. In: THORPE, T. A. (Ed.). **Frontiers of plant tissue culture 1978**. Calgary: University of Calgary, 1978. p. 265-275.

OLLÉ, D.; LOZANO, Y. F.; BRILLOUET, J. M. Isolation and characterization of soluble polysaccharides and insoluble cell wall material of the pulp from four mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 9, p. 2659-2662, Sept. 1996.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Nutrition of plant tissues. In: VASIL, I. K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, Cytodifferentiation and Cryopreservation**. Florida: Academic Press, 1985. v. 2, cap. 4, p. 129-147.

PAIVA NETO, V. B. de **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de Moreira [(*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud]**. 1996. 33 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PASSARINHO, R. P. Abertura da reunião sobre a pimenta-do-reino. In: REUNIÃO SOBRE A PIMENTA-DO-REINO, 1999, Belém. **Anais...** Belém, PA, 1999. 100 p.

PATEL, R. Z. A note on the seasonal variations in the starch content of different parts of arabica coffee e trees. **East African Agricultural and Forestry Journal**, Nairobi, v. 36. p. 4, Apr. 1970.

PERUZZO, E. L. **Efeitos do sombreamento e da área foliar na produção e qualidade do fruto de *Vitis labrusca* L. cv. *Niagara rosada***. 1990. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBELO, R. A.; GIOTO, C. R.; WENDHAUSEN Jr., R.; LARGURA, G.; TAVARES, L. B. B. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta Longa. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**. Brasília, ano 3, n. 15, p. 18-23, jul./ago. 2000.

PICHA, D. H. Sugar and organic acid content of cherry tomato fruit at different ripening stages. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 1, p. 94-96, Feb. 1987.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1989. p. 202-220.

PINTO, C. A. B. P. **Influence of endosperm cell number on size and weight in maize (*Zea mays* L.)**. 1985. 112 p. Thesis (Degree of Doctor of Philosophy) - Faculty of Purdue University, USA.

POLTRONIERI, L. S.; ALBUQUERQUE, F. C. de; ROCHA NETO, O. G. da. Reaction of *Piper hispidinervium* to isolates of *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. **Brasilian Phytopathology**, v. 22, n. 1, p. 112, 1997.

REDGWELL, R. J.; FISCHER, M. Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perceptions. In: KNEE, M. (Ed.). **Fruit quality and its biological basis**. Ohio: Sheffield Academic Press, 2002. p. 46-88.

REINERT, J.; TAZAWA, M.; SEMENOFF, S. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*. **Nature**, London, v. 216, n. 5121, p. 1215-1216, Dec. 1967.

RENA, A. B.; PEREIRA, A. A.; BARTHOLO, G. F. Teor foliar de minerais, conteúdo caulinar de amido e o depauperamento de algumas progênies de café resistente a ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA DE CAFEIRAS, 10., 1983, Poços de Caldas. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1983. p. 169-170.

RIJVEN, A. H. G.; WARDLAW, I. F. A method for the determination of cell number in plant tissues. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 41, n. 2, p. 324-328, 1966.

ROBERT, D.; ROLAND, J. C. **Biologie végétale**. 2. ed. Paris: Doin, 1998. v. 1, 367 p.

ROCHA, S. F. R.; MING, L. C. *Piper hispidinervium*: A Sustainable Source of Safrole. In: JAMICK, (Ed.). **Perspectives on new crops and new use**. Alexandria: ASHS Press, 1999. p. 479-481.

RODIONOVA, N. A.; BEZBORODOV, A. M. Localization of enzyme systems that degrade cell wall polysaccharides in higher plants: pectinases (review). **Application Biochemistry Microbiology**, New York, v. 33, n. 5, p. 415-432, Sept./Oct. 1997.

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

ROSE, J. K. C.; BENNETT, A. B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends Plant Sciencs**, London, v. 4, n. 5, p. 176-183, May 1999.

SAENS, M. T.; GARCÍA, M. D.; PUERTA, R. de la. Cytostatic activity of some essential oils against HEP-2 cells. II **Farmaco**, Rome, v. 51, n. 7, p. 539-540, Jul. 1996.

SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, R.; SANTIAGO, E. J. A. de; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, L. V. Técnica de estabelecimento *in vitro*. In: PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. p. 36-49. (Textos Acadêmicos).

SANTIAGO, E. J. A. de. **Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC) em condições *in vitro* e *in vivo***. 1999. 118 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

SANTOS, A. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. das G. B.; et al. Sesquiterpenes of amazonian *Piper* species. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 28, n. 2, p. 127-130, jun. 1998.

SANTOS, C. R. **Métodos não-convencionais para determinação de celulose como parâmetro de seleção de árvores matrizes visando a produção de polpa Kraft-AQ.** 2000. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Madeira) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

SARRIA, S. D.; HONÓRIO, S. L. Mudanças dos açúcares do caqui (*Diospyros kaki*) "Fuyu" durante a sua conservação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 1998, Poços de Caldas. **Conferências...** Lavras: UFLA, 1998. p. 195.

SCHROEDER, J. I.; HEDRICH, R.; FERNANDEZ, J. M. Potassium-selective single channel in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. **Nature**, London, v. 312, n. 5992, p. 361-362, Nov. 1984.

SERRA, A. G. P. **Análises bioquímicas de calos e estudos da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.).** 1999. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SHANDU, S. S.; DHILLON, B. S.; SINGH, S. Starch and total water-soluble carbohydrate in the developing fruits of early and late maturing peach cultivars. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 58, n. 2, p. 203-207, Mar. 1983.

SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; MENEZES-DE-LIMA Jr. , O.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNANDEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R. O. A.; ROSA, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M. G. B. HENRIQUES, M. G. M. O. Evaluation of antiinflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. **Journal of Ethnopharmaceutical**, Clare, v. 66, n. 1, p. 57-69, Jul. 1999.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C. de.; HENRIQUES, M. das G. M. O.; RAMOS, M. F. de S. Óleos essenciais. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v. 3, n. 16, p. 38-43, set./out. 2000.

SIDDIQUI, Y. M.; ETTAYEBI, M.; HADDAD, A. M.; AL-AHDAL, M. N. Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on *Herpes simplex* virus type 1 and New castle disease virus. **Medical Science Research**, London, v. 24, n. 3, p. 185-186, Mar. 1996.

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

SIMIONATTO, E. L.; REBELO, R.; RAMOS, M. G.; ZANETE, V. C. **Fontes alternativas de safrol** – propagação da pimenta longa pela técnica de estaquia. FNMA, processo anterior n. 1668/92 referente ao convênio anterior n. 058/95, 1997.

SMART, K. A.; CHAMBER, K. M.; LAMBERT, I.; JENKINS, C. Use of methylene staining procedures to determine yeast viability and vitality. **Journal of American Society of Brewing Chemistry**, St. Paul, v. 57, n. 1, p. 18-23, 1999.

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

SOUTHGATE, D. A. T. **Determination of foods carbohydrates**. London: Elsevier Applied Science, 1991. 232 p.

STOVER, R. H.; SIMONDS, N. W. **Bananas**. 3. ed. New York: Longman Scientific and Technical, 1987. 468 p.

SUGIHARA, T.; SAWADA, S.; HAKURA, A.; HORY, Y.; UCHIDA, K.; SAGAMI, F. A staining procedure for micronucleus test using new methylene blue and acridine orange: specimens that are supravivally stained with possible long-term storage. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 470, n. 2, p. 103-108, Oct. 2000.

TAIRA, T.; HASKINS, F. A.; GORZ, H. Callus and suspensions of *Melilotus alba* tissue and cell. **Crop Science**, Madison, v. 17, n. 3, p. 407-411, May/June 1977.

TEIXEIRA, J. C.; DELGADO, E. F.; CORREA, E. M. Degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta do grão de soja, cru ou tostado, em diferentes formas físicas, em vacas da raça holandesa. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 105-110, jan./mar. 1995.

TOBIAS, R. B.; CONWAY, W. S.; SAMS, C. E. Cell wall composition of calcium-treated apples inoculated with *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 35-39, Jan. 1993.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação**

para a cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA, Brasília, DF, 2001. 20 p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 24).

VAGERA, J.; HAVRANEK, P. Regulation of androgenesis in *Nicotiana tabacum* L. cv. White Burley and *Datura innoxia* Mill. Effect of bivalent and trivalent iron and chelating substances. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 25, n. 1, p. 5-14, 1983.

VAN DE KAMER, J. H.; VAN GINKEL, L. Rapid determination of crude fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 29, n. 4, p. 239-251, July/Aug. 1952.

VASCONCELOS, A. R. D. **Utilização de cloreto de cálcio e atmosfera modificada na conservação de caqui cv fuyu.** 2000. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VASIC, D.; PAJEVIC, S.; SARIC, M.; VASILJEVIC, L.; SKORIC, D. Concentration of mineral elements in callus tissue culture of some sunflower inbred lines. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 12, p. 1987-1994, 2001.

WADT, L. H. de O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) visando seu uso e conservação.** 2001. 162 p. Tese (Doutorado em Agronomia / Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

WARD, O. P. **Biotecnologia de la fermentação:** princípios, processo e productos. Tradução de Miguel Calvo Rebollar e Emilia Sevillano Calvo. Zaragoza: Acribia. Canadá: Open University Press, 1991. 265 p. Tradução de Fermentation Biotechnology.

WENÍGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 78, n. 2/3, p. 193-200, Dec. 2001.

WHATLEY, J. M.; WHATLEY, F. R. **A luz e a vida das plantas.** São Paulo: EPU-EDUSP, 1982. 101 p. (Tema de Biologia, 30)

WIDHOLM, J. M. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. **Stain Technology**, Baltimore, v. 47, n. 4, p. 189-194, 1972.

WILSON, J. R. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. **Journal Agricultural Science**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 173-182, Apr. 1994.

WILSON, J. R. Organization of forage plant tissues. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. et al. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1993. p. 1-32.

YEO, U-DONG.; KOHMURA, H.; NAKAMURA, N.; SAKARAI, I. Quantitative and qualitative changes of cell wall polysaccharides during somatic embryogenesis and plantlet development of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 39, n. 6, p. 607-614, June 1998.

YUNCKER, T. G. **The Piperaceae of Brazil**. São Paulo: Hoehnea, 1972. v. 2, p. 1-266, 1972.

CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES NO TAMANHO E VIABILIDADE DE CÉLULAS E NOS TEORES DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS E NÃO-ESTRUTURAIS E ELEMENTOS MINERAIS DE CALOS DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)

RESUMO

SANTIAGO, Edson José Artiaga de. **Alterações no tamanho e viabilidade de células e nos níveis de carboidratos estruturais e não-estruturais e elementos minerais de calos de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle)**. 2003. Cap.2. p.35-111. Tese (Doutorado em Agronomia / Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) é uma espécie nativa da Amazônia que contém níveis altos de safrol nas folhas. Esse trabalho visa descrever as alterações nos valores dos diâmetros e viabilidade dos protoplastos, assim como modificações nos teores de carboidratos estruturais, não-estruturais e elementos minerais constituintes durante o desenvolvimento de calos com alta (ACR) e baixa (BCR) capacidade de regeneração. Os calos foram induzidos de segmentos foliares de plântulas germinadas *in vitro* em meio de cultura MS suplementados com concentrações de auxinas (2,4-D e ANA) e citocinina (BAP). Realizou-se análise citológica, bioquímica e dos elementos minerais. Os dados relativos ao crescimento de calos apresentaram três fases: de crescimento lento, ativo e de estabilização. O azul de metileno separou as duas classes de calos, ACR e BCR, indicando a perda de viabilidade ao longo do desenvolvimento da massa celular. O diâmetro dos protoplastos em calos com ACR foi de aproximadamente 25µm e nos de BCR foi acima de 35µm. Os teores de açúcares solúveis totais, proteínas, amido, celulose e hemicelulose foram superiores em calos com ACR, e os da pectina solúvel teve uma tendência no aumento com o período de cultivo. Os teores de cálcio, cobre, zinco, manganês e ferro foram superiores em calos com ACR. Neste contexto, calos com alta capacidade de regeneração são devidos ao maior teor de cálcio, à maior solubilização de pectinas e à maior reserva energética (amido). Os teores de nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio tenderam a decrescer com o período de

* Comitê Orientador: Renato Paiva, PhD (Orientador) - UFLA, Dr. Marcelo Murad Magalhães – UFLA/CNPq-Projeto Genoma.

cultivo, caracterizando um “efeito de diluição”. Já a concentração de cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco acompanhou o aumento na produção de matéria seca, explicada pela pouca mobilidade e translocação dos mesmos para as partes em crescimento no tecido vegetal.

Termos para indexação: *Piper hispidinervium*; calos; tamanho e viabilidade celular; elementos minerais.

ABSTRACT

SANTIAGO, Edson José Artiaga de. **Size and cells viability of the structural and non-structural carbohydrates and mineral elements levels alterations of long pepper (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle) callus.** Chapter 2, 2003. p.35-111. Thesis (Doctorate in Crop Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The long pepper (*Piper hispidinervium* C. DC.) is an Amazon native species that high safrole levels in leaves. The objective of this work was to describe the diameter and protoplast viability alterations, as well as to determine the structural and non-structural carbohydrates and mineral elements modifications of callus with high (HRC) and low (LRC) regeneration capacity. Callus was induced from leaf segments of in vitro germinated plantlets in the presence of auxin (2,4-D and NAA) and cytokinin (BAP). Cytological, biochemical and mineral analysis were made. The callus growth curve showed three phases: slow, active and stable. The use of methylene blue was able to separate HRC from LRC callus and indicate loss of viability during cell development. The protoplast diameter of HRC callus was 25µm and LRC was higher than 35µm, respectively. The total sugars, starch, cellulose, hemicelluloses and pectic substances levels were higher in HRC calluses, as well as calcium, manganese, copper, zinc and iron levels. Since HRC callus presented higher calcium levels and pectin solubilization was capable to maintain higher cellular division activity. The nitrogen, phosphorus, potassium and magnesium levels decreased during the cultivation period, showing the dilution effect. The calcium, copper, iron and manganese levels followed the increase in dry matter due a low mobility and translocation of these minerals to growing areas of the plant.

Index Terms: *Piper hispidinervium*; callus; size and viability cellular; mineral elements.

* Guidance Committee: Renato Paiva, PhD (Major Professor) - UFLA, Dr. Marcelo Murad Magalhães – UFLA/CNPq-Projeto Genoma.

1 INTRODUÇÃO

No início da década noventa, arbustos da família Piperaceae tornaram-se fontes de pesquisas na floresta úmida da grande Amazônia e da América Central. Dentre eles destaca-se a pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle), que contém alto teor de safrol nas folhas (Maia et al., 1987). Santiago (1999) registra que essa espécie possui potencial para cultivo em áreas com instalações para colheita, transporte e industrialização, e neste sentido a espécie está sendo estabelecida em vários locais no Brasil, visando obter informações relacionadas às características de crescimento e rendimento de biomassa.

O safrol é uma importante matéria prima para a química industrial. Sua extração até 1990 era feita da canela (*Ocotea odorifera*), o que levou ao comprometimento da espécie devido à extração destrutiva. Como consequência disso, ocorreu uma drástica redução na produção brasileira de safrol. Assim com a proibição da extração da canela, outras fontes de safrol começaram a ser pesquisadas, sendo a pimenta longa objeto de estudo em alguns laboratórios brasileiros pela potencialidade em produzir safrol (Pescador et al., 2000). Rosa et al. (2000) relatam que o safrol apresenta comprovada atividade carcinogênica *in vitro*, é de grande importância científico-tecnológica como precursor de uma variedade de compostos, notadamente fármacos, bioinseticidas biodegradáveis, fixadores de aroma e, mais recentemente, de drogas antitrombóticas e auxinas endógenas.

As formas mais comuns de utilização de plantas com fins terapêuticos no mundo inteiro são aquelas oriundas das tradições milenares da China e Índia, as quais são praticadas pela população rural mais carente e pelos povos indígenas (Rocha & Ming, 1999). A disseminação do uso de determinadas partes de

plantas consideradas de uso fitoterápicos tem resultado em intenso extrativismo, colocando em risco de extinção inúmeras espécies nativas, causando distúrbios ecológicos e o desaparecimento de germoplasmas valiosos, cujo potencial farmacológico e químico não pôde sequer ser estudado. A reprodução dessas espécies é indispensável, inclusive para preservação da biodiversidade nativa.

A propagação de espécies arbóreas que contêm substâncias bioativas freqüentemente constitui um desafio com limitações devido à sua germinação irregular, ao desenvolvimento lento de propágulos e à relativa dificuldade de manipulação, reduzindo as chances do uso industrial. Os laboratórios de micropropagação comercial utilizam quatro métodos básicos para multiplicar plantas *in vitro*: aumento de brotações axilares, segmentos nodais, brotações adventícias e embriogênese somática (Santiago et al., 2001). Segundo os autores, a redução dos custos de produção e a identificação de produtos, os quais são diferenciados pelo seu valor econômico, são estádios críticos para que a micropropagação possa ser expandida comercialmente.

Nesse ambiente, é essencial que as células se dividam e se multipliquem ativamente, embora, de acordo com a composição do meio nutritivo, possa afetar o padrão da diferenciação (lignificação e/ou alongamento), a divisão e senescência celular. Segundo Hao et al. (2002), a liberação de células a partir de calos friáveis é mais rápida que de calos compactos, podendo apresentar morfologia, tamanho, coloração e ploidia variada, dependendo do período de cultivo e composição do meio nutritivo. Pescador et al. (2000) relatam que alta relação auxina/citocinina, a adição de outros componentes ao meio nutritivo e o genótipo favorecem a indução de calos friáveis, cuja coloração pode variar do amarelo ao bege.

Atualmente, vários estudos com células vegetais cultivadas *in vitro* têm sido relatados visando à produção de metabólitos secundários, ocasionando o desaparecimento da espécie fornecedora através do extrativismo desorganizado,

porém, não existe investigação relacionada à propagação clonal através de segmentos foliares, visando manter a extração natural (Koroch et al., 2002).

Quando o cultivo convencional é inviável, a utilização de técnicas biotecnológicas torna-se útil para a reprodução de exemplares com características desejáveis, através da capacidade de regeneração total de plantas a partir de células ou tecidos (Grattapaglia & Machado, 1999 e Santiago et al., 2001). Cada célula contém a informação genética para todas as funções, incluindo a biossíntese de metabólitos secundários; metabólitos esses, que são industrialmente explorados nos tecidos vegetais (raiz, caule, folha, inflorescência, flor, etc...), embora muitas vezes sua origem de formação continua desconhecida. Dessa forma, protoplastos (células individuais desprovidas de membrana celular) de vários explantes diferenciados podem ser regenerados formando plantas intactas. A totipotência, peculiar às células somáticas vegetais, permite que elas se dividam, se diferenciem em plântulas e expressem capacidades morfogênicas e bioquímicas especializadas, quando cultivadas sob condições apropriadas (Komamine et al., 1992)

A cultura *in vitro* de plantas é uma técnica que não apenas apresenta importância prática na área agrícola e florestal, mas também na científica básica. Dentro do campo da biologia de plantas talvez seja uma das técnicas mais polivalentes. Assim, através da cultura de protoplastos, Carneiro et al. (1999) relatam que se pode hibridizar variedades diferentes, vencendo barreiras genéticas. Para esses autores, a embriogênese somática pode fornecer grandes quantidades de plântulas que podem servir de base para plantios no campo, tanto na área agrônômica quanto na florestal e na horticultura. Cid (2001) reporta que no campo da aplicação básica, a cultura de tecidos dá suporte técnico também à bioquímica, à fisiologia vegetal, à fitopatologia e à citogenética com princípios citológicos.

Apesar das aplicações promissoras dessa espécie, os estudos relativos à

caracterização de protoplastos oriundos de calos ainda são praticamente inexistentes. O conhecimento de características tais como o diâmetro e a viabilidade dos protoplastos pode favorecer subsídios para selecionar material genético com maior capacidade embriogênica ainda na fase de calos. Estudos recentes com protoplastos de citros (Hao et al., 2002) mostraram que protoplastos com diâmetro de aproximadamente 25µm possuem maior potencial embriogênico do que aqueles com mais de 40µm de diâmetro. A viabilidade dos protoplastos serviu como uma análise quantitativa sobre a capacidade daquela massa de células de se dividir e se diferenciar posteriormente. O azul de metileno é um corante que tem sido usado em teste de viabilidade celular em cebola (Enciclopédia Microsoft Encarta, 1999), alho (Marques et al. 1999), leveduras (Smart et al., 1999; Boyd et al., 2002) e bactérias (Weniger et al., 2001).

A complexidade de estrutura e composição da parede celular tem sido objeto de estudo de muitos autores, sendo que os polissacarídeos pécticos são os componentes mais estudados, estando envolvidos na modificação destes componentes, nas variações de pH, íons Ca^{+2} e hormônios, aumentando, assim, a complexidade dos eventos durante o crescimento celular (Robert & Roland, 1998; Rose & Bennet, 1999).

É também aconselhável a realização de análises bioquímicas para assegurar a separação dos calos com alta e baixa capacidade de regeneração. Os metabólitos primários são essenciais à manutenção da atividade celular por serem precursores de macromoléculas ou atuarem como reservas energéticas. São derivados de compostos carbonados (carboidratos) e nitrogenados (aminoácidos) que são assimilados pelos microrganismos como fontes de nutrientes (Ward, 1991). Durante o desenvolvimento dos calos, os produtos do metabolismo secundário têm sua origem no final da fase exponencial e predominam durante a fase estacionária, sendo estruturalmente, derivados dos

produtos do metabolismo primário (Ward, 1991; Demain, 2000).

A determinação dos tipos e dos níveis de carboidratos é de importância fundamental em calos considerados de alta capacidade de regeneração, indicando potencialidades industriais na produção de plantas clonadas. As alterações mais acentuadas nos níveis de carboidratos estruturais ocorrem na fase de crescimento ativo, durante a formação de paredes celulares (McKee et al., 1955).

Esse estudo sobre a caracterização de macro e micronutriente em calos de pimenta longa abre perspectivas para o entendimento de organogênese e, futuramente, de embriogênese somática. Numa próxima etapa serão avaliados mais detalhadamente os efeitos do cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco no processo de organogênese dessa espécie. Estratégia semelhante e recente tem sido usada em girassol (*Helianthus annuus* L.) por Vasic et al. (2001), segundo os quais os macros e micronutrientes estão fornecendo subsídios para separar genótipos com ativadores enzimáticos.

A dinâmica da composição mineral é uma área de particular importância, pois os íons inorgânicos estão envolvidos em vários processos associados ao crescimento e desenvolvimento, ocasionando uma desordem fisiológica (Johnson et al., 1987; Monro & Lee, 1987). O cálcio está relacionado com eventos morfogênicos vegetais por ser indutor do estabelecimento da polaridade celular, que é considerada por diversos autores como a primeira etapa no estabelecimento da embriogênese, atuar na formação da parede celular, no processo de divisão celular e como um dos principais agentes de tradução de sinais endógenos (Grover et al., 1998).

As modificações da textura de calos em desenvolvimento, provenientes de segmentos foliares, são decorrência de eventos morfológicos e bioquímicos na parede celular, que ainda não foram totalmente esclarecidos. A caracterização do perfil desses constituintes básicos da parede celular em calos classificados

com alta e baixa capacidade de regeneração poderá fornecer informações sobre seqüências alvo para um futuro programa de marcadores moleculares visando à seleção precoce de material com alta capacidade embriogênica, haja vista que até o presente momento não existem informações nesse sentido para esta espécie. Devido à aplicação comercial das piperáceas para produção de princípios ativos, a obtenção de uma massa de célula com alta capacidade de divisão celular é de suma importância para maximizar o processo produtivo.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi otimizar as condições do meio de indução visando obter calos friáveis de pimenta longa a partir de segmentos foliares e descrever as alterações nos valores dos diâmetros e viabilidade dos protoplastos, assim como, modificações nos teores de carboidratos estruturais, não-estruturais e elementos minerais durante o desenvolvimento de calos diagnosticados com alta e baixa capacidade de regeneração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

O experimento foi conduzido nos laboratórios de Propagação de Plantas, Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, Citogenética e Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

2.2 Desinfestação de sementes, semeadura e obtenção do explante

Foram utilizadas sementes de pimenta longa, fornecida pela Embrapa Amazônia Oriental, para obtenção de plântulas a serem utilizadas como fonte de explantes para o cultivo *in vitro*. Estas foram desinfestadas em solução comercial de hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v), acrescida de uma gota de “Tween-20” por 100mL de solução desinfetante, durante 10 minutos, sob agitação, e lavadas quatro vezes em água destilada e esterilizada. Foi utilizado o meio MS (Murashige & Skoog, 1962 – Tabela 1) a meia força, sem suplementação de reguladores de crescimento, para a germinação. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 e solidificado com ágar a 0,7%. Após a semeadura, as sementes foram mantidas em ambiente de sala de crescimento com as seguintes condições microclimáticas: temperatura do ar de 26⁰C, umidade relativa do ar de 70%, fotoperíodo de 16h/8h (claro / escuro) sob densidade de fluxo de fótons 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 12 dias de germinação, quando as sementes apresentavam 0,5cm de protusão do sistema radicular, as plântulas foram transferidas para o meio MS completo, procedendo-se à repicagem para tubos de ensaio medindo (25 x 150 mm), contendo 15 mL de meio de cultura, em condições assépticas para o estabelecimento *in vitro*. Após a repicagem, as plântulas foram conduzidas para sala de crescimento, cujas condições de ambiente foram as mesmas usadas durante a germinação.

TABELA 1 Composição química do meio nutritivo de Murashige & Skoog (1962) e suas respectivas concentrações, utilizadas nos experimentos com pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.

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

2.3 Obtenção do meio de cultura para indução de calos friáveis

Para a indução de calos, utilizou-se o primeiro par de folhas emitidas pelas plântulas após 28 dias de estabelecimento, seccionado em discos foliares ($\pm 1\text{cm}^2$) e utilizado como explante, procedendo-se à inoculação desses segmentos foliares em tubos de ensaio medindo 25 mm de diâmetro por 150 mm de comprimento, contendo 15 mL de meio de cultura de cada tratamento (Tabela 2), em condições assépticas. Após a inoculação, os explantes foram

mantidos em sala de crescimento, cujas condições de ambiente foram as mesmas usadas durante a germinação.

TABELA 2 Composição dos meios de cultura utilizados para indução de calos em discos foliares de plântulas de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Meio de cultura	Reguladores de crescimento (μM)		
	ANA	BAP	2,4-D
MS ₀ (Controle)	0,000	0,00	0,000
MS ₁	2,685	4,44	9,045
MS ₂			18,090
MS ₃			27,135
MS ₄		8,88	9,045
MS ₅			18,090
MS ₆			27,135
MS ₇	5,370	4,44	9,045
MS ₈			18,090
MS ₉			27,135
MS ₁₀		8,88	9,045
MS ₁₁			18,090
MS ₁₂			27,135

As diversas combinações dos tratamentos constaram da interação, pré-estabelecidas em experimentos teste, das auxinas ANA (ácido α -naftalenoacético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) com as citocininas BAP (6-benzilaminopurina), CIN (cinetina) e TDZ (thidiazuron uréia), dados não descritos com objetivo de se obter melhor biomassa, friabilidade e eliminação do escurecimento dos calos. Entretanto, nenhum outro resultado foi melhor do que o apresentado no Tabela 2.

2.3.1 Delineamento experimental

O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado com 13 tratamentos e 20 repetições, mostrados no Tabela 2. Cada parcela experimental constou de dez tubos de ensaio, cada um contendo um

explante. Todas as operações de transferência dos explantes nos meios de cultura foram realizadas em condições assépticas. Nesta fase, foi feito o registro do crescimento dos calos formados a partir do 7º dia após a inoculação até ao 63º dia de cultivo contínuo, e as variáveis de respostas dos tratamentos foram avaliadas através das características morfogênicas: coloração e textura dos calos e a porcentagem de explantes calejados e não-calejados ou oxidados, bem como o peso de matéria fresca e seca dos calos. Esta última variável de resposta foi obtida após a secagem do tecido fresco em estufa de ventilação forçada a 70°C até o peso constante.

2.3.2 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão através do programa estatístico SISVAR 4.0 (Ferreira, 2000), enquanto que os efeitos dos tratamentos foram estudados através da comparação de médias pelo teste de Scott & Knott (1974) ao nível de 5% de significância.

2.4 Desenvolvimento dos calos

O tratamento que melhor induziu calos (M_6), mostrado no Tabela 2, teve a seguinte composição: suplementado com 18,090 μ M de 2,4-D + 8,88 μ M de BAP + 5,37 μ M de ANA, a fim de obter quantidades suficientes dessa massa de célula durante o desenvolvimento, partindo de segmentos foliares de pimenta longa visando os experimentos das análises da curva de crescimento, citológica, química e elementos minerais. O mesmo procedimento para indução de calos nesta etapa foi mantido, de modo a obter uniformidade nos dados, analisados quanto aos parâmetros investigados relacionados aos objetivos do nosso trabalho. A partir do desenvolvimento dos calos, foram definidos intervalos de sete dias, após a inoculação, para a coleta dos materiais utilizados nas avaliações, sendo os dados analisados, descritos e submetidos à análise de

regressão através do programa estatístico SISVAR 4.0 (Ferreira, 2000), enquanto os efeitos dos tratamentos foram estudados através da comparação de médias pelo teste de Scott & Knott (1974) ao nível de 5% de significância.

2.5 Estabelecimento da curva de crescimento

A curva de crescimento de calos da pimenta longa foi determinada pelo acompanhamento do desenvolvimento dos calos, descrito no item anterior. O experimento foi conduzido sob delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 20 repetições e mantido em ambiente de sala de crescimento com as seguintes condições microclimáticas: temperatura do ar de 26 °C, umidade relativa do ar de 70 %, fotoperíodo de 16h/8h (claro/escuro) sob densidade de fluxo de fótons 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 e solidificado com ágar a 0,7% (p/v).

Os calos foram pesados a intervalos de sete dias, durante 63 dias, totalizando 10 períodos. Em cada período, foram avaliados quanto à coloração e peso de matéria fresca dos calos formados. Após a determinação do peso fresco (PF), os calos foram colocados em estufa de ventilação forçada a 70 °C, até obtenção do peso constante, para determinar o peso seco (PS).

2.6 Determinação do número, diâmetro e viabilidade de células nos calos

Para a determinação do número de células nas amostras coletadas aos 0; 7; 14; 21; 28; 35; 42; 49; 56 e 63 dias de desenvolvimento, foram utilizados 100 mg de calos previamente armazenados a -80 °C. Os calos foram descongeladas gradualmente, por 30 minutos, em -20 °C; 0 °C; 4 °C e temperatura ambiente, e imediatamente fixados, em tubos de Eppendorf, numa solução de ácido acético e etanol 95% (v/v) na proporção de 1:3 por 24 horas (Pinto, 1985).

O procedimento de Rijven & Wardlaw (1966) foi seguido com algumas

modificações sugeridas por Pinto (1985). Após a fixação, agitou-se manualmente a amostra, fez-se a centrifugação a 1300 rpm (± 100 g) por 10 minutos e retirou-se o sobrenadante (fixador). Em seguida, adicionaram 800 μ L de sorbitol (0,5M), agitando-se pausadamente e realizando-se duas lavagens sucessivas após o período de repouso de 15 minutos, respectivamente. Logo após, retirou-se o sobrenadante total (sorbitol), fez-se a hidrólise em HCl 1N (1 mL) e as amostras foram colocadas em repouso na geladeira (4 °C) por 15 minutos. Em seguida as amostras foram transferidas para banho-maria a 60 °C por 10 minutos, sob agitação (100 rpm). Logo após a decantação, substituiu-se o sobrenadante (HCl) por sorbitol (0,5M), agitando-se manualmente e mantendo a mistura em repouso por 15 minutos. As amostras foram lavadas em solução de sorbitol (0,5M) por três vezes a cada 15 minutos, com agitação manual seguida da decantação, obtendo-se uma alíquota homogeneizada que foi pesada e comparada ao peso inicial.

Dessa alíquota, foi retirada outra alíquota de 200 μ L, a qual foi pesada e adicionada de 200 μ L de extrato enzimático, pectinase 2% (p/v) + celulase 20% (p/v), dissolvidos em tampão citrato 0,1 M, o pH foi ajustado para 4,5, contendo 24 unidades de enzima por miligrama de amostra. A mistura foi inoculada em banho-maria a 37 °C sob agitação por 1 hora. Em seguida, ficou em repouso na geladeira (4 °C) por 5 minutos e, posteriormente, foi lavada em solução de sorbitol (0,5M a 4 °C) por cinco vezes a cada 15 minutos. Da suspensão de células lavadas tomaram 100 μ L e adicionaram 100 μ L da solução de azul de metileno (azul de metileno 0,1 g L⁻¹ + citrato de sódio 20 g L⁻¹), utilizada como indicador da viabilidade celular (Fink & Kuhles, 1933), obtendo-se um fator de diluição (*fd*) igual a 45, procedimentos ajustados de Dias (2001). A partir dessa mistura, alíquotas de 12 μ L foram aplicadas na câmara de Neubauer (hemacitômetro) e, após 1 minuto de repouso para a sedimentação das células, foi feita a contagem em microscópio óptico de campo claro Zeiss Jena com

aumento de 400 vezes. O número de células viáveis, inviáveis e totais e o diâmetro equatorial e polar das células, nos diferentes períodos de indução de calos, foram registrados em cinco dos 25 quadrículos do quadrante central da câmara. O número de células foi calculado pela seguinte fórmula recomendada pelo fabricante (Bio-Rad Laboratories, 1992).

$$NC = \frac{\sum nq \times 25 \times fd \times 10^4}{n}$$

NC = Número de células;

$\sum nq$ = soma algébrica do número de células contadas nos n quadrículos;

25 = número total de quadrículos na câmara;

fd = fator de diluição utilizado;

10^4 = constante padrão da câmara;

n = número de quadrículos contados, dentro dos 25 disponíveis.

As variáveis de respostas (número de células viáveis, não viáveis e totais como também o diâmetro polar e equatorial) foram interpretadas por meio da análise de variância e as médias, comparadas de acordo com o teste Scott-Knott a 5% de significância.

2.7 Determinação de carboidratos não-estruturais totais e amido

Aproximadamente 1 g da matéria fresca das amostras de cada período de indução de calos foi descongelado e homogeneizado em microtritador do tipo Polytron à temperatura ambiente. A homogeneização foi feita com 15 mL de água, sendo que 5 mL foram utilizados para a lavagem do blender do microtritador. O tempo de homogeneização foi de um minuto, utilizando-se a velocidade máxima. O extrato obtido foi posteriormente levado ao banho-maria

a 40 °C com agitação, durante uma hora. Logo após, foi feita a centrifugação à 3000G, por 20 minutos. O sobrenadante obtido teve seu volume final ajustado para 15 mL e dele foram retiradas as alíquotas para quantificação dos açúcares solúveis totais pelo método da antrona (Dische, 1962). Pela diferença entre o teor de açúcares solúveis totais, no mesmo extrato aquoso, os açúcares redutores foram quantificados pelo método de Nelson (1944).

O precipitado foi homogeneizado com 15 mL de tampão acetato de potássio 0,1M, pH ajustado para 4,8 e colocado em banho-maria a 40 °C sob agitação por quinze minutos. Em seguida foram adicionados 2 mL do extrato da enzima amiloglucosidase, contendo 12,6 unidades da enzima em cada amostra e colocado para incubar em banho-maria por 2 horas a 40 °C. Posteriormente o extrato foi centrifugado a 3000G, por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e seu volume final ajustado para 20 mL quando então foram retiradas alíquotas para quantificação do amido pelo método da antrona (Dische, 1962). Para açúcares solúveis totais, açúcares redutores e amido foi utilizada uma curva-padrão de glicose (0 a 100 µg).

2.8 Determinação das proteínas

Do material descongelado, aproximadamente 150 mg de calos foram coletados e macerados em gral de porcelana com 5 mL da solução de extração tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH ajustado para 6,5. Após a maceração, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos, obtendo-se o extrato bruto. No sobrenadante, as proteínas solúveis totais foram quantificadas a partir de alíquotas de 50 µL do extrato a 4,5 mL de solução de coomassie (10 mg de coomassie brilliant blue em 5 mL de etanol), determinadas pelo método de Bradford (1976), ajustado a uma curva-padrão utilizando solução padrão BSA (0,5 mg de BSA mL⁻¹ de NaCl 0,5 M). A leitura foi realizada em comprimento de onda de 595 nm após 30 minutos de reação.

2.9 Extração e doseamento dos compostos de parede celular

A parede celular de calos formados nos períodos de desenvolvimento, foi extraída como descrito por Mitcham & McDonald (1992) com algumas modificações. Após a secagem a 70 °C em estufa de ventilação forçada até obtenção do peso constante, a massa de células foi triturada em homogeneizador de tecidos (Polytron – Tekmar Company) com tampão fosfato a 0,1 M e pH ajustado para 7,5 (300 mL) com adição de 0,02 % de azida sódica, 1 % de dodecilsulfato de sódio (SDS) e 1 % (v/v) de 2-mercaptoetanol. Após a homogeneização, o extrato foi deixado em repouso a 40 °C por 2 horas e depois filtrado. O resíduo foi lavado com o mesmo tampão fosfato a 0,1 M e pH ajustado para 7,5 e filtrado a vácuo. Adicionou-se 200 mL da mistura fenol:ácido acético:água (2:1:1) permanecendo a amostra em repouso por 20 minutos. Lavou-se novamente o resíduo com o tampão fosfato. O resíduo foi ressuspense em 150 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) 9:1, aquecido a 100 °C por 30 minutos e mantido em repouso durante a noite, em temperatura ambiente. Após a homogeneização com cerca de 150 mL de tampão acetato (0,1 M, pH ajustado para 5,0), seguida de lavagem extensiva com água destilada, filtrou-se o material a vácuo. Para desamilificação, o resíduo contendo a parede celular isolada foi ressuspense em 100 mL de solução de amiloglucosidase 220 mg 100 mL⁻¹ (6300 unidades g⁻¹) em tampão acetato de sódio, pH 4,5 e incubado a 55 °C por 2 horas. Em seguida, a mistura foi lavada com água filtrada e destilada. Este resíduo contendo o material da parede celular foi submetido ao teste do iodo com KI/I₂ para verificar a ausência de amido. Posteriormente, foi ressuspense em 50 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (1:1 v/v) e filtrado a vácuo, seguido de três lavagens com 200 mL de acetona. O resíduo, após secagem à temperatura ambiente, constituiu o material de parede celular.

2.9.1 Doseamento dos açúcares totais não celulósicos

O teor de açúcares totais não-celulósicos da parede celular foi avaliado pelo método de antrona (Southgate, 1991). O material da parede celular isolado foi submetido ao tratamento com TFA (ácido trifloroacético) 2 N a 121 °C por uma hora. Evaporou-se o TFA e o resíduo foi submetido a três lavagens sucessivas utilizando-se 1 mL de água destilada e centrifugação. Os três sobrenadantes obtidos (lavagem I, II e III) foram utilizados para determinar o teor de açúcares totais não-celulósicos e os resíduos utilizados para determinar os teores de celulose.

2.9.2 Substâncias pécnicas

Foram extraídas segundo a técnica adaptada por McCready & McComb (1952) e analisadas pela técnica modificada por Bitter & Muir (1962):

a) Pectinas totais

Para a quantificação das substâncias pécnicas totais contidas na parede celular, amostras foram homogeneizadas (Polytron) em 25 mL de etanol 95 % (v/v), deixadas em repouso por 30 minutos em geladeira e filtradas a vácuo. O resíduo do filtrado (açúcares) foi submetido a duas lavagens sucessivas com 10 mL de etanol 75 % e, em seguida transferiu-se o precipitado para um becker, contendo cerca de 50 mL de solução de Versene (5 g do sal tetrassódico de EDTA e completar para 1000 mL de água destilada), ajustou-se o pH para 11,50. Posteriormente, deixou-se em repouso por 30 minutos em geladeira e o pH foi ajustado para 5,0 com ácido acético glacial (± 3 gotas) e adicionou-se 100 mg de pectinase (100 unidades) em agitação por 1 hora, completando-se para 100 mL em balão com solução versene (0,5%) e filtrou-se. O filtrado foi utilizado para o doseamento conforme uma curva-padrão. O doseamento, baseado na curva-padrão foi feito com uma alíquota (1 mL) em tubo de ensaio, seguido da adição de 3 mL da solução de tetraborato de sódio decahidratado 0,025 M em H₂SO₄

(2,4 g 250 mL⁻¹), em banho de gelo, agitando-se os tubos levemente para evitar o aquecimento, para posteriormente, colocá-los em banho-maria com água fervente por 10 minutos. Esfriou-se em banho de gelo, e colocou-se 100 µL de carbazol (0,125 % em etanol). Agitou-se levemente evitando o aquecimento, e colocou-se em banho-maria com água fervente por 15 minutos. A coloração desenvolvida foi lida após 30 minutos de esfriamento a 530 nm.

b) Pectinas solúveis

A pectina solúvel foi obtida utilizando-se amostras homogeneizadas (Polytron) em 20 mL de etanol 95 % (v/v), deixadas em repouso por 1 hora e filtração a vácuo. O resíduo do filtrado foi submetido a duas lavagens sucessivas com 20 mL de etanol 75 % (v/v), recuperando o precipitado e transferiu-se para um becker, em seguida, adicionou-se 20 mL de água destilada e sob agitação de 1 hora para posterior filtração. O filtrado diluído foi utilizado para o doseamento conforme uma curva-padrão de ácido galacturônico. O doseamento, baseado na curva-padrão foi feito com uma alíquota (1 mL) do filtrado, seguido da adição de 3 mL da solução de tetraborato de sódio decahidratado 0,025 M em H₂SO₄, (2,4 g 250 mL⁻¹), em banho de gelo, agitando-se os tubos levemente para evitar o aquecimento, para posteriormente, colocá-los em banho-maria com água fervente por 10 minutos. Esfriou-se em banho de gelo, e colocou-se 100 µL de carbazol (0,125 % em etanol). Agitou-se lentamente evitando o aquecimento e, colocou-se em banho-maria com água fervente por 15 minutos. Após 30 minutos de resfriamento, obteve-se a absorbância em 530 nm. Pela porcentagem de pectina solúvel em relação a total obteve-se a porcentagem de solubilidade.

2.9.3 Hemicelulose

A fração hemicelulósica das amostras dos calos obtidos nos períodos de desenvolvimento foi determinada seguindo as recomendações de Albersheim et al. (1967) e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem do

material de parede celular. No precipitado, resultante da extração do oxalato de amônia 0,5 % na obtenção das substâncias pécica, foi adicionado 40 mL de uma solução de KOH (2 M), permanecendo a mistura em atmosfera de nitrogênio (contendo NaBH₄ 100 mM) por 12 horas. Após a filtração a vácuo, ajustou-se o pH do filtrado para 7,0 a 4 °C, com posterior diálise por 24 horas e liofilização, originando assim a fração hemicelulósica.

2.9.4 Celulose

O conteúdo de celulose das amostras foi determinado colorimetricamente pelo método da antrona, conforme Southgate (1991), a partir de alíquotas de 0,1 mL, utilizando-se como padrão celulose microcristalina (Avicel – Merck). Amostra (2 mg) do resíduo final de parede celular da determinação de açúcares totais, após liofilização, foi submetida à hidrólise com ácido sulfúrico 72 % (v/v) (3 mL), em banho de gelo com agitação intermitente por 10 minutos. O extrato foi diluído para 2 mL com água destilada.

2.9.5 Determinação das frações de fibras.

A determinação de fração de fibras (FDN – Fibras detergentes neutro e FDA – Fibras detergente ácido) foi feita seguindo a metodologia descrita por Van De Kramer & Van Ginkel (1952).

A fibra detergente neutro (FDN) foi determinada utilizando 500 mg da massa seca de calos, previamente triturada em moinho com peneira de 20 mesh, em tubo tecnal. Adicionaram 25 mL da solução detergente neutro (74,44 g de EDTA di-sódico + 27,24 g de tetraborato de sódio em 1000 mL de água destilada + 120 g de sulfato láurico de sódio + 40 mL de metoxietanol - metil glicol, dissolver em 800 mL de água destilada + 18,24 g de fosfato ácido de sódio diluído em 800 mL de água destilada. Essas soluções foram diluídas em 4000 mL de água destilada e fervida durante 10 minutos). Em seguida,

adicionou-se 0,2 mL de decaidronaftaleno (decalina), solução antiespumante, para adicionar em seguida 0,5 g de sulfito de sódio. Na etapa seguinte, o tubo bem vedado foi levado ao digestor em temperatura de 100 °C durante 1 hora. Imediatamente, foi realizada a filtração em cadinho, previamente pesado, por sucção. O resíduo foi lavado com água fervente e em seguida, com 20 mL de acetona. O cadinho foi colocado em estufa a 105 °C durante 8 horas e, posteriormente esfriado em dessecador seguido de pesagem. O teor de FDN foi calculado pela expressão:

$$FDN = [(cadinho + resíduo) - cadinho] / (peso da amostra) * 100$$

Fibra detergente ácido (FDA) foi determinada utilizando-se 500 mg da massa seca de calos, previamente triturada e selecionada em peneira de 20 mesh. Adicionaram 25 mL da solução detergente ácida (20 g de Brometo-Cetil-Trimetilamônio – CTAB em 1000 mL de ácido sulfúrico 1 N). Em seguida, adicionou-se 0,2 mL de decaidronaftaleno (decalina), solução antiespumante. Após a vedação os tubos foram submetidos a um refluxo em digestor a 100 °C durante 1 hora. Imediatamente, foi realizada a filtração em cadinho, previamente pesado, por sucção. O resíduo (fibra) foi lavado com água fervente e em seguida lavado com 20 mL de acetona. Após 8 horas a 105 °C e resfriamento das amostras em dessecador, o teor de FDA foi calculado pela expressão:

$$FDA = [(cadinho + fibra) - cadinho] / (peso da amostra) * 100$$

2.9.6 Lignina

Os teores de lignina foram determinados a partir da fibra detergente ácido, seguindo o método do permanganato de potássio (Van De Kamer & Van Ginkel, 1952). A partir de 1 g de matéria seca de calos foi colocada em cadinhos contidos numa bandeja de vidro com uma lâmina de água de 3 cm de altura. Adicionaram 30 mL de solução combinada de permanganato (5 % (p/v) em

água, e 6 g de nitrato férrico hidratado e 0,15 g de nitrato de prata - AgNO₃ em 100 mL de água destilada; adicionaram 500 mL de ácido acético glacial, 5 g de acetato de potássio e 400 mL de álcool butil terciário, na proporção 2:1 em cada cadinho, seguido de agitação por 15 minutos. Imediatamente, filtrou-se a solução combinada de permanganato, a vácuo, recolocando-a, já com a bandeja seca, onde permaneceu em repouso durante 90 minutos. Filtrou-se a vácuo, novamente, colocando-se os cadinhos numa bandeja limpa, com lâmina de água de 3 cm, e adicionaram 30 mL da solução desmineralizadora [50 g de ácido oxálico diidratado (H₂C₂O₄.2H₂O) em 700 mL de atanol 95 % (v/v), adicionando 50 mL de HCl concentrado e 250 mL de água destilada, misturando]. Após 10 minutos, filtrou-se a solução a vácuo, removendo a solução desmineralizadora, sendo que as fibras apresentaram a cor amarelada. Após duas lavagens e secagem a vácuo, procedeu-se uma lavagem com 30 mL de acetona, para posteriormente secar a 100 °C durante 8 horas, seguido de pesagem. O teor de lignina foi calculado pela expressão:

$$\text{Lignina} = [(cadinho+fibra) - (cadinho+lignina)] / (\text{peso da amostra}) * 100$$

2.9.7 Determinação dos elementos minerais.

As determinações nos teores de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fé, Mn e Zn nos calos provenientes de segmentos foliares coletados nos dez períodos (0; 7; 14; 21; 28; 35; 42; 49; 56 e 63 dias) de desenvolvimento foram efetuadas, segundo a metodologia descrita por Malavolta et al. (1997). Os extratos da matéria seca dos tecidos foram obtidos por digestão nítrico-perclórica, cuja extração foi realizada por via seca. Procedeu-se a determinação do fósforo por colorimetria com molibdato a vanadato de amônio. O cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e o potássio por fotometria de emissão de chama. Os teores de nitrogênio foram determinados pelo método semi-micro Kjeldhal.

2.10 Análises estatísticas

Foram efetuados análises de variância, posteriormente aplicadas à regressão polinomial para as variáveis de respostas obtidas nos experimentos, através do programa estatístico SISVAR 4.0 (Ferreira, 2000) e os gráficos elaborados com o software Sigma Plot 2000 versão 6.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indução e desenvolvimento de calos friáveis

Calos foram induzidos de discos foliares de plântulas de pimenta longa nas diferentes interações das concentrações de auxinas e citocinina. Porém, não houve a formação de calos quando esses reguladores atuavam isoladamente. Em todos os teste observados, a interação das auxinas ANA e 2,4-D com a citocinina BAP induziu a formação da massa de calos em mais de 50% dos explantes foliares, sendo a taxa de indução de calos dependente das concentrações aplicadas dos reguladores de crescimento (Tabela 3).

TABELA 3 Efeitos de diferentes concentrações entre auxinas e citocinina na indução de calos provenientes de discos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Reguladores de Crescimento (μM)			% de Explante produzindo Calos ¹ \pm DP	Peso da Massa Fresca de Calo ¹ (mg \pm DP)	Aparência dos Calos
ANA	BAP	2,4-D			
0	0	0	0	-	-
2,685	4,44	9,045	56,9 \pm 2,4 f	85,3 \pm 0,9 j	Fr-Vc
		18,090	73,8 \pm 1,8 d	118,5 \pm 1,2 i	Fr-Vc
		27,135	75,7 \pm 1,2 d	978,8 \pm 2,5 b	Fr-V
	8,88	9,045	89,4 \pm 1,1 b	872,5 \pm 2,3 c	Fr-Ve
		18,090	96,2 \pm 0,8 a	860,4 \pm 1,7 d	Fr-Ve
		27,135	98,3 \pm 0,5 a	1286,7 \pm 1,8 a	Fr-V
5,370	4,44	9,045	82,7 \pm 1,2 c	874,7 \pm 2,2 c	Fr-M
		18,090	73,0 \pm 1,9 d	652,6 \pm 1,8 g	Fr-Mc
		27,135	64,1 \pm 2,1 e	877,4 \pm 2,4 c	Fr-M
	8,88	9,045	58,6 \pm 0,8 f	756,7 \pm 2,1 e	Fr-Me
		18,090	57,0 \pm 1,1 f	663,7 \pm 3,4 f	Fr-Me
		27,135	53,6 \pm 1,4 f	164,3 \pm 4,1 h	Fr-Me

¹ Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$); DP=Desvio Padrão; Fr=Friável; V=Verde; Vc=Verde Claro; Ve=Verde Escuro; M=Marrom; Mc=Marrom Claro; Me=Marrom Escuro.

O efeito dos tratamentos na definição do meio apropriado para melhor formação da massa celular foi significativo (Tabela 1A-Anexo) e os calos friáveis foram induzidos com alta frequência quando as concentrações de 27,135 μ M e 2,685 μ M das auxinas 2,4-D e ANA, respectivamente, interagiram com a citocinina BAP (8,88 μ M), os quais apresentaram maior peso da matéria fresca e coloração verde (Tabela 2). Altos teores de 2,4-D em relação a BAP favorecem a friabilidade de calos, como relatam Hall & Zeroni (1980).

Em experimentos preliminares foram testadas concentrações superiores a 27,135 μ M de 2,4-D, que apresentaram tendências à oxidação possivelmente pela composição de compostos fenólicos nos tecidos foliares da pimenta longa, o que é comparável aos resultados obtidos por Liu et al. (1994), os quais relatam que, em geral, o 2,4-D reduz drasticamente a produção de compostos fenólicos na cultura, o que não ocorre quando em combinação com ANA. No entanto, Paiva Neto (1996) obteve melhor formação de calos em segmentos foliares de Moreira [*Chlorophora tinctoria* (L.) Guadichaud] quando utilizou 28,8 μ M de 2,4-D, isoladamente.

Tao et al. (2002) também observaram altas frequências na indução de calos em segmentos foliares da espécie *Citrus grandis*, em concentrações superiores a 9,1 μ M e 10,7 μ M das auxinas 2,4-D e ANA, respectivamente, porém, essas concentrações os calos apresentaram consistências e colorações diferentes. Resultados similares foram obtidos por Te-chato & Rungnoi (2000), quando investigaram a indução de embriogênese somática em segmentos foliares de *Azadirachta excelsa*, utilizando a combinação das auxinas ANA (10 μ M) e 2,4-D (1 μ M), que promoveu maior proliferação de calos, com baixa taxa de embriões somáticos; no entanto, quando a auxina 2,4-D (0,5-1 μ M) foi combinada com a citocinina BAP (2 μ M) houve a formação de alta taxa (96-99%) de embriões somáticos, resultados que podem auxiliar nos objetivos de nosso trabalho, visando também a melhor época de manejar os calos a fim de

obter propagação comercial através da organogênese indireta. Em trabalhos recentes, Alloufa et al. (1999), ao desenvolveram métodos para a obtenção de calos em acerola (*Malpighia glabra* L.) a partir de segmentos foliares cultivados em meio nutritivo de MS, concluíram que a interação de 2,4-D (0,5 e 10 μ M) e Cinetina (0,5 e 5 μ M) indicou o melhor ganho de biomassa celular. Em tratamentos testes (dados não mostrados), usou-se a cinetina interagindo com 2,4-D, contudo os resultados foram menos expressivos comparados à interação com BAP.

Os dados observados na Tabela 1 revelam que as concentrações testadas de 2,4-D em combinação com 8,88 μ M de BAP foram eficientes na formação de calos friáveis e de coloração verde quando interagiram com 2,685 μ M de ANA, mas quando a concentração de ANA foi superior, houve declínio tanto na formação como no peso dos calos e a coloração aproximando-se do marrom, indicando necrose dos tecidos formados (Figura 1).

Vários fatores podem influenciar na coloração e consistência de calos. Declerck & Korban (1996), estudando a influência de reguladores de crescimento e diferentes fontes de carbono em segmentos foliares de *Prunus persica* L. Bastsch cv. Elberta, em meio nutritivo MS com metade da concentração dos sais, constataram que a presença da citocinina TDZ produziu calos verdes e de consistência compacta e a presença auxina 2,4-D, calos friáveis de coloração verde amarelada. Ressalta-se que o uso do TDZ em combinação com 2,4-D induziu calos de boa aparência, porém o incremento foi muito inferior quando comparado à ausência de TDZ.

Esse resultado nos possibilita afirmar que a citocinina BAP foi a que melhor se destacou na formação da massa celular de pimenta longa a partir de segmentos foliares na interação com as auxinas 2,4-D e ANA.

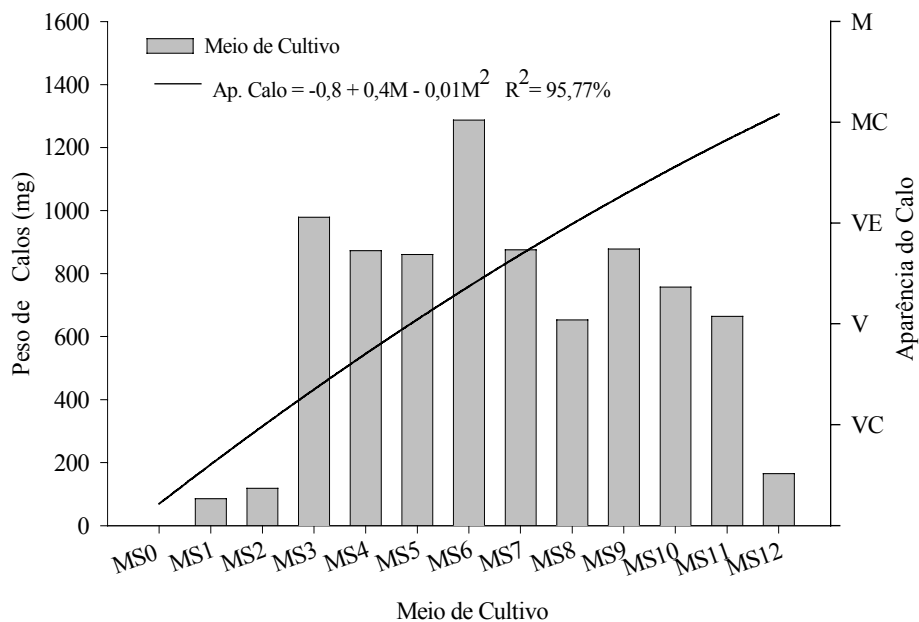


FIGURA 1 Peso e aspecto de calos friáveis (VC=Verde Claro, V=Verde, VE=Verde Escuro, MC=Marrom Claro e M=Marrom) formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa em diferentes meios de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Nesse trabalho, já foi possível promover a indução e desenvolvimento de calos em explantes foliares de plântulas de pimenta longa cultivados em meio nutritivo MS, suplementados com concentrações das auxinas (2,4-D e ANA) e da citocinina (BAP). O melhor desempenho dessas massas celulares foi observado utilizando as concentrações de 27,135; 2,285 μ M e 8,88 μ M, respectivamente, após 63 dias de cultivo contínuo, quando notou-se uma desaceleração do crescimento, necrose, escurecimento e secamento, possivelmente devido à exaustão de nutrientes, inibição da absorção de nutrientes, evaporação acompanhada pelo aumento na concentração de alguns nutrientes e acumulação de fenólicos e metabólicos, dos quais alguns podem ser

tóxicos. Resultados semelhantes também foram obtidos por Sahoo et al. (1997), Frello et al. (2002) e Koroch et al. (2002) investigando a regeneração *in vitro* de *Morus indica*, *Campanula carpatica* e *Echinacea purpurea*, respectivamente, a partir de segmentos foliares.

3.2 Análise da curva de crescimento médio da matéria seca de calos

A Figura 2 apresenta a curva de crescimento da massa celular determinada a partir de segmentos foliares de pimenta longa oriundos de plântulas germinadas *in vitro*.

O resultado da análise de variância (Tabela 1A-Anexo) detectou significância ($p < 0,05\%$) durante o ciclo de desenvolvimento dos calos e (Tabela 2A – Anexos) indicou a necessidade do regulador de crescimento para indução expressiva de calogênese em segmentos foliares de pimenta longa (Tabela 1).

Pela tendência da curva, verificou-se que a matéria seca dos calos formados, em cada período de cultivo, ajustou-se ao modelo logístico e assemelha-se aos padrões mencionados nos trabalhos de Pescador et al. (2000) e Largura et al. (2002) em pimenta longa. Na Figura 3, observa-se a partir do 21º dia após a inoculação, um incremento acentuado da matéria seca relativa até o 42º dia, para posterior decréscimo, enquanto os valores absolutos no ganho de peso da matéria seca tendem a estabilizar-se após esse período, 42º dia. Entre o 21º e o 42º dia, nota-se um comportamento linear estabilizado não havendo diferenças no ganho de matéria seca; pressupõe-se o equilíbrio no metabolismo celular favorecendo uma intensa atividade na divisão celular. Santana et al. (2001) relatam que o crescimento celular é ativo e as células adquirem competência para o procedimento da repicagem, na fase linear.

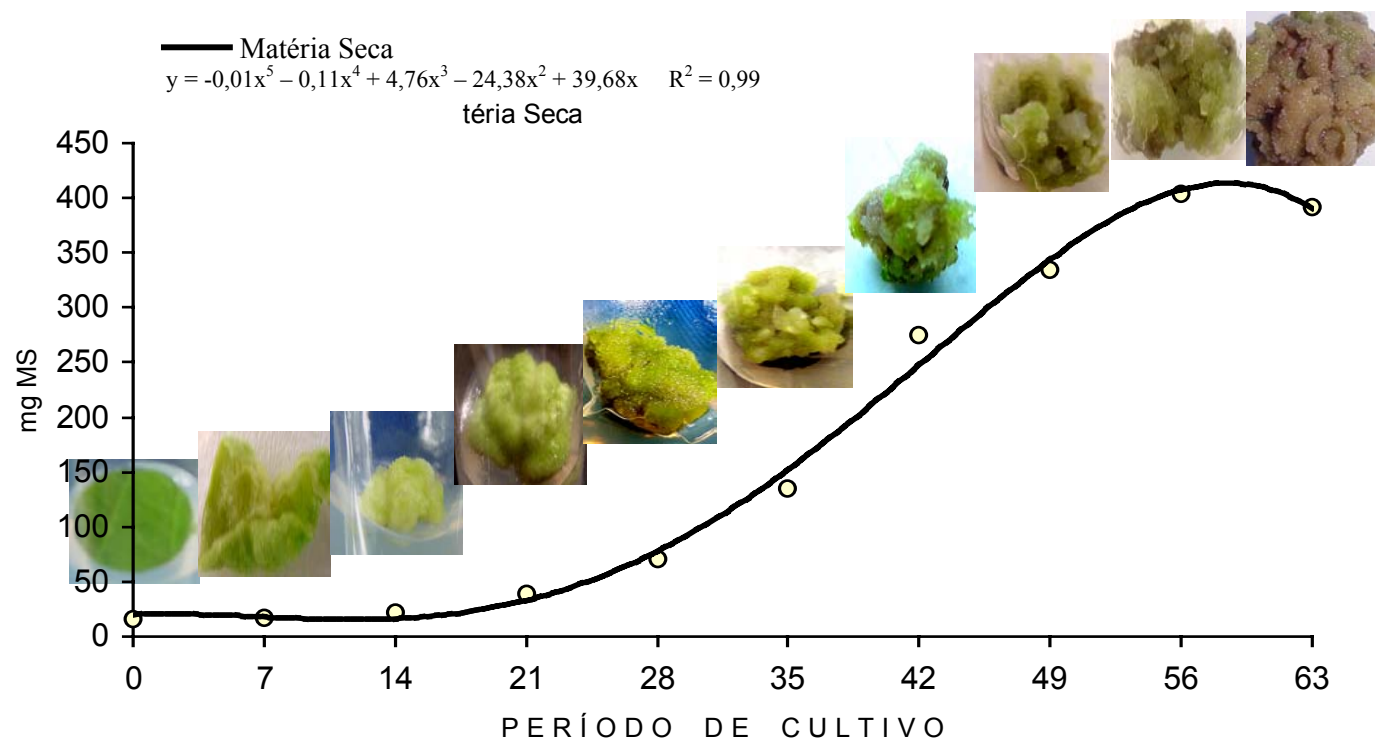


FIGURA 2 Curva de crescimento de calos de pimenta longa com base na matéria seca durante 63 dias sob cultivo contínuo. UFLA, Lavras, MG, 2003.

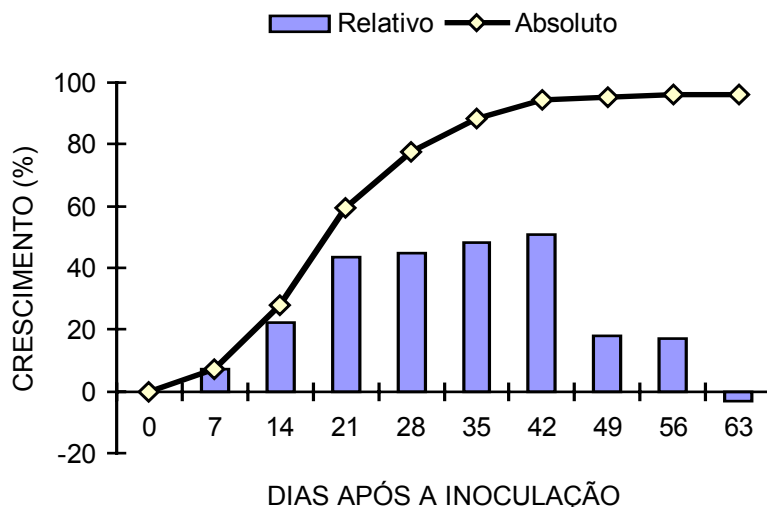


FIGURA 3 Crescimento relativo e absoluto de calos formados com base na matéria seca a partir de segmentos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Analisando a Figura 3, observa-se um aumento absoluto da concentração celular de cerca de 25,5 vezes o valor inicial, após 63 dias de cultivo, no entanto esses valores podem ser aumentados com a utilização de outras estratégias de cultivo, como em biorreatores de bancada. Em cultura de células, Pescador et al. (2000) avaliaram o crescimento celular em calos friáveis de pimenta longa durante 24 dias em ambiente contínuo e observou um aumento na concentração celular de 8,5 vezes ao valor inicial.

Embora o crescimento máximo de calos tenha sido detectado no 56º dia de cultivo (Figura 2), final da fase de estabilização, percebe-se, na Figura 3, que o declínio de matéria seca após o 42º dia foi superior a 50% e a aparência desses calos (Figura 4) tendeu ao escurecimento, possivelmente pelo decréscimo da disponibilidade de substâncias minerais e energéticas no meio de cultura. É

importante determinar o nutriente limitante na espécie em estudo, pois através desses teores nutricionais pode-se conhecer melhor o controle sobre a longevidade da fase de máxima atividade de divisão celular (Aitchison et al., 1977).

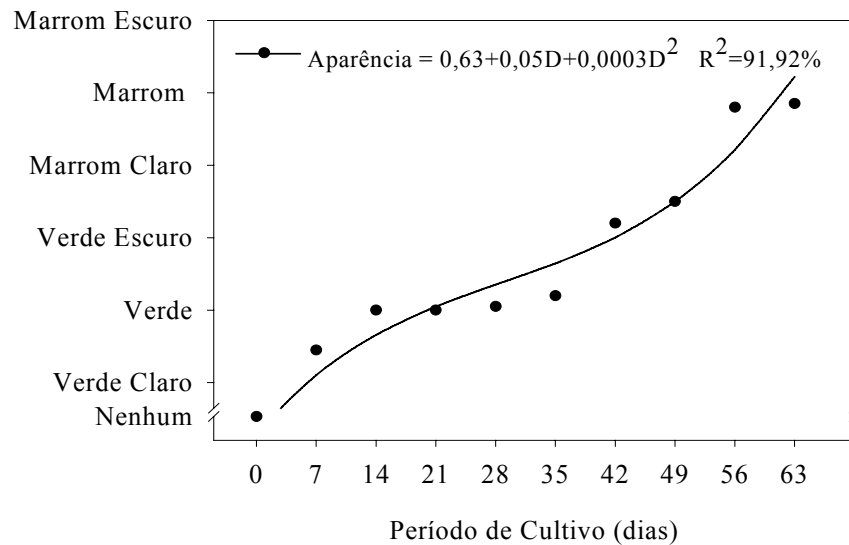


FIGURA 4 Aparência de calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa até 63 dias de cultivo contínuo. UFLA, Lavras, MG, 2003.

No presente trabalho, o ciclo de desenvolvimento de calos de pimenta longa *in vitro* foi observado em aproximadamente nove semanas de cultivo contínuo (Figuras 4). Os dados referentes ao acúmulo de matéria seca se ajustaram ao modelo logístico. Na fase observada de crescimento lento, nas três primeiras semanas, ocorreu pouco incremento de matéria seca, havendo possivelmente apenas divisão celular (Nacif, 1991; Magalhães, 1991 e Torres et al., 2001). A duração dessa fase está muito relacionada com a quantidade inicial de inóculo, sendo que maiores quantidades prolongam este período inicial

(Santana et al., 2001); por conseguinte, nesse experimento foram utilizados 85 mg de inóculo inicial, média dos segmentos foliares (período 0).

Na fase de crescimento ativo, que compreendeu do 21^o ao 56^o dia, ocorreu um incremento de 96% na matéria seca (Figuras 3 e 5). Nessa fase pode ocorrer tanto divisão celular como uma intensa absorção de solutos por parte das células, o que caracteriza a expansão do tecido.

3.3 Análises citológicas

Com o intuito de entender melhor os eventos relacionados com o desenvolvimento de calos, uma caracterização morfológica dos protoplastos de calos com alta capacidade de regeneração (ACR) e baixa capacidade de regeneração (BCR) foi realizada (Figura 5 e 6, respectivamente).

Além disso, o corante azul de metileno pode ser aplicado sobre a capacidade embriogênica em análise dessa massa de célula.



FIGURA 5 Calos de pimenta longa de coloração verde obtidos de explantes foliares classificados como de alta capacidade de regeneração (ACR). UFLA, Lavras, MG, 2003.

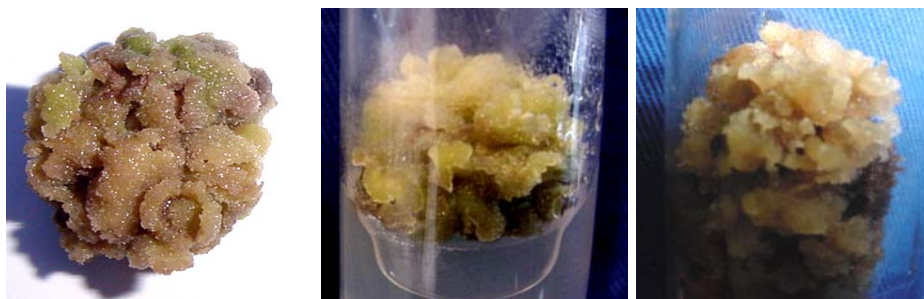


FIGURA 6 Calos de pimenta longa de coloração marrom obtidos de explantes foliares classificados como de baixa capacidade de regeneração (BCR). UFLA, Lavras, MG, 2003.

Durante a fase de crescimento lento, que ocorreu, nas três primeiras semanas de cultivo, os calos com alta capacidade de regeneração apresentaram protoplastos com um diâmetro médio em torno de 24 μm (Figura 7A), enquanto as células oriundas de calos com baixa capacidade de diferenciação possuíam um diâmetro médio de 46 μm (Figura 7B) para essa mesma fase. Essa tendência basicamente permaneceu durante a fase de crescimento ativo, do 21^o ao 56^o dia, quando os diâmetros médios dos protoplastos foram de 24 e 50 μm , respectivamente, para calos com ACR e BCR (Figura 7). É sabido que células pequenas, isodiamétricas, com núcleo volumoso e citoplasma denso, são típicas de células em divisão (Esau, 1985 e Fahn, 1988), como aquelas observadas no mesocarpo e no endocarpo do fruto de maracujá (Nacif, 1991). Em trabalho recente com protoplastos de citros visando obter linhagens diplóides e tetraplóides, os autores conseguiram separar células pelo diâmetro, sendo as linhagens diplóides classificadas na faixa de 20 a 25 μm de diâmetro médio, enquanto as poliplóides possuíam diâmetros superiores, entre 32,5 a 40 μm (Hao et al., 2002).

Os autores também utilizaram o diâmetro para distinguir células em diferentes

estádios do ciclo celular. Os marcadores celulares morfológicos também têm sido utilizados para distinguir células guardas, células epidérmicas e células do mesofilo daquelas adjacentes (Schroeder et al., 1984; e Elzenga et al., 1991). Nesta pesquisa, considerando a fase de crescimento ativo como ideal para a repicagem de material vegetal, como sugerido por Santana et al. (2001), quando são comparados os calos com alta capacidade com os de baixa capacidade de regeneração (Figura 7 e, Tabelas 4A e 5A-Anexos), percebe-se um menor diâmetro médio dos protoplastos desse primeiro grupo de tecido, sendo esse valor de aproximadamente 24 μm entre o 21º e 56º dias de cultivo e de 50 μm , para o mesmo período, quando as células apresentaram baixa capacidade de regeneração (Figura 7).

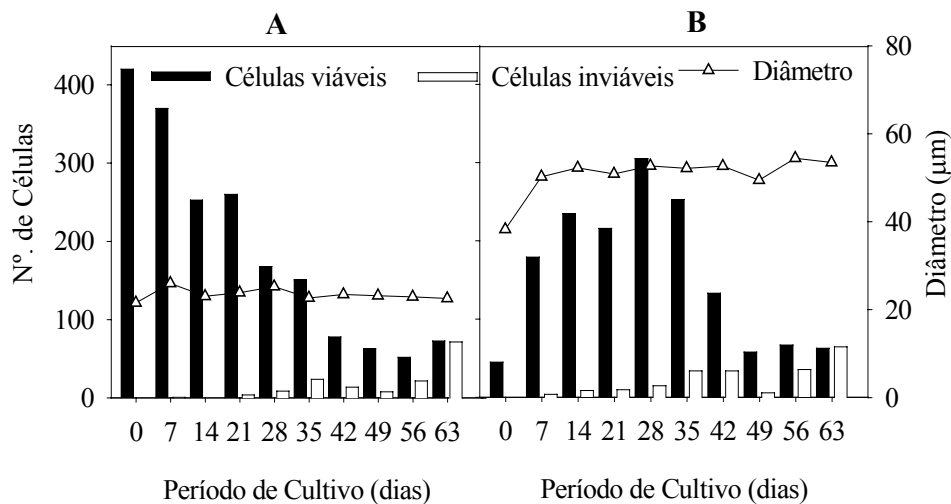


FIGURA 7 Relação entre o número, diâmetro e viabilidade de protoplastos de pimenta longa registrada a intervalo semanal, até 63 dias. UFLA, Lavras, MG, 2003.

No agrupamento das células em diferentes classes de diâmetro (Figura 8), percebem-se mais claramente os menores diâmetros dos protoplastos

obtidos de calos com alta capacidade de regeneração. Os protoplastos com ACR estão na faixa de 20 e 35 μm de diâmetro, enquanto, nos protoplastos de BCR, estão acima de 35 μm . Além disso, quando se compara a viabilidade desses protoplastos oriundos de calos com alta e baixa capacidade de regeneração, por meio da coloração com azul de metileno, percebe-se uma queda de 50 % da viabilidade dos protoplastos que estão no final de cultivo, para os dois tipos de calos (Figura 7). Observa-se um incremento gradativo da proporção das células inviáveis, concomitante com o decréscimo das viáveis ao longo do desenvolvimento dos calos, no final desse ciclo, com valor de aproximadamente 50% para os dois tipos de calos (Figura 7 e Tabela 4A e 6A-Anexos).

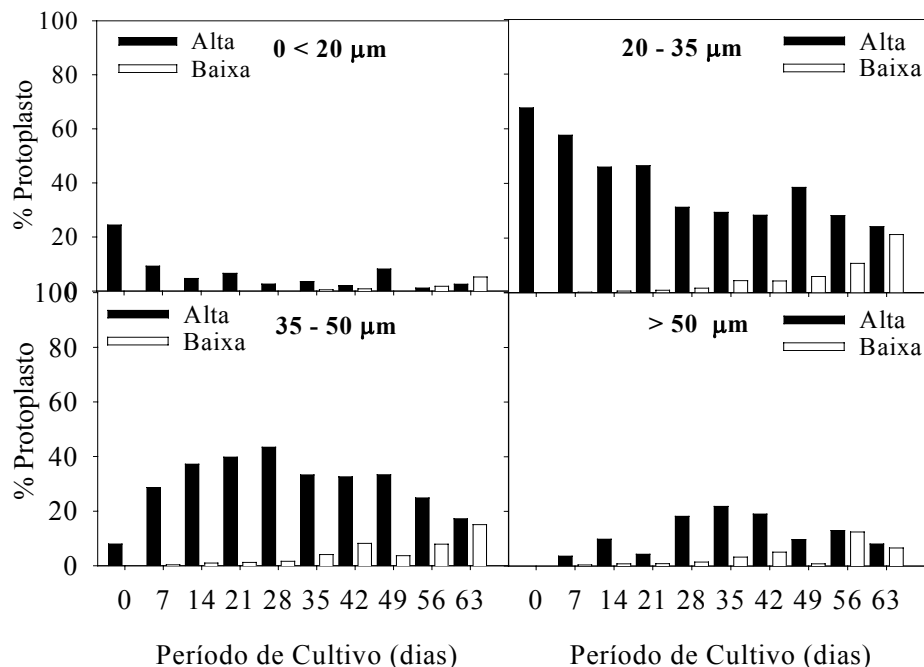


FIGURA 8 Proporções distintas dos diâmetros de protoplastos obtidos de calos de pimenta longa provenientes de explantes foliares. UFLA, Lavras, MG, 2003.

Esse teste de viabilidade utilizando o azul de metileno já foi aplicado em cebola (Enciclopédia Microsoft Encarta, 1999), alho (Marques et al. 1999), como também em levedura (Smart et al., 1999; Boyd et al., 2002) e em bactérias (Weniger et al., 2001).

Durante o ajuste da metodologia para o teste de viabilidade, variou-se a concentração do azul de metileno (0,01 a 0,1 % v/v), a quantidade da massa celular e o tempo de coloração. Além disso, foi realizado um outro teste, utilizando-se protoplastos oriundos de calos com ACR aos 28 dias de cultivo *in vitro*, ou seja, na fase de crescimento ativo. Parte desses protoplastos foi submetida ao congelamento a -20°C durante 4 horas e a outra porção à fervura por 10 minutos. Nesses dois grupos de amostras foi verificada, na sua totalidade, a presença de células inviáveis utilizando azul de metileno, haja vista que, de acordo com Gavilanes (1995), esse corante tem valor extraordinário como vital. Visualiza-se na Figura 9 que o corante detectou diferenças entre a viabilidade de protoplastos da massa celular com alta e baixa capacidade de regeneração. No entanto, por ser um método qualitativo e por somente indicar se a célula está viva ou morta, não discrimina se esta tem ou não a capacidade de se dividir. Contudo, a queda da viabilidade pode ser considerada um indicativo das perdas das atividades vitais das células. Denota-se, portanto, que esse parâmetro sozinho não é suficiente para inferir sobre a intensidade da divisão celular. Os dados deste trabalho sobre o diâmetro dos protoplastos e a curva de crescimento colaboram com esta afirmação quando se trata de pimenta longa.

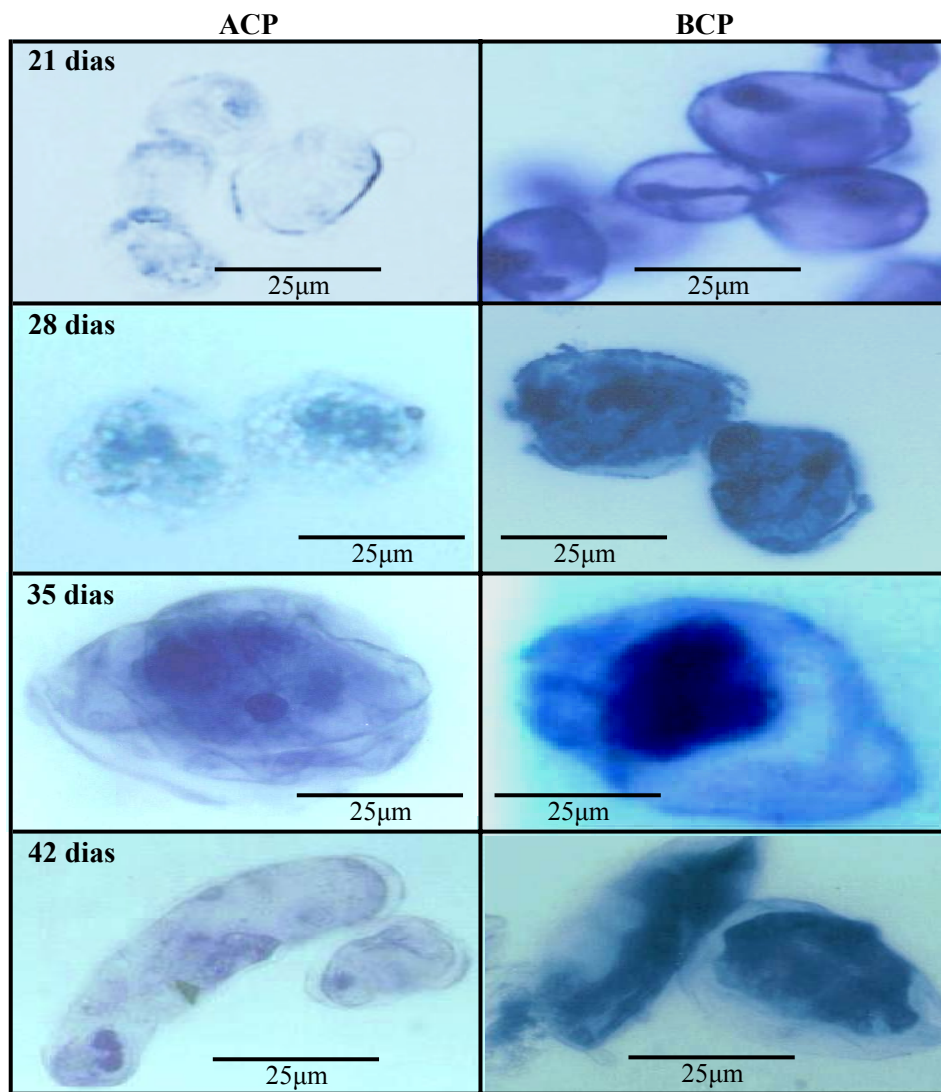


FIGURA 9 Viabilidade de protoplastos de alta (ACP) e baixa (BCP) capacidade de regeneração, corados com azul de metileno aos 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo. UFLA, Lavras, MG, 2003.

No entanto, em trabalhos com células de fumo, o azul de metileno, não foi eficiente para diferenciar as células viáveis das inviáveis (Widholm, 1972). O autor considera que alguns detalhes metodológicos poderiam ter sido aprimorados, tais como a concentração do corante, que foi 0,01%, e o meio de composição em que as células se desenvolveram, que pode não ter sido ideal para que o azul de metileno agisse adequadamente. Além disso, o autor utilizou células com parede celular, o que pode ter prejudicado a coloração. Um outro aspecto interessante é que nas pesquisas realizadas por Widholm (1972), o autor recomenda utilizar uma concentração mais elevada desse corante, já que ele é um corante de exclusão, embora, no procedimento da diluição para a contagem das células, basicamente para a pimenta longa, obteve-se melhor coloração na concentração de 0,05% (v/v). Um outro ponto que deve ser ressaltado é a utilização de outro corante para averiguar a viabilidade celular em pimenta longa. O diacetato de fluoresceína (FDA), por exemplo, é um corante que comprovadamente atua em células de culturas de diferentes idades e em diferentes espécies (Widholm, 1972; Carneiro et al., 1999 e Hao et al., 2002).

Além disso, no momento da observação, as características meristemáticas das células viáveis devem ser consideradas.

3.4 Análises bioquímicas

3.4.1 Carboidratos não-estruturais

Os teores de açúcares totais, redutores e não-redutores observados desde a inoculação dos explantes até 63 dias de crescimento *in vitro* de calos são apresentados na Figura 10. A análise da variância dos dados obtidos (Tabela 8A-Anexos) mostrou que o teor desses açúcares foi significativo ($p < 0,05$) em relação ao período de cultivo.

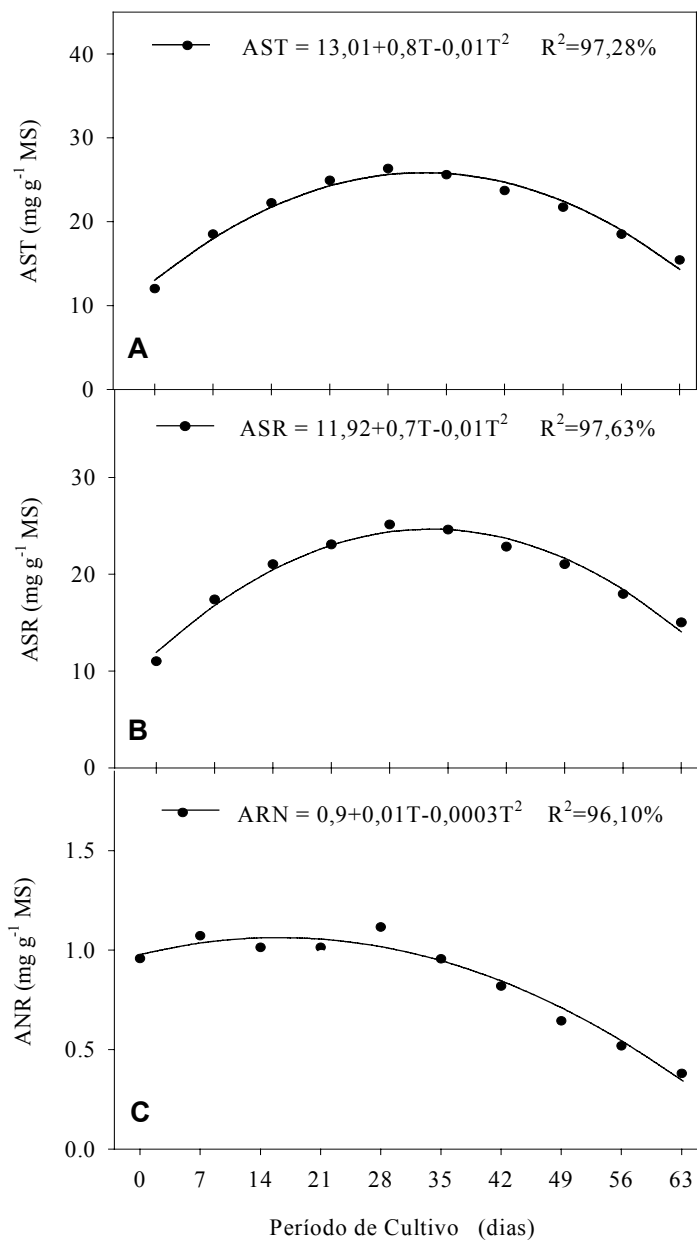


FIGURA 10 Teores de açúcares solúveis totais (A), redutores (B) e não-redutores (C) registrados durante o crescimento de calos de pimenta longa com meio de cultura MS enriquecido com 2,4-D e ANA combinado com BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.

No início da fase de crescimento lento, os teores de açúcares solúveis redutores e totais apresentaram tendência de crescimento até o 21º dia, estabilizando-se até o 35º dia, com posterior redução até o 63º dia após o cultivo. Esses resultados indicam um acúmulo de carboidratos até a fase de desaceleração e declínio na formação da massa celular. O incremento dos teores desses açúcares, na fase inicial da formação de calos, possivelmente está relacionado com o aumento na divisão celular, no entanto, a redução nas fases de estabilização e o declínio da massa celular indicam que esse incremento está relacionado provavelmente com a energia utilizada, assim como com um esgotamento no meio de cultura, concordando com os trabalhos realizados por Paiva Neto (1996), que estudou calos originados de segmentos foliares de moreira (*Chlorophora tinctoria*), e por Serra (1999), em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*), espécie nativa da Amazônia.

Em função da importância das moléculas de açúcares nos processos metabólicos (Lehninger et al., 2000) e segundo alguns autores (Kikuchi et al., 1995; Magnaval et al., 1997; Yeo et al., 1998), que observaram variações no teor de açúcares predominantes em calos embriogênicos, indicando que nessas massas celulares os níveis de açúcares são maiores que nos calos não-embriogênicos, argumenta-se que os calos que apresentam maiores níveis de açúcares podem responder mais favoravelmente à indução de um processo embriogênico. No presente trabalho foram verificadas diferenças entre os níveis dos açúcares totais nos calos (Tabela 7A-Anexos) com alta e baixa capacidade de regeneração, na fase de crescimento ativo, o que comprova a maior atividade celular. É possível que estes componentes tenham exercido efeito direto na diferenciação dos calos embriogênicos, mostrados na Figura 3, a partir dos 35 dias de cultivo em ambiente contínuo. Diante das evidências, é muito provável que esse grupo de açúcares tenha sido utilizado para a formação dos componentes de parede celular durante a fase de crescimento dos calos nesse

período.

3.4.2 Proteína e amido

Na Figura 11 observam-se os teores de proteína e amido de calos provenientes de segmentos foliares de pimenta longa, ao longo dos 63 dias de desenvolvimento *in vitro*.

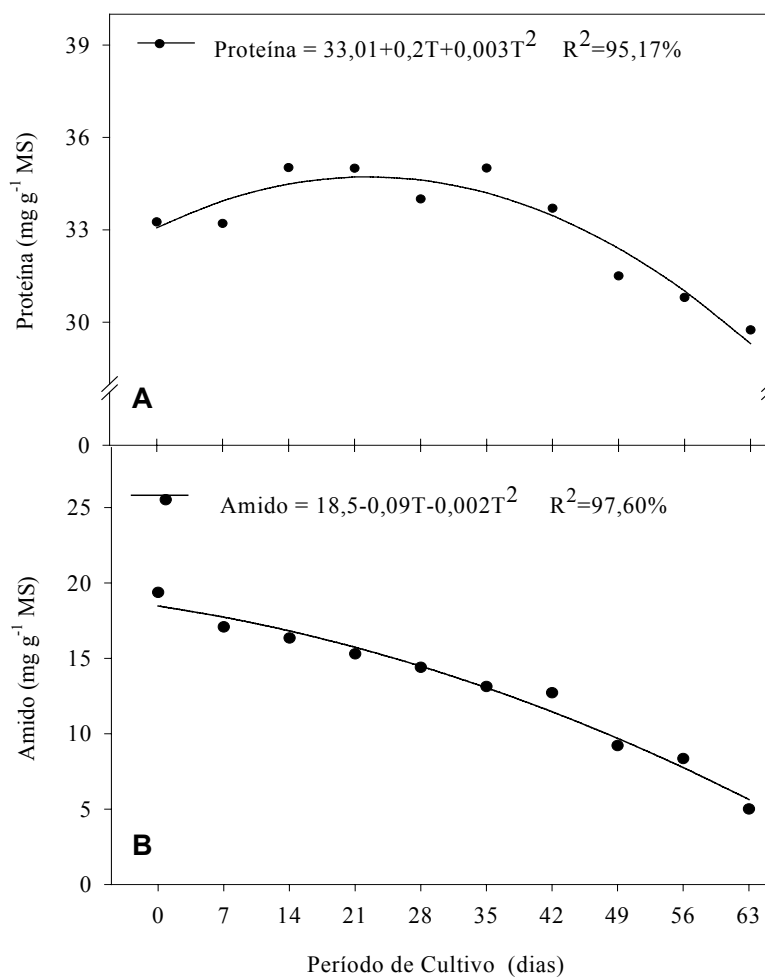


FIGURA 11 Teores de proteína (A) e amido (B) registrados durante a formação de calos de pimenta longa proveniente de segmentos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Nota-se que os teores de proteína apresentam comportamentos significativos ($p < 0,05$) pelo resultado da análise de variância (Tabelas 10A e 14A-Anexos) em relação ao período de cultivo e quando comparados aos calos de alta e baixa capacidade de regeneração, conforme as médias entre esses fatores (Tabela 18A-Anexos).

Os níveis de proteínas foram mais altas no início da fase de crescimento ativo dos calos mais precisamente aos 28 dias de cultivo após o cultivo, para em seguida haver um decréscimo acentuado. Esses altos níveis de proteínas coincidem com a síntese de novas proteínas pela presença de amônio no meio de cultura (George et al., 1988), possivelmente por serem utilizadas nas diversas rotas metabólicas envolvidas no desenvolvimento de calos devido, principalmente aos calos com alta capacidade de regeneração (Figura 9 e Tabela 22A-Anexos). Outro fator determinante no crescimento da biomassa pode estar relacionado à presença do nitrogênio fornecido pela combinação dos sais de amônio e sais de nitrato. A assimilação de nitrogênio pelos calos provavelmente ocorre através da redução do nitrato a amônia e, conseqüentemente, da formação de aminoácidos (Paiva Neto, 1996; Serra, 1999; Ferreira et al., 2000 e Redgwell & Fischer, 2002).

Com relação aos níveis de amido, reserva energética dos organismos vegetais, nas fases de crescimento celular observa-se um decréscimo relativo (Figura 9) desde a inoculação do explante no meio de cultivo até a fase de declínio, aos 63 dias. Esta diminuição no teor de amido possivelmente está relacionada com o fornecimento de energia e compostos intermediários necessários para o crescimento da massa celular, no acúmulo da matéria seca que também ocorreu aos 28^o dias. O decréscimo na concentração de amido antecedeu os aumentos nos níveis relativos de açúcares solúveis totais e redutores, o que leva a sugerir que partes desse incremento nos açúcares deveram-se à hidrólise do amido, tal como ocorreu em banana (Marriott &

Palmer, 1980; Stover & Simonds, 1987), pêssego (Shandu et al., 1983) e caqui (Sarria & Honório, 1998).

Magalhães (1991) observou também um incremento nos níveis absolutos de amido na fase de crescimento ativo da massa celular em jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg). No entanto, há afirmativas de que durante a formação de frutos de café (*Coffea arabica* L.) há um decréscimo no teor de amido dos ramos (Cooil, 1954; Patel, 1970; Rena et al., 1983) e das folhas (Patel, 1970), sendo tanto mais intenso quanto maior a produção (Cooil & Nakayama, 1953), de que ocorreu esgotamento de carboidratos em plantas que sofreram secas dos ramos (Nutman, 1933) e de que ramos sem frutos normalmente têm mais amido do que ramos com frutos (Janardhan et al., 1971). Isto confirma os resultados obtidos em calos provenientes de segmentos foliares de pimenta longa, tecidos jovens em que a divisão celular e a capacidade de regeneração aumentam (Pierik, 1989). É importante salientar que tanto os níveis relativos de proteína quanto os de amido foram diferentes estatisticamente entre os calos com alta e baixa capacidade de regeneração, conforme visualizados na Tabela 18A-Anexos e, os efeitos dos períodos de cultivos foram significativos ($p < 0,05$), conforme demonstrado no resumo da análise de variância (Tabela 10A-Anexos).

3.4.3 Análises dos compostos de parede celular

Pela Figura 12 observa-se que houve aparentemente um aumento no teor de pectina solúvel nos calos de alta capacidade de regeneração, em relação aos calos considerados de baixa capacidade de regeneração, a partir da fase de crescimento ativo, o que possivelmente ocorreu devido à síntese de pectina durante o desenvolvimento desses calos.

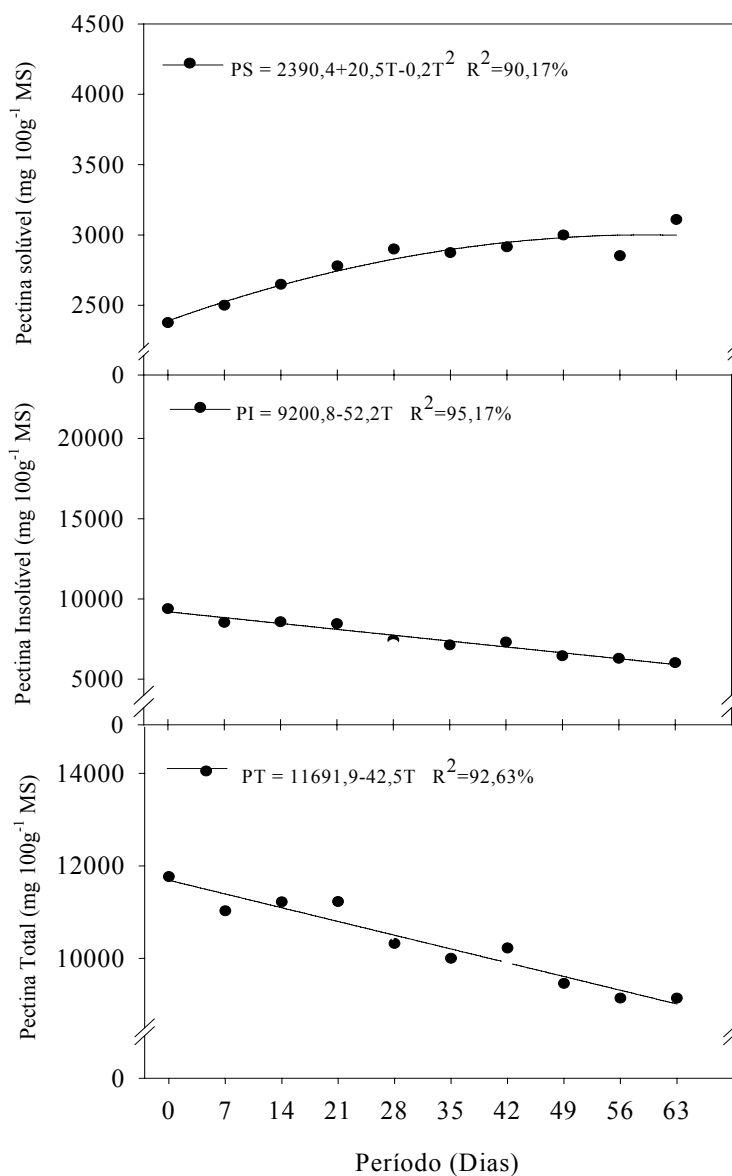


FIGURA 12 Teores de pectina solúvel, insolúvel e total registrados durante o crescimento de calos de pimenta longa, com meio de cultura MS enriquecido com 2,4-D e ANA combinado com BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Os teores de pectina solúvel comparados nos calos de alta e baixa capacidade de regeneração (3448 e 3260 mg 100 g⁻¹ de matéria seca, Tabela 19A-Anexos), respectivamente, que logo após a fase de crescimento ativo, sofreram um declínio porque talvez tenha ocorrido uma baixa solubilização de pectinas (Tabelas 19A e 22A-Anexos), o que pode ser explicado aparentemente pela baixa atividade da enzima poligalacturonase, e porque provavelmente outras enzimas atuam no processo de desenvolvimento de calos em pimenta longa. Resultados similares aos desse trabalho foram encontrados por Matsui & Kitagawa (1989), Ben-Arie et al. (1996) e Vasconcelos (2000) em frutos de caqui (*Diospyros kaki*), segundo os quais, devido à baixa atividade de poligalacturonase, o teor de pectina solúvel parece decrescer.

Nos tecidos vegetais o cálcio encontra-se normalmente na parede celular, formando ligações entre resíduos de ácido galacturônico, responsável pela união de cadeias pécticas adjacentes. O complexo cálcio-pectina relatam Alonso et al. (1997) e Vasconcelos (2000), atua como um cimento fornecendo firmeza ao tecido, confirmando os estudos de Burns & Pressey (1987), segundo os quais a presença de cálcio em adição à insolubilidade do material péctico inibe a degradação dos tecidos pela poligalacturonase.

Com relação à pectina total, solúvel e insolúvel o resumo da análise de variância (Tabelas 11A e 19A-Anexos) mostra que houve efeito significativo ($p < 0,05$) dos calos com alta e baixa capacidade de regeneração em relação ao longo do período de cultivo em sistema contínuo, mantendo o mesmo comportamento das massas formadas nos períodos de crescimento ativo (Tabelas 15A e 22A Anexos). Uma das funções principais das pectinas é a coesão através da formação de pontes de Ca⁺² entre moléculas adjacentes (Jarvis, 1984), conferidas pela proporção elevada de ácido galacturônico presente nesse tipo de molécula.

Observa-se um aumento no teor de celulose (Figura 14A) com o avanço do crescimento da massa celular no incremento da matéria seca, independentemente da fase, tanto em calos com alta como nos de baixa capacidade de regeneração (Tabelas 20A e 22A-Anexos). Os efeitos significativos ($p < 0,05$) entre esses níveis de celulose nos calos formados no período de cultivo contínuo, resultados apresentados nas Tabelas 12A e 16A-Anexos, são devido à textura friável dessas massas celulares, que provavelmente inicia pela ação das celulases (Mitcham & McDonald, 1992 e Lima, 1997) no entrelaçamento das microfibras, possibilitando que outras enzimas, inclusive a poligalacturonase (PG), tenham acesso a seus substratos. Estes efeitos também foram causados pelo baixo teor de cálcio (Tabelas 26A e 27A-Anexos), na composição da parede celular, em calos de alta capacidade de regeneração, comparados com os de baixa capacidade de se regenerar, o que é comparável aos estudos realizados por Tobias et al. (1993) quando verificaram teor baixo de cálcio em frutos de maçã (*Sorbus brasiliensis*) e por Ollé et al. (1996) em frutos de manga (*Mangifera indica*), os quais apresentavam um decréscimo no teor de polissacarídeos não-celulósicos e aumento no de celulose. Segundo Evangelista et al. (1996), o cálcio fortalece a estrutura da parede celular pelo atraso e/ou modificações nas mudanças químicas da parede celular.

Com o desenvolvimento da massa celular, observou-se uma pequena diminuição no teor de hemicelulose (Figura 13B) em calos com alta capacidade de regeneração após a fase de crescimento ativo; houve também menores teores de hemicelulose nos calos de baixa capacidade de regeneração, o que permite relacionar com as atividades das enzimas poligalacturonase (PG) e pectinametilesterase (PME) e a solubilização das pectinas solúveis, a degradação de hemicelulose, favorecendo aparentemente o desenvolvimento dos calos friáveis de pimenta longa, o que é comparável aos trabalhos relatados por Bicalho (1998) e Vasconcelos (2000). A hipótese é plausível, uma vez que a

concentração nos calos se reduziu drasticamente até o final do ciclo de cultivo contínuo, aos 63 dias.

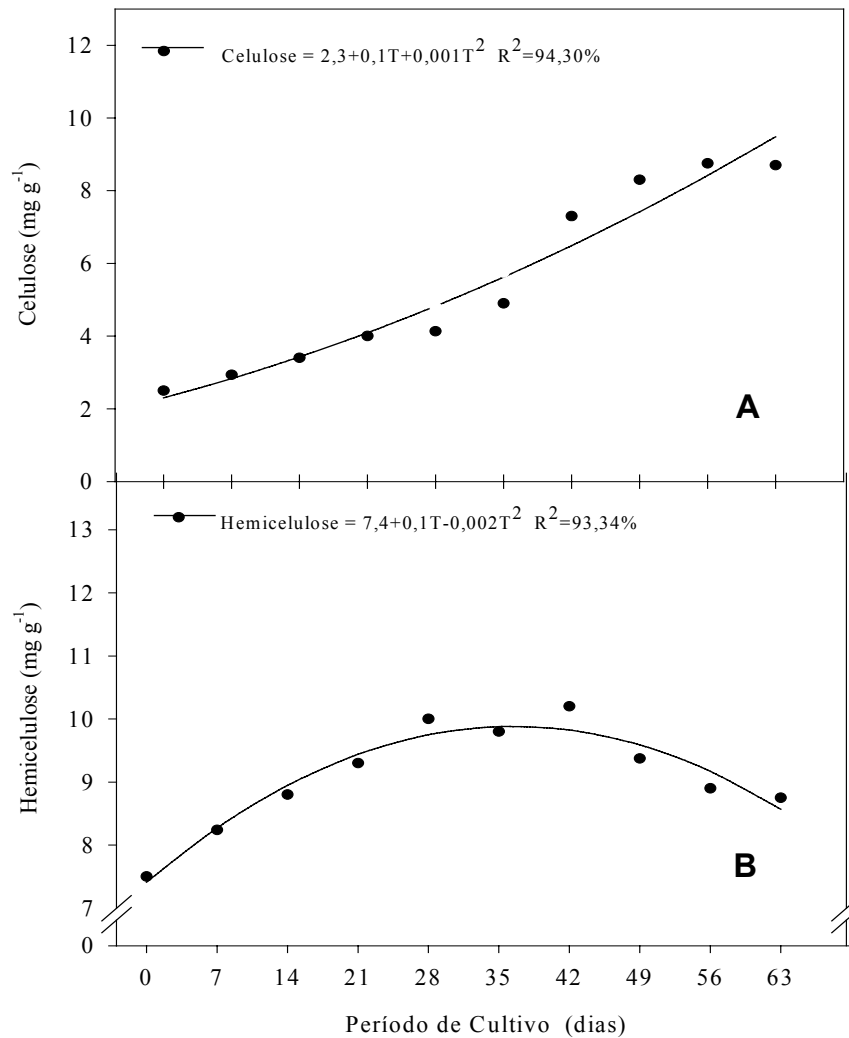


FIGURA 13 Teores de celulose (A) e hemicelulose (B) registrados durante o crescimento de calos de pimenta longa com meio de cultura MS enriquecido com 2,4-D e ANA combinado com BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Essa queda desse grupo de carboidratos, juntamente com a tendência de queda da pectina solúvel (Figura 10), são indícios de desestruturação da parede celular mais intensa dessas células, o que pode comprometer a posterior divisão para a multiplicação do tecido em desenvolvimento.

Num estudo próximo, comparando amostras de calos com alta e baixa capacidade de regeneração, é essencial o entendimento da participação das enzimas hidrolíticas de parede no desenvolvimento de calos, tais como a poligalacturonase, pectinametilesterase e glucanase, concomitante à atividade dessas enzimas; será necessário um fracionamento da parede celular, acompanhado por análises em cromatografia gélida e gasosa, a fim de identificar componentes que sejam importantes nesse processo.

As frações das fibras de detergente ácida (FDA) e neutra (FDN) apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) (Tabela 13A e 17A-Anexos) quando foram comparados calos de alta e baixa capacidade de regeneração no incremento de matéria seca do desenvolvimento da massa celular nos 63 dias de cultivo contínuo (Tabela 21A-Anexos). A redução dos teores dessas frações na fase de crescimento lento na formação de calos em segmentos foliares de pimenta longa (Figura 14) é atribuído à baixa disponibilidade da ação fermentativa dessas frações, em detrimento da composição estrutural da parede celular. Contudo, na fase ativa, os teores das frações de detergente ácida e neutra foram aumentando expressivamente até a fase de estabilização da massa celular, para posteriormente decrescer, coincidindo com o declínio do desenvolvimento desses calos formados em detrimento a oxidação observada (Figuras 5 e 7). Esse comportamento possibilita afirmar que os níveis dessas fibras se elevam na fase ativa devido à baixa disponibilidade de carboidratos estruturais e ao declínio nos teores de lignina e possível ação de polifenóis na parede celular, o que se assemelham aos relatos de Bressani et al. (1972) e Teixeira et al. (1995).

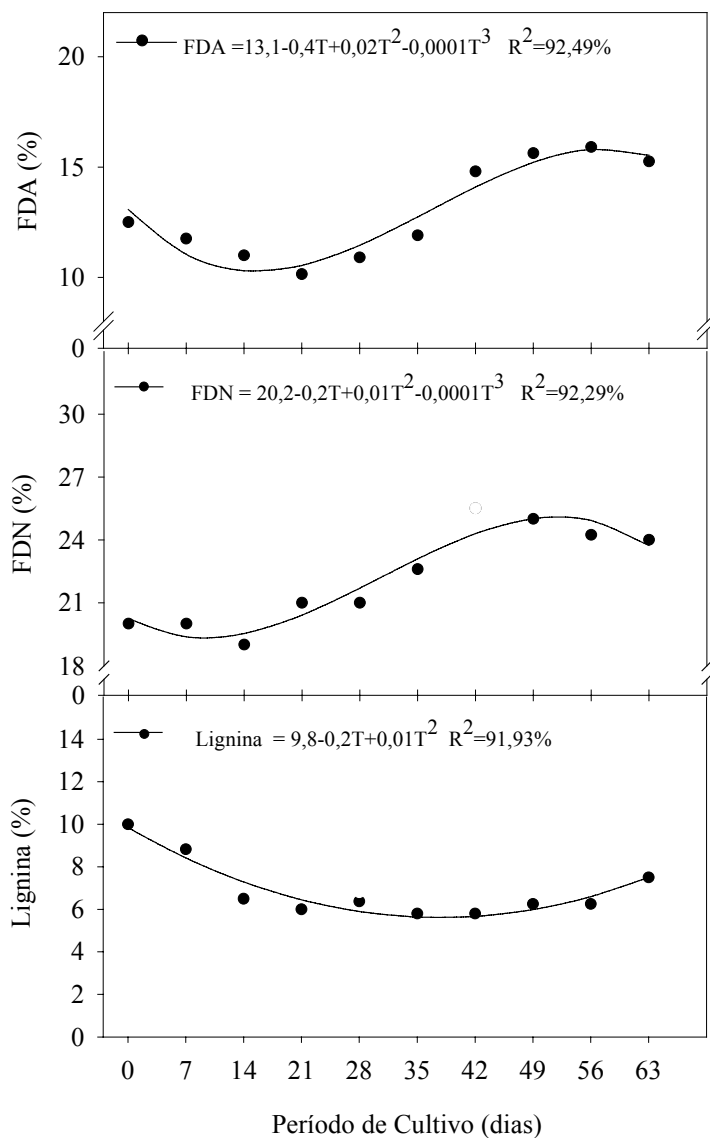


FIGURA 14 Teores de fibra de detergente ácida (FDA), fibra de detergente neutra (FDN) e lignina em função da formação de calos proveniente de segmentos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Os teores de lignina observados foram significativos ($p < 0,05$) em relação aos calos com alta e baixa capacidade de regeneração, resultados apresentados na análise de variância (Tabelas 13A e 17A-Anexos), mas equivalentes àqueles encontrados nos estudos de Wilson (1993;1994), relatando os efeitos das fibras de detergente ácida e neutra em relação à lignina no tecido foliar de forrageiras. Vários trabalhos mostram que a deslignificação de folhosas é positivamente correlacionado com o teor de celulose nos tecidos e mais fracamente correlacionada com o teor de hemicelulose (Amidon, 1981; Kibblewhite et al., 1998 e Santos, 2000), assemelhando-se aos resultados encontrados em nosso trabalho, quando é comparado o desenvolvimento dessas massas celulares nas atividades celulares de alta e baixa capacidade de diferenciação (Tabela 22A-Anexos).

Portanto, o real efeito da lignina na estrutura celular de calos formados a partir de segmentos foliares parece ser algo de considerável complexidade, exigindo estudos mais específicos a respeito da molécula de lignina.

3.4.4 Análises dos elementos minerais

Os teores de macro e micronutrientes durante o desenvolvimento de calos classificados em alta e baixa capacidade de regeneração, obtidos a partir de segmentos foliares de pimenta longa, são apresentados nas Tabelas 25A e 26A-Anexos.

O resumo das análises de variância para os teores e os acúmulos dos elementos minerais nos calos de pimenta longa no período de desenvolvimento e na fase de crescimento ativo são demonstrados nas Tabelas 17B e 18B.

Foram verificadas diferenças significativas entre os tipos de calos e idades dos mesmos para os teores de todos os nutrientes analisados. A interação entre idade e tipo de calo (baixa e alta capacidade de regeneração) só foi significativa para os teores de cobre, ferro e zinco.

3.4.4.1 Macronutrientes

A avaliação no teor dos macronutrientes (N, P, K, Ca e Mg) em função do tipo e idade dos calos está mostrada na Figura 15.

Com exceção do cálcio, os teores dos outros macronutrientes estudados decresceram com a idade dos calos.

Os teores de nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio (Figura 15) tenderam a decrescer com o período de cultivo devido ao crescimento da massa celular proveniente dos segmentos foliares de pimenta longa. Esse decréscimo caracteriza um efeito de diluição, já que o crescimento dos calos ocorreu numa velocidade maior que a absorção desses elementos.

Os maiores teores de N foram observados nos calos com alta capacidade de regeneração, com valores médios de $5,50 \text{ dag kg}^{-1}$. Nos calos de baixa regeneração, esses valores foram de $3,41 \text{ dag kg}^{-1}$ (Tabela 4).

TABELA 4 Teores médios de elementos essenciais (macronutrientes) do crescimento de calos com alta (ACR) e baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Calos	Nitrogênio (dag kg^{-1})	Fósforo (dag kg^{-1})	Potássio (dag kg^{-1})
	Media \pm DP	Media \pm DP	Media \pm DP
ACR	$5,50 \pm 0,82 \text{ a}$	$0,37 \pm 0,007 \text{ a}$	$3,32 \pm 0,060 \text{ a}$
BCR	$3,41 \pm 0,73 \text{ b}$	$0,22 \pm 0,008 \text{ b}$	$1,17 \pm 0,028 \text{ b}$

DP: Desvio Padrão; Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$).

Vasic et al. (2001) observaram teores de nitrogênio variando de $3,197$ a $5,53 \text{ dag.kg}^{-1}$ das variedades de girassol, estando próximos aos observados neste trabalho, dentro desse intervalo.

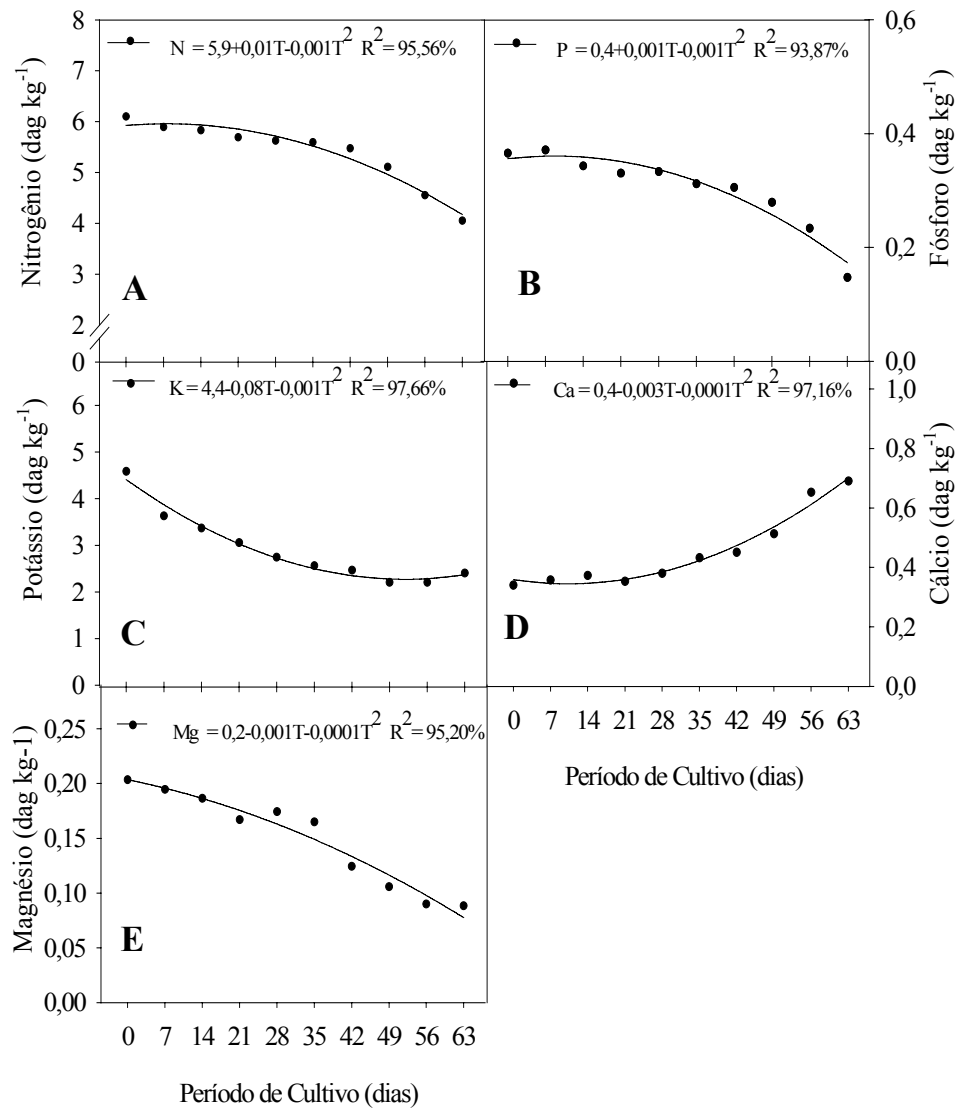


FIGURA 15 Teores de nitrogênio (A), fósforo (B), potássio (C), cálcio (D) e magnésio (E) registrados durante o crescimento de calos de pimenta longa com meio de cultura MS enriquecido com 2,4-D e ANA combinado com BAP. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Malavolta et al. (1997) relatam que nos tecidos vegetais, o nitrogênio é o

elemento mineral que a planta requer em maior quantidade. Na cultura de tecidos, o nitrogênio pode ser suplementado na forma de nitrato (NO_3^-), de amônio (NH_4^+) ou de compostos orgânicos como uréia e aminoácidos (Torres et al., 2001). Em trabalhos anteriores, em que foi avaliada a fonte preferencial do nitrogênio para o cultivo *in vitro* de pimenta longa, foi verificada melhor absorção na forma de nitrato (Santiago, 1999). Nesta forma, o nitrogênio também propicia altas taxas de crescimento para espécies como cenoura (Reinert et al., 1967), roseira (Nash & Davies, 1972) e quebra-pedra (Becker, 1997).

Os teores de nitrogênio (Figura 15A) tendem a decrescer com o período de cultivo devido ao crescimento da massa celular proveniente dos segmentos foliares de pimenta longa. Pelo resumo da análise de variância (Tabelas 23A e 24A-Anexos), foi observada diferença significativa quando se compararam calos com alta e baixa capacidade de regeneração; no entanto, o elemento potássio não foi significativo quando foram comparados esses tipos de calos nos períodos de crescimento ativo (do 21º ao 42º dia); todavia são analisados os efeitos da interação dos calos aos períodos ativos, os níveis de significâncias ($p < 0,05$) ocorram em todos os elementos macros, inclusive o microelemento manganês. Com base nos teores desse macronutriente, não se podem diferenciar os calos de alta com os de baixa capacidade de regeneração.

Em soja (*Glycine max*) foi verificado que o nitrogênio pode causar uma atividade mais elevada de enzimas nos calos e, conseqüentemente, estimular tanto a organogênese como embriogênese somática, relatam Curtis & Smarelli (1987). Para a pimenta longa, numa etapa posterior de pesquisa, a manipulação das dosagens e fontes de nitrogênio será importante para se obter a embriogênese somática, visando a produção do safrol.

Os maiores teores de fósforo foram observados nos calos com alta capacidade de regeneração (Tabela 4). Vasic et al. (2001) observaram teores de fósforos na faixa de 0,1 a 0,36 dag kg^{-1} em calos de variedades de girassol,

sendo os valores observados neste trabalho dentro deste intervalo.

Na organogênese, o fósforo está envolvido na diferenciação da parte aérea, desempenhando importante papel no metabolismo energético, na regulação e ativação de processos enzimáticos, além de ser elemento essencial para a síntese de ATP (Torres et al., 2001). Nesse trabalho, os teores de fósforo verificados, tanto no período de cultivo como na fase de crescimento ativo de calos, tiveram comportamentos decrescentes (Figura 15B), possivelmente pela fonte e concentração desse macronutriente no meio. No meio de cultivo, utilizou-se fosfato de potássio monobásico na concentração de 1,25 mM, como fonte de fósforo, concentração considerada baixa para algumas culturas (Installe et al., 1985). Segundo Heller et al. (1968). A complementação com uma fonte orgânica se mostra eficaz na promoção do crescimento do tecido *in vitro* de cenoura, assim como a fonte inorgânica em plântulas (Santiago, 1999) e em plantas (Sousa, 2001) de pimenta longa.

Da mesma forma que se observou o nitrogênio e fósforo, o teor de potássio foi maior em calos de alta capacidade de regeneração.

O potássio é importante na regulação do potencial osmótico da célula e na ativação de várias enzimas do metabolismo de carboidratos e proteínas, comentam Torres et al. (2001). Nesse trabalho, observa-se que os teores de potássio (Tabela 4 e Figura 15C) apresentaram uma drástica redução na fase de crescimento lento, para posterior estabilização, possivelmente ocasionada pelo metabolismo simples do íon K^+ (Caldas et al., 1999 e Torres et al., 2001). Essa redução se deve, provavelmente, ao efeito de diluição.

Os teores de cálcio apresentaram diferenças significativas em calos com alta e baixa capacidade de regeneração, conforme resumo da análise de variância (Tabelas 23A e 24A-Anexos), visualização na Figura 15D. Observa-se um ligeiro aumento desse elemento no ciclo de 63 dias de cultivo, devido à participação desse íon (Ca^{+2}) na estrutura da parede celular e como co-fator de

enzimas (Redgwell & Fischer, 2002). Considerando os tipos de calos, o maior teor do referido cátion em calos com baixa capacidade de regeneração (Tabela 5) pode estar relacionado com uma maior firmeza da parede celular imposta pelo pectato de cálcio (Jarvis, 1984 e Torres et al., 2001). Alguns autores também observaram um impedimento especial na parede celular provocado pelo cálcio, que impede a ação da poligalacturonase e pectinametilesterase (Carpita, 1996 e Redgwell & Fischer, 2002). Neste contexto, um outro aspecto interessante observado foi que calos com alta capacidade de regeneração apresentaram índice de solubilização e pectina solúvel superiores aos calos com baixa capacidade (Tabelas 19A e 22A-Anexos). Isto evidencia um maior índice de interconversão de componentes pécnicos na parede celular desses calos, o que propicia uma situação mais adequada para a divisão celular, extremamente necessária para a multiplicação dos tecidos *in vitro*.

TABELA 5 Teores médios de elementos essenciais (macronutrientes) do crescimento de calos com alta e baixa capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Calos	Cálcio (dag kg ⁻¹)	Magnésio (dag kg ⁻¹)
	Media ± DP	Media ± DP
ACR	0,49 ± 0,020 a	0,16 ± 0,006 a
BCR	0,23 ± 0,012 b	0,05 ± 0,003 b

DP: Desvio Padrão; Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste F (p<0,05).

Esse incremento na solubilização dos componentes pécnicos está relacionado com a despolimerização desse grupo de açúcares, sendo um indicativo de dissolução parcial da parede celular (Redgwell & Fischer, 2002). No sistema *in vitro*, esses fenômenos podem explicar que o fragmoplasto esteja mais prontamente acessível para a divisão celular, no entanto, as evidências encontradas neste trabalho necessitam ser testada por meio da atividade da

poligalacturonase e pectinametilesterase, como também de análises de cromatografia gélida e gasosa em parede celular isolada em calos com alta e baixa capacidade de regeneração da pimenta longa.

Observando a variação nos teores de cálcio em função do tipo de calos e do período de cultivo, verifica-se o inverso do ocorrido com outros macronutrientes estudados. Segundo Malavolta (1980), o cálcio é um dos macronutrientes de apresenta baixa mobilidade dos tecidos vegetais, havendo, portanto, pequena ou nenhuma translocação para os partes em crescimento, acumulando-se em maior concentração nos tecidos mais velhos. Os teores de cálcio observados neste trabalho estão abaixo dos observados por Vasic et al. (2001) em calos de girassol.

Os teores de magnésio (Figura 15E) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando calos com alta e baixa capacidade de regeneração (Tabelas 27A - Anexos) foram comparados. Os calos apresentaram teores que oscilaram de 0,20 a 0,08 mg kg^{-1} de matéria seca (Tabela 25A-Anexos). Observa-se que na fase de crescimento ativo os calos com alta capacidade de regeneração apresentaram níveis relativos aproximadamente 0,16 mg kg^{-1} de matéria seca (Tabela 5) porém, na fase de declínio (após 56° a 63° dia) esses valores foram reduzidos à metade. Pressupõe-se que este fato seja devido à participação desse íon como co-fator importante para várias enzimas envolvidas na respiração, fotossíntese e na síntese de DNA e RNA, com o que concordam Torres et al. (2001).

Vasic et al. (2001) observaram teores de magnésio variando de 0,086 a 0,096 dag kg^{-1} de matéria seca. No presente trabalho foram observados valores superiores e inferiores a esse.

3.4.4.2 Micronutrientes

Os teores médios dos micronutrientes (Tabelas 6 e 7) observados em calos obtidos a partir de segmentos foliares de pimenta longa, durante os 63 dias de cultivo *in vitro*, são visualizados na Figura 16.

TABELA 6 Teores médios de elementos essenciais (micronutrientes) do crescimento de calos de pimenta longa com alta (ACR) e baixa (BCR) capacidade de regeneração na fase de desenvolvimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

calos	Cobre (mg kg^{-1})	Manganês (mg kg^{-1})
	Media \pm DP	Media \pm DP
ACR	19,1 \pm 0,28 a	243,2 \pm 4,179 a
BCR	4,7 \pm 0,10 b	138,5 \pm 3,005 b

DP: Desvio Padrão; Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$).

TABELA 7 Teores médios de elementos essenciais (micronutrientes) do crescimento de calos de pimenta longa com alta (ACR) e baixa (BCR) capacidade de regeneração na fase de desenvolvimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

calos	Ferro (mg kg^{-1})	Zinco (mg kg^{-1})
	Media \pm DP	Media \pm DP
ACR	376,1 \pm 10,126 a	388,8 \pm 11,106 a
BCR	165,6 \pm 6,743 b	128,5 \pm 5,210 b

DP: Desvio Padrão; Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$).

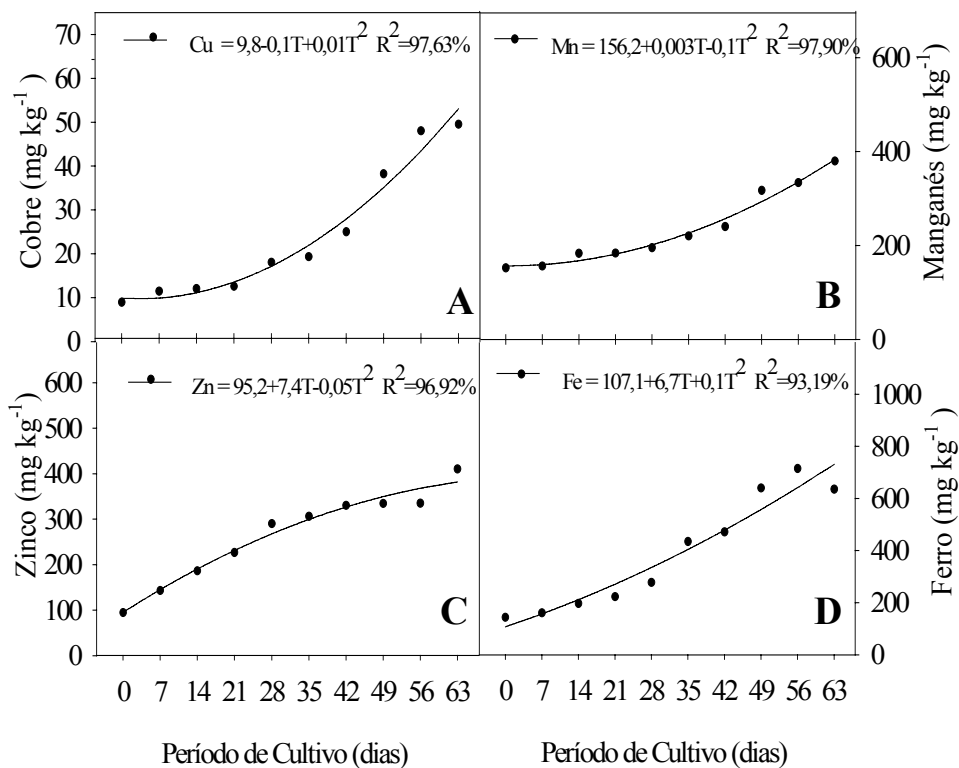


FIGURA 16 Teores de cobre (A), manganês (B), zinco (C) e ferro (D) durante o desenvolvimento *in vitro* de calos proveniente de segmentos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.

De modo semelhante ao observado para o cálcio, os teores de micronutrientes aumentaram durante o período de crescimento dos calos, provavelmente devido à baixa mobilidade dos mesmos nos tecidos vegetais. Foi verificada, também, maior concentração desse nutriente em calos com baixa capacidade de regeneração.

Outra explicação para o aumento nos teores desse micronutrientes com o período de cultivo, segundo Torres et al. (2001), é a sua participação na oxidação e hidroxidação de compostos fenólicos, atuando como co-fator

enzimático. Segundo Caldas et al. (1999), o cobre, o manganês, o zinco e o ferro são elementos minerais essenciais para as plantas clorofiladas, mesmo em tecidos que não são fotossintetizantes, como calos.

O teor de cobre (Figura 16A) apresentou variações crescentes de 8,90 a 49,50 mg kg⁻¹ de matéria seca, no ciclo de 63 dias de cultivo *in vitro*, dados mostrados na Tabela 26A-Anexo. Pela análise da variância (Tabelas 23A e 24A-Anexos), observa-se que os efeitos foram significativos tanto nos períodos de cultivo (63 dias) como na fase de crescimento ativo, do 21º ao 42º dia, quando se comparam calos com alta e baixa capacidade de regeneração (Tabela 6 e Tabela 27A-Anexo), acima dos teores observados por Vasic et al. (2001) em variedades de girassol.

Observa-se, pelo resumo da análise de variância (Tabela 23A e 24A-Anexos), o efeito significativo ($p < 0,05$) nos teores de ferro, tendendo ao crescimento, e posterior declínio na fase de estabilização (Figura 16D). O aumento nesses teores beneficiou a síntese de proteínas ferrosas provavelmente envolvidas na absorção do nitrogênio, haja vista que a forma quelato de ferro com EDTA (etilenodiaminotetracetato) é absorvida facilmente pelas células, conforme relatos de Ojima & Ohira (1978), Caldas et al. (1999) e Torres et al. (2001). Na fase de desenvolvimento ativo, do 21º ao 42º dia, os níveis significativos ($p < 0,05$) de ferro mantiveram comportamento crescente, com tendência à estabilidade, à medida que essas massas celulares apresentavam perda de matéria fresca e coloração marrom, fenômeno também observado por Vagera & Havranek (1983) em cultura de fumo. Torres et al. (2001) descrevem que uma das características do ferro, além da participação das reações de oxirredução nos cloroplastos, na mitocôndria e nos peroxissomos, é de estar presente em vários metabólitos.

A variação nas concentrações de manganês em calos a partir de segmentos foliares de pimenta longa, durante o ciclo de cultivo *in vitro*, se

ajustou ao modelo quadrático (Figura 16B). Pelo resumo da análise de variância, esses teores apresentaram significância ($p < 0,05$) quando comparados calos com alta e baixa capacidade de regeneração, observando-se maiores teores nos calos de baixa capacidade de regeneração.

O aumento relativo aos 63 dias de cultivo foi superior a 100%, 152 mg kg⁻¹ a 379,6 mg kg⁻¹ entre o período inicial e final (Tabela 26A-Anexos), embora esse incremento seja de aproximadamente 30% quando comparados calos com alta e baixa capacidade de regeneração (Tabela 6). Provavelmente, isto se deve ao fato de este micronutriente, segundo Torres et al. (2001), ser considerado mais importante e apresentar função provável na definição da estrutura das proteínas metálicas envolvidas na respiração e fotossíntese, o que confere ao relato de Caldas et al. (1999), segundo os o manganês é capaz de inibir o metabolismo do nitrogênio.

A amplitude de variação nos teores de manganês observada no presente trabalho foi além da observada em girassol por Vasic et al. (2001).

O aumento nos teores de zinco na fase inicial da formação de calos contribuiu para o desenvolvimento dessas estruturas celulares. Comparando a Figura 16B com a Figura 17C, observa-se que quando teor de fósforo diminui, e o teor de zinco aumenta. Essa interação negativa entre o fósforo e zinco foi observada por Barbosa (1994) em aroeira-do-sertão (*Myracrodouon urundeuva* Fr. All.) e por Machado (1998) em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.), ambos sob condições *in vitro*.

Esse micronutriente, segundo Torres et al. (2001), é importante componente na rota biossintética das auxinas contidas no meio de cultivo. O aumento nos teores é mais evidenciado na fase de crescimento ativo, tendendo a se igualar na fase de estabilização, para posterior declínio no desenvolvimento de calos.

De modo semelhante ao observado com cobre, ferro e manganês, a

amplitude de variação na concentração desses micronutrientes foi maior que a observada por Vasic et al. (2001) em girassol.

4 CONCLUSÕES

- As auxinas ANA (ácido α -naftalenoacético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), em combinação com a citocinina BAP (6-benzilaminopurina), foram os reguladores de crescimento indispensáveis à indução de calos em segmentos foliares de pimenta longa;
- Maior taxa de indução de calos foi obtida inoculando-se segmentos foliares de plântulas de pimenta longa em 27,135 μ M de 2,4-D + 2,285 μ M de ANA + 8,88 μ M de BAP;
- Os calos induzidos com auxinas ANA (ácido α -naftalenoacético) e 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), em combinação com a citocinina BAP (6-benzilaminopurina), a partir de segmentos foliares de pimenta longa apresentaram três faixas de crescimento lento, ativo e estabilização, com duração aproximada de 21, 35 e 7 dias, respectivamente;
- O corante azul de metileno permitiu separar protoplastos de alta e baixa capacidade de regeneração provenientes de calos de pimenta longa a partir de segmentos foliares;
- Os diâmetros dos protoplastos com alta capacidade de regeneração são de aproximadamente 25 μ m, enquanto os dos de baixa capacidade de regeneração estão acima de 35 μ m;
- Os teores de açúcares solúveis totais, proteínas, amido, celulose e hemicelulose são superiores em calos com alta capacidade de regeneração. Há uma tendência no aumento da pectina solúvel com o período de cultivo.
- Quanto aos elementos minerais, tanto os macronutrientes como os micronutrientes estudados foram superiores em calos com alta capacidade de regeneração. Neste contexto, calos com alta capacidade de regeneração são devidos ao maior teor de cálcio, à maior solubilização de pectinas e à maior reserva energética (amido);

- Os teores de nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio, tenderam a decrescer com o período de cultivo, caracterizando um “efeito de diluição”. Já a concentração de cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco, acompanhou o aumento na produção de matéria seca, explicada pela pouca mobilidade e translocação dos mesmos para as partes em crescimento no tecido vegetal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITCHISON, P. A.; MacLEOD, A.; YEOMAN, M. M. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: STREET, H. E. (Ed.). **Plant tissue and cell culture**. 2. ed. California: Blackwell Scientific Publication. 1977. p. 267-306.
- ALBERSHEIM, P.; NEVINS, D. J.; ENGLISH, P. D.; KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 5, p. 340-345, 1967.
- ALLOUFA, M. A. I.; CAMPOS, M. de A.; SOUZA, E. V. F. de. Callus formation from acerola (*Malpighia glabra* L.) leaf explants cultivated in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, Largo Drive West, v. 35, n. 3, (Part II), p. 54-A, Mar. 1999.
- ALONSO, J.; HOWELL, N.; CANET, W. Purification and characterization of two pectinmethylesterase from persimmon (*Diospyros kaki*). **Journal Science of Food Agriculture**, London, v. 75, n. 3, p. 352-358, Nov. 1997.
- AMIDON, T. E. Effect of the wood properties of hardwoods on Kraft paper properties. **Tappi**, Atlanta, v. 64, n. 3, p. 123-126, Mar. 1981.
- ASKEW, H. O.; CHITTENDEN, E. T.; MONK, R. J.; WATSON, J. Chemical investigations on bitter pit of apples. I. Physical and chemical in leaves and fruits of Cox's orange variety during the season. **New Zealand Journal Agricultural Research**, Wellington, v. 2, p. 1167-1186, 1959.
- BECKER, L. **Propagação in vitro e in vivo, indução de calos, nutrição e quantificação de alcalóides nas espécies *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus corcovadensis* Muell Arg. (Quebra-pedra)**. 1997. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- BEN-ARIE, R.; SAKS, Y.; SONEGO, L.; FRANK, A. Cell wall metabolism in gibberellin-treated persimmon fruits. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 19, n. 1, p. 25-33, June 1996.
- BICALHO, U. O. **Vida útil pós-colheita de mamão submetido a tratamento com cálcio e filme de PVC**. 1998. 145 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BIO-RAD LABORATORIES. **Pulsed field electrophoresis systems:** instructions manual and applications guide. United States of America: Bio-Rad Laboratories, 1992. (Catalog numbers 170-3612 through 170-3729).

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Chemistry**, New York, v. 4, n. 4, p. 330-334, 1962.

BOYD, A. R.; GUNASKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; SIMIC, K.; VINCENT, F. S.; VEAL, A. D. A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 11-16, Mar. 2003.

BRADFORD, J. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, p. 248, 1976.

BRESSANI, R.; ESTRADA, E.; JARQUIN, R. Pulpa y pergamino de café. I. Composición química contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. **Turrialba**, San José, n. 3, p. 299-304, jul./set. 1972.

BURNS, J. K.; PRESSEY, R. Calcium in cell wall of ripening tomato and peach. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 112, n. 5, p. 783-787, Sept. 1987.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/CNPH, 1999. v. 1, p. 87-132.

CARNEIRO, V. T. de C.; CONROI, T.; BARROS, L. M. G.; MATSUMOTO, K. Protoplastos: cultura e aplicação. In: In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/CNPH, 1999. v. 1, p. 413-458.

CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. Palo Alto, v. 47, p. 445-476, 1996.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso?. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 19, p. 16-22, mar./abr. 2001.

COOIL, B. J. **Leaf composition in relation to growth and yield of coffee in Kona**. Kona, Hawaii: Coffee Information Exchange, 1954. 13 p.

COOIL, B. J.; NAKAYAMA, M. **Carbohydrate balance as a major factor affecting yield of coffee tree**. Hawaii: Agricultural Experiment Station of University of Hawaii, 1953. 15 p. Progress report, 91.

COOMBE, B. G. The development of fleshy fruits. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 27, p. 507-528, 1976.

CURTIS, L. T.; SMARELLI, J. Jr.; Metabolite control of nitrate reductase activity in cultured soybean cells. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 127, n. 1/2, p. 31-39, Mar. 1987.

DECLERCK, V.; KORBAN, S. S. Shoot regeneration from leaf tissues of *Phloea paniculata* L. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 147, n. 3/4, p. 441-446, Dec. 1995.

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, London, v. 18, n. 1, p. 26-31, Jan. 2000.

DIAS, D. R. **Seleção de leveduras para fermentação alcoólica do mosto de frutas tropicais**. 2001. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. p. 477-512.

ELZENGA, J. T. M.; KELLER, C. P.; VAN VOLKENBURGH, E. Patch clamping protoplasts from vascular plants: method for the quick isolation of protoplasts having a high success rate of gigaseal formation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 4, p. 1537-1575, Dec. 1991.

ENCICLOPÉDIA MICROSOFT ENCARTA 99, **CD-ROM**. Microsoft Corporation, 1999.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Trad. Berta Large de Morretes. São Paulo: Edgard Blücher, 1985. 293 p.

EVANGELISTA, R. M.; CHITARRA, A. B.; GOLDONI, J. S. Efeito da aplicação de ceras comerciais na pós-colheita de manga (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 18, n. 1, p. 105-114, 1996.

FAHN, A. Secretory tissue in vascular plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 108, n. 3, p. 229-257, Mar. 1988.

FERREIRA, C. P.; JARROUGE, M. G.; TUNDISI, M.; MARTIN, N. F.
Bioquímica básica. 4. ed. rev. e ampl. São Paulo, 2000. 413 p.

FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR para windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FINK, H.; KUHLES, R. Beitrage zur methylemblau farbung der hefezellmembran. **Hoppe-Seylers Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, Strassburg, v. 218, n. 1, p. 65-66, 1933.

FRELLO, S.; STUMMANN, B. M.; SEREK, M. Shoot regeneration of *Campanula carpatica* Jacq. (Campanulaceae) via callus phase. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 85-90, Feb. 2002.

GAVILANES, M. L. **Notas complementares ao livro texto da disciplina:** histologia e anatomia vegetal (Bio 104). Lavras: UFLA, 1995. 67 p.

GEORGE, E. F.; PUTTOCK, J. M.; GEORGE, H. J. **Plant culture media:** commentary and analysis. *Exegetics*, 1988. v. 2, 420 p.

GORSKI, P. M.; CREASY, L. L. Color development in Golden Delicious apples. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 102, n. 1, p. 73-75, Jan. 1977.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/CNPH, 1999. v. 1, p. 183-260.

GROVER, M.; SHARMA, A. K.; DHINGRA, A.; MAHESHWARI, S. C.; TYAGI, A. K. Regulation of plastid gene expression in rice involves calcium and protein phosphatase/kinase for signal transduction. **Plant Science**, Clare, v. 137, n. 2, p. 185-190, Oct. 1998.

HALL, M. A.; ZERONI, M. Molecular effects of hormone treatment on tissue. In: MacMILLIAN, (Ed.). **Hormonal regulation of development**. Berlin: Springer-Verlag, 1980. v. 9, p. 511-586.

HAO, Y. J.; YOU, C. X.; DENG, X. X. Cell size as a morphological marker to calculate the mitotic index and ploidy level of citrus callus. **Plant Cell Report**, New York, v. 20, n. 3, p. 1123-1127, Oct. 2002

HELLER, R.; DARPAS, A.; DEVILLERS, P.; RICHEZ, M. Absorption et exsorption des tissus et fragments végétaux en culture. In: **Les cultures de tissus de plantes**. Paris: CNRS, 1968. p. 149-169.

INSTALLE, P.; CESAR, G.; HOFINGER, M.; GASPAR, T. Evolution dans la composition en macroelements des milieux de culture pour tissus végétaux. **Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent**, Gent, v. 50, n. 2a, p. 317-325, 1985.

JANARDHAN, K. V.; GOPAL, N. H.; RAMAIAH, P. K. Carbohydrates reserves in relation to vegetative growth, flower bud formation and crop levels in arabica coffee. **Indian Coffee**, Bangalore, v. 35, n. 1, p. 145-148, Apr. 1971.

JARVIS, M. C. The proportion of calcium-bound pectin in plant cell walls. **Planta**, Berlin, v. 154, n. 4, p. 344-346, 1984.

JOHNSON, D. S.; MARKS, M. J.; PEARSON, K. Storage quality of cox's orange pippin apples in relation to fruit mineral composition during development. **Journal Horticulture Science**, Ashford, v. 62, n. 1, p. 17-25, Jan. 1987.

KIBBLEWITE, R. P.; RIDDELL, M. J. C.; SHELBORNE, C. J. A. Kraft fiber and pulp qualities of 29 trees of New Zealand grown *Eucalyptus nitens*. **Appita Journal**, Carlton, v. 51, n. 2, p. 114-121, Mar. 1998.

KIKUCHI, A.; SATOH, S.; NAKAMURA, N.; FUJI, T. Differences in pectic polysaccharides between carrot embryogenic and non-embryogenic calli. **Plant Cell Reports**, New York, v. 14, n. 5, p. 279-284, Feb. 1995.

KNEE, M.; SARGENT, J. A.; OSBORNE, D. J. Cell wall metabolism in development strawberry fruits. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 28, n. 103, p. 377-396, Apr. 1977.

KOMAMINE, A.; KAWAHARA, R.; MATSUMOTO, M.; SUNABORI, S.; TOYA, T.; FUJIMURA, A.; TSUKAHARA, M.; SMITH, J.; ITO, M.; FUKUDA, H.; NOMURA, K.; FUJIMURA, T. Mechanisms of somatic embryogenesis in cell culture. Physiology, biochemistry and molecular biology. **In Vitro Cellular and Development biology**, Columbia, v. 28, n. 1, p. 11-14, Jan. 1992.

KOROCH, A.; JULIANI, H. R.; KAPTEYN, J.; SIMON, J. E. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 1, p. 79-83, Apr. 2002.

LARGURA, G.; WENDHAUSEN JÚNIOR, R.; TAVARES, L. B. B.; PESCADOR, R.; CARDOSO, A. Imobilização de células vegetais de *Piper hispidinervium* em crisotila para a produção de safrol. In: PIBIC/CNPq, FURB – Universidade Regional de Blumenau - SC. **Livros de Resumos...** Blumenau, 2002.

LARVAL-MARTINS, D.; QUENNEMENT, J.; MONEGER, R. Pigment evolution in *Lycopersicum esculentum* fruits during growth and ripening. **Phytochemistry**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 2357-2362, Nov. 1975.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Antonio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. 2. ed. São Paulo, 2000. 839 p.

LIMA, L. C. O. **Bioquímica das transformações de manga ‘Tommy Atkins’ na ocorrência de colapso interno tipo “spongy tissue”**. 1997. 147 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LIU, Z.; ULMASOV, T.; SHI, X.; HAGEN, G. GUILFOYLE, T. Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. **Plant Cell**, Rockeville, v. 6, n. 5, p. 645-657, May 1994.

MACHADO, R.A.F. **Fósforo e zinco na nutrição e crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*)**. 1998, 93p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MAGALHÃES, M. M. **Desenvolvimento e carboidratos constituintes do fruto de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Berg cv. “Sabará”)**. 1991. 77 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MAGALHÃES, M. M.; BARROS, R. S.; FINGER, F. L. Changes in structural carbohydrates in developing fruit of *Myrciaria jaboticaba*. **Scientia Horticulturae**, Oxford, v. 66, p. 17-22, 1996.

MAGNAVAL, C.; NOIROT, M.; VERDEIL, J. L.; BLATTES, A.; HUET, C.; GROSDÉMANGE, F.; BEULÉ, T.; BUFFARD-MOREL, J. Specific nutritional requirements of coconut calli (*Cocos nucifera* L.) during somatic embryogenesis induction. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 150, n. 3/4, p. 719-728, Oct. 1997.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. I. da; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. Espécies de *Piper* da Amazônia ricas em Safrol. **Química Nova**, São Paulo, v. 10, n. 3, p. 200-204, maio/jun. 1987.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319 p.

MARQUES, E. et. al. **Técnica laboratoriais de biologia**, Bloco I. Porto: Proto Editora, 1999.

MARRIOTT, J.; PALMER, J. K. Bananas: physiology and biochemistry of storage and ripening for optimum quality. **CRC Critical Review in Food Science and Food Nutrition**, Boca Raton, v. 13, n. 1, p. 41-88, Jan. 1980.

MATSUI, T.; KITAGAWA, H. Effects of ethylene absorbent on polygalacturonase activity of persimmon fruit. **Journal Japan Society Horticultural Science**, Kagawa, v. 57, n. 4, p. 697-701, 1989.

McCREADY, R. M.; McCOMB, E. A. Extraction and determination of total pectic materials in fruits. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 24, n. 12, p. 1586-1588, Dec. 1952.

McKEE, H. S.; ROBERTSON, R. N.; LEE, J. B. Physiology of pea fruits. I. Developing fruit. **Australian Journal of Biological Science**, Melbourne, v. 82, n. 2, p. 137-163, Feb. 1955.

MITCHAM, E. J.; McDONALD, R. E. Cell wall modification during ripening of "Keitt" and "Tommy Atkins" mango fruits. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 117, n. 6, p. 919-924, Nov. 1992.

MONRO, J. A.; LEE, J. Change in elements, pectic substances and organic acids during development of boysenberry fruit. **Journal Science Food Agriculture**, London, v. 38, n. 3, p. 195-207, Mar. 1987.

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

NACIF, S. R. **Ontogenia e crescimento do fruto de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*)**. 1991. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

NASH, D. T.; DAVIES, M. E. Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet Rose cell suspensions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 23, n. 67, p. 75-92, Jan. 1972.

NELSON, N. A. Photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 135, n. 1, p. 136-175, June 1944.

NII, N.; COOMBE, B. G. Structural and development of the berry and pedicel of the grape *Vitis vinifera* L. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 139, p. 129-140, 1983.

NUTMAN, F. G. The root system of *Coffea arabica*. II. The effect as some soil conditions in modifying the normal root-system. **Empire Journal of Experimental Agriculture**, Oxford, v. 11, p. 285-296, 1933.

OJIMA, K.; OHIRA, K. Nutritional requirements of callus and cell suspension cultures. In: THORPE, T. A. (Ed.). **Frontiers of plant tissue culture 1978**. Calgary: University of Calgary, 1978. p. 265-275.

OLLÉ, D.; LOZANO, Y. F.; BRILLOUET, J. M. Isolation and characterization of soluble polysaccharides and insoluble cell wall material of the pulp from four mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, n. 9, p. 2659-2662, Sept. 1996.

PAIVA NETO, V. B. de **Comportamento *in vitro* de tecido foliar e segmento nodal de Moreira (*Chlorophora tinctoria* (L.) Gaudichaud**. 1996. 33 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PATEL, R. Z. A note on the seasonal variations in the starch content of different parts of arabica coffee e trees. **East African Agricultural and Forestry Journal**, Nairobi, v. 36. p. 4, Apr. 1970.

- PERUZZO, E. L. **Efeitos do sombreamento e da área foliar na produção e qualidade do fruto de *Vitis labrusca* L. cv. *Niagara rosada***. 1990. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBELO, R. A.; GIOTO, C. R.; WENDHAUSEN Jr., R.; LARGURA, G.; TAVARES, L. B. B. Biotecnologia da *Piper hispidinervium* – Pimenta Longa. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 15, p. 18-23, jul./ago. 2000.
- PICHA, D. H. Sugar and organic acid content of cherry tomato fruit at different ripening stages. **HortScience**, Alexandria, v. 22, n. 1, p. 94-96, Feb. 1987.
- PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1989. p. 202-220.
- PINTO, C. A. B. P. **Influence of endosperm cell number on size and weight in maize (*Zea mays* L.)**. 1985. 112 p. Thesis (Degree of Doctor of Philosophy) - Faculty of Purdue University, USA.
- REDGWELL, R. J.; FISCHER, M. Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perceptions. In: KNEE, M. (Ed.). **Fruit quality and its biological basis**. Ohio: Sheffield Academic Press, 2002. p. 46-88.
- REINERT, J.; TAZAWA, M.; SEMENOFF, S. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*. **Nature**, London, v. 216, n. 5121, p. 1215-1216, Dec. 1967.
- RENA, A. B.; PEREIRA, A. A.; BARTHOLO, G. F. Teor foliar de minerais, conteúdo caulinar de amido e o depauperamento de algumas progênies de café resistente a ferrugem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA DE CAFEIRAS, 10., 1983, Poços de Caldas. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1983. p. 169-170.
- RIJVEN, A. H. G.; WARDLAW, I. F. A method for the determination of cell number in plant tissues. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 41, n. 2, p. 324-328, 1966.
- ROBERT, D.; ROLAND, J. C. **Biologie végétale**. 2. ed. Paris: Doin, 1998. v. 1, 367 p.

ROCHA, S. F. R.; MING, L. C. *Piper hispidinervium*: A Sustainable Source of Safrole. In: JAMICK, (Ed.). **Perspectives on new crops and new use**. Alexandria: ASHS, 1999. p. 479-481.

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

ROSE, J. K. C.; BENNETT, A. B. Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. **Trends Plant Sciencs**, London, v. 4, n. 5, p. 176-183, May 1999.

SAHOO, Y.; PATTNAIK, S. K.; CHAND, P. K. Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. derived from seedlings and mature plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 69, n. 1/2, p. 85-98, Mar. 1997.

SANTANA, J. R. F. de; PAIVA, R.; SANTIAGO, E. J. A. de; PAIVA, P. D. de O.; PAIVA, L. V. Técnica de estabelecimento *in vitro*. In: PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. p. 36-49. (Textos Acadêmicos).

SANTIAGO, E. J. A. de. **Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC) em condições *in vitro* e *in vivo***. 1999. 118 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.

SANTIAGO, E. J. A. de; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O.; SANTOS, C. G. dos; GOMES, G. A. C. Multiplicação. In: PAIVA, R.; PAIVA, P. D. de O. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. p. 36-49. (Textos Acadêmicos)

SANTOS, C. R. **Métodos não-convencionais para determinação de celulose como parâmetro de seleção de árvores matrizes visando a produção de polpa Kraft-AQ**. 2000. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Madeira) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

SARRIA, S. D.; HONÓRIO, S. L. Mudanças dos açúcares do caqui (*Diospyros kaki*) “Fuyu” durante a sua conservação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 1998, Poços de Caldas. **Conferências...** Lavras: UFLA, 1998. p. 195.

SCHROEDER, J. I.; HEDRICH, R.; FERNANDEZ, J. M. Potassium-selective single channel in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. **Nature**, London, v. 312, n. 5992, p. 361-362, Nov. 1984.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometric**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SERRA, A. G. P. **Análises bioquímicas de calos e estudos da divergência genética em castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.)**. 1999. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SHANDU, S. S.; DHILLON, B. S.; SINGH, S. Starch and total water-soluble carbohydrate in the developing fruits of early and late maturing peach cultivars. **Journal of Horticultural Science**, Ashford, v. 58, n. 2, p. 203-207, Mar. 1983.

SMART, K. A.; CHAMBER, K. M.; LAMBERT, I.; JENKINS, C. Use of methylene staining procedures to determine yeast viability and vitality. **Journal of American Society of Brewing Chemistry**, St. Paul, v. 57, n. 1, p. 18-23, 1999.

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

SOUTHGATE, D. A. T. **Determination of foods carbohydrates**. London: Elsevier Applied Science, 1991. 232 p.

STOVER, R. H.; SIMONDS, N. W. **Bananas**. 3. ed. New York: Longman Scientific and Technical, 1987. 468 p.

TAO, H.; SHAOLIN, P.; GAOFENG, D.; LANYING, Z.; GENGGUANG, L. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 69, n. 2, p. 141-146, May 2002.

TE-CHATO, S.; RUNGNOI, O. Induction of somatic embryogenesis from leaves of Sadao Chang (*Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 311-321, Dec. 2000.

TEIXEIRA, J. C.; DELGADO, E. F.; CORREA, E. M. Degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta do grão de soja, cru ou tostado, em diferentes formas físicas, em vacas da raça holandesa. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 105-110, jan./mar. 1995.

TOBIAS, R. B.; CONWAY, W. S.; SAMS, C. E. Cell wall composition of calcium-treated apples inoculated with *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, Oxiford, v. 32, n. 1, p. 35-39, Jan. 1993.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. de. **Meio e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA, Brasília, DF, 2001. 20 p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 24).

VAGERA, J.; HAVRANEK, P. Regulation of androgenesis in *Nicotiana tabacum* L. cv. White Burley and *Datura innoxia* Mill. Effect of bivalent and trivalent iron and chelating substances. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 25, n. 1, p. 5-14, 1983.

VAN DE KAMER, J. H.; VAN GINKEL, L. Rapid determination of crude fiber in cereals. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 29, n. 4, p. 239-251, July/Aug. 1952.

VASCONCELOS, A. R. D. **Utilização de cloreto de cálcio e atmosfera modificada na conservação de caqui cv fuyu**. 2000. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VASIC, D.; PAJEVIC, S.; SARIC, M.; VASILJEVIC, L.; SKORIC, D. Concentration of mineral elements in callus tissue culture of some sunflower inbred lines. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 12, p. 1987-1994, 2001.

WARD, O. P. **Biotechnology de la fermentacion**: principios, proceso y productos. Tradução de Miguel Calvo Rebollar e Emilia Sevillano Calvo. Zaragoza: Acibia. Canadá: Open University Press, 1991. 265 p. Tradução de Fermentation Biotechnology.

WENÍGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 78, n. 2/3, p. 193-200, Dec. 2001.

WIDHOLM, J. M. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. **Stain Technology**, Baltimore, v. 47, n. 4, p. 189-194, 1972.

WILSON, J. R. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 173-182, Apr. 1994.

WILSON, J. R. Organization of forage plant tissues. In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D. et al. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1993. p. 1-32.

YEO, U-DONG.; KOHMURA, H.; NAKAMURA, N.; SAKARAI, I. Quantitative and qualitative changes of cell wall polysaccharides during somatic embryogenesis and plantlet development of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 39, n. 6, p. 607-614, June 1998.

CAPÍTULO 3

ESTUDOS ANATÔMICOS DE PLANTAS DE PIMENTA LONGA (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle) CULTIVADAS *IN VITRO* E ACLIMATIZADAS

RESUMO

SANTIAGO, Edson José Artiaga de. **Estudos anatômicos de plantas de pimenta longa (*Piper hispidinervium* Candolle, De Candolle) cultivadas *in vitro* e aclimatizadas.** 2003. Cap.3, p.112-139. Tese (Doutorado em Agronomia / Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Características anatômicas da folha, caule e raiz de pimenta longa cultivada *in vitro* e aclimatizada foram estudadas. A epiderme foliar é plurisseriada, constituída de células retangulares e apresenta tricomas tectores pluricelulares concentrados na margem e na nervura mediana. Na superfície adaxial observamos a presença de idioblastos oleíferos. As células oleíferas estão presentes tanto nas plantas aclimatizadas como nas cultivadas *in vitro*, nos diferentes tecidos da folha, caule e raiz, sendo mais concentradas nas folhas, no parênquima lacunoso. Os estômatos estão presentes tanto na superfície foliar adaxial como na abaxial (anfiestomáticos), sendo mais abundantes na abaxial. Os tricomas secretores concentram-se em ambas as faces da folha, sendo encontrados também no caule e raiz, nas condições estudadas. No caule observa-se a epiderme uniestratificada, com a presença de numerosos tricomas tectores. A epiderme da raiz é também uniestratificada. A diferença observada no mesofilo foliar da planta aclimatizada em relação à cultivada *in vitro* foi influenciada pela epiderme adaxial. As revelações contidas nesse estudo indicam que a espécie pimenta longa pode ser cultivada em condições de baixa luminosidade.

Termos para indexação: *Piper hispidinervium*; Piperaceae; anatomia.

* Comitê Orientador: Renato Paiva, PhD (Orientador) - UFLA, Dr. Marcelo Murad Magalhães – UFLA/CNPq-Projeto Genoma.

ABSTRACT

SANTIAGO, Edson José Artiaga de. **Anatomical studies of longo pepper (*Piper hispidinervium* C. DC.) cultivated *in vitro* and acclimatized plants.** Chapter 3, 2003. p.112-139. Thesis (Doctorate in Crop Science). – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.[†]

Anatomical characteristics of leaves, stem and roots of long pepper cultivated *in vitro* and acclimatized were studied. The leaf epidermis is pluseriate with rectangular cells and it is consisted of pluricellular tector trichomes concentrated at the edge of intercostals rib. On the adxial surface it ws observed the presence of oily idoblasts. The oil cells are present in both plants (*in vitro* cultivated and acclimatized) in leaf, shoot and root tissues being more concentrated in the spongy parenchyma of tissues. The stomates are present in both adaxial and abaxial surfaces (amphistomatic), and it was more abundant in the abaxial side. The secretors trichomes concentrated on both surfacesof the leaf. It was also found in stems and roots. The stem has an epidermis uniestratified with the presence of many trichomes. The root epidermis is also uniestratified. The adaxial epidermis was only found in acclimatized plants. Results of these studies indicate that long pepper might be cultivated under low light intensity.

Index terms: *Piper hispidinervium*; Piperaceae; anatomy.

[†] Guidance Committee: Renato Paiva, PhD (Major Professor) - UFLA, Dr. Marcelo Murad Magalhães – UFLA/CNPq-Projeto Genoma.

1 INTRODUÇÃO

A pimenta longa, espécie pertencente à família Piperaceae, um das plantas aromáticas da Amazônia, destaca-se pelo seu cultivo em áreas desmatadas e/ou degradadas e como uma alternativa de exploração auto-sustentável na região. Para Sengupta & Ray (1987) e Santiago (1999) a simplicidade do sistema de produção, a rusticidade da espécie e a facilidade no manejo da cultura e na produção do óleo essencial incentivam a sua exploração comercial nos locais em que o cultivo é conduzido por pequenos agricultores reunidos em associações e cooperativas.

Diversas espécies da família piperácea acumulam substâncias voláteis em órgãos anatômicos específicos. Do ponto de vista de exploração da biodiversidade vegetal, quando esse determinado órgão contém um substrato renovável (ex: folha, flor, fruto e semente), é possível extraí-lo sem eliminar a planta. Nesse sentido, a pimenta longa tem sido considerada uma fonte de óleo essencial ecologicamente correta. No entanto, grande parte dos óleos essenciais mundialmente comercializados são oriundos de cultivos racionais e, sempre que possível, estabilizados genética e climaticamente, o que garante a reprodutibilidade do perfil químico do produto explorado (Siani et al., 2000). Gavilanes (1981) relata que pesquisas de anatomia foliar podem conduzir a soluções para problemas relacionados com a multiplicação, melhoramento e cultura dos vegetais, principalmente plantas nativas brasileiras, que eventualmente possam vir a apresentar interesses econômicos, os quais carecem de pesquisas dessa natureza.

O estudo anatômico dos órgãos vegetativos da pimenta longa é pouco conhecido, principalmente de plântulas micropropagadas *in vitro*. Aspectos da anatomia dos órgãos vegetativos dessa espécie e suas estruturas secretoras de

plantas *in vivo*, objetivando caracterizar a morfologia externa e a estrutura organizacional analisando quantitativamente os apêndices epidérmicos, foram investigados por Nascimento (1997), o que não invalida um estudo comparativo com as condições de crescimento *in vitro*, que por certo proporcionará redução de tempo, utilizando a micropropagação, em escala comercial.

A estrutura interna da lâmina foliar se altera bastante de acordo com a intensidade luminosa (Mitchell, 1979; Whatley & Whatley, 1982; Esau, 1985 e Coombs & Hall, 1989). Segundo esses autores, as folhas apresentam a cutícula desenvolvida à medida que a intensidade luminosa aumenta, sendo mais espessas e menores; o mesofilo é bem desenvolvido, com parênquimas paliçádico e esponjoso bem diferenciados; o número de camadas de células do parênquima paliçádico também é maior, com menor espaço intercelular e maior área de superfície externa de paredes, além de possuir células mais alongadas.

Os estômatos são estruturas através das quais as plantas estabelecem as trocas gasosas com o ambiente (Esau, 1985). Ocorrem em todas as partes aéreas da planta, sendo mais abundantes nas folhas. É bem conhecidos que o número de estômatos varia entre as espécies (Hirano, 1931 e Meidner & Mansfield, 1968) e sua densidade depende do meio em que as folhas se desenvolvem (Eckerson, 1908; e Penfound, 1931). Nascimento (1997) reporta que em pimenta longa estas estruturas encontram-se ligeiramente abaixo das demais células epidérmicas, observando-se grãos de amido em suas células subsidiárias.

A epiderme é a camada (ou as camadas) de células mais externas de todos os órgãos da planta, durante todo o crescimento primário (Cutter, 1986). Muitas das suas características estruturais podem relacionar-se com as funções que esse tecido desempenha na qualidade de camada de células em contato com o ambiente externo à planta (Esau, 1985). Os tricomas são apêndices epidérmicos com funções geralmente ecológicas, isto é, de adaptação da planta ao meio, como defesa contra herbívoros e patógenos (Levin, 1973; Werker &

Fahn, 1988), atração de insetos úteis, como os polinizadores, e repulsão dos nocivos (Goodwin & Mercer, 1972) e redução da perda de água pela transpiração e temperatura foliar, aumentando a reflexão da luz pela superfície das folhas (Werker & Fahn, 1981).

O câmbio vascular, meristema que produz xilema e floema secundários, é chamado comumente de meristema lateral, para diferenciá-lo do meristema apical, por ocupar posição lateral no caule e na raiz nas espécies que possuem crescimento secundário (Esau, 1985). O autor comenta que as células do câmbio vascular não se ajustam ao conceito usual de células meristemáticas, isto é, células com citoplasma denso núcleos grandes e amplamente vacuolizadas, e ocorrem em dois formatos: inicial fusiforme, mais longas do que largas, e inicial radial, ligeiramente alongadas a aproximadamente isodiamétrica.

O tecido vascular compreende as células do floema, xilema e fibras associadas. O floema consiste de vários tipos de células com parede celular delgada, ricas em conteúdo celular; sob o ponto de vista do desenvolvimento, pode ser classificado em tecidos primários, derivados do procâmbio, e secundários, que se originam no câmbio vascular e refletem a organização deste meristema pelo fato de possuírem os dois sistemas, axial e radial (Esau, 1985), enquanto as células do xilema, por sua vez, formam um tecido estrutural e funcionalmente complexo, associado ao floema, distribuindo-se sem interrupção pelo corpo vegetal e relacionada com a condução de água, armazenamento e sustentação.

Gay & Hurd (1975) reportam que uma das respostas das plantas que têm sido de grande interesse é a mudança na densidade de estômatos devido à elevação da pressão parcial de CO₂. Todavia, a densidade estomática é sujeita a variação em um número de níveis. Grandes diferenças são encontradas entre espécies e cultivares. Em uma planta individual, as folhas completamente expandidas exibem gradientes ontogenéticos dentro do espaçamento de

estômatos. A densidade de estômatos é também fortemente afetada pelas condições de crescimento: intensidade de luz, disponibilidade de água, disponibilidade de nutrientes e nível de CO₂.

Gupta (1961) relata que a densidade estomática é inversamente proporcional à área da lâmina foliar e conclui que o número absoluto de estômatos é constante, com folhas de mesma linhagem individual, afirmando ainda que quando as plantas de uma mesma espécie se desenvolvem em ambientes diferentes, a mesma correlação é observada.

As espécies vegetais possuem a faculdade de desenvolver diferentes estruturas anatômicas e morfológicas quando crescem em condições ambientais adversas. Dentro de uma mesma planta ocorrem diferenças entre folhas crescendo em distintas posições na copa devido à quantidade de luz que recebem (Björkman, 1981) durante o crescimento.

O ambiente de cultivo condiciona as mudanças estruturais de transplantados durante o processo de aclimatização das espécies antes de serem levadas ao ambiente de campo (Fidelis, 1998). Segundo Pyykkö (1966), células epidérmicas com paredes espessadas estão relacionadas com ambientes secos, condicionam folhas protegidas por uma epiderme cutinizada, de maneira que as trocas gasosas com a atmosfera são largamente limitadas aos ostíolos.

Faltam estudos relacionados com a anatomia foliar, como também da raiz e caule da pimenta longa, que visam a propagação e cultivos racionais com interesse comercial. São vários os aspectos que dependem, em grande parte, da adaptação das plantas ao ambiente (Salatino et al., 1986). Esses autores relatam que adaptação das espécies aos ambientes se deve às características bioquímicas e/ou morfológicas que condicionam a quantidade de luz absorvida ou refletida, ao grau de hidrofobia do órgão, à pressão de vapor do ar em contato com as folhas, à eficiência do órgão em defender-se de parasitas e patógenos, à quantidade de poluentes ou defensivos absorvidos e, evidentemente, à

magnitude da transpiração cuticular.

Para Santos (1995), face ao reconhecimento das potencialidades da microscopia eletrônica para diferentes áreas de conhecimento, nenhuma outra ferramenta de pesquisa experimentou tão rápido avanço em toda a história da ciência que os microscópios eletrônicos de transmissão (MET) e de varredura (MEV).

Estudos utilizando microscopia óptica e eletrônica de transmissão como de varredura em espécies lenhosas da Amazônia, já foram realizados abordando principalmente algumas características quantitativas de folha, caule e raiz de plantas superiores, especialmente, a frequência estomática. No entanto, estudos das estruturas internas dos órgãos como raiz, caule e folha, da planta de pimenta longa proveniente do cultivo *in vitro*, pela análise da anatomia foliar, especialmente da epiderme, são desconhecidos.

Logo nesse trabalho realizou-se a avaliação anatômica da folha, caule e raiz de pimenta longa cultivada *in vitro* e posteriormente aclimatizada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de cultivo

Plântulas de pimenta longa, após 45 dias de cultivo *in vitro*, foram aclimatizadas em casa-de-vegetação sob densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo de $825 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plântulas cultivadas *in vitro* foram mantidas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16h/8h (claro/escuro) e $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade lumínica. Ambas as plantas foram mantidas no Laboratório de Propagação de Plantas do Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. As condições de intensidade luminosa incidente nas diferentes condições de cultivo foram obtidas por um aparelho QUANTUM COUNTER, modelo Foglia-10 (Light Quantum Sensor).

2.2 Estudos anatômicos

Microscopia óptica

Os materiais botânicos raiz, caule e folha foram fixados no local de coleta com FAA (Formaldeído + Ácido acético + Álcool) 70% (Johansen, 1940) por 72 e, posteriormente conservados em álcool 70^oGL.

Foram efetuados cortes histológicos na raiz, caule e folha dos materiais cultivados *in vitro* e aclimatizados nas seguintes regiões:

- a) Raiz: 0,5 cm abaixo do coleto e na porção mediana,
 - b) Caule: 0,5 cm acima do coleto e 0,5 cm abaixo do primeiro e do segundo entrenós.
 - c) Folha: Corte realizado na região mediana, entre a borda e a nervura centram.
- Foram utilizadas folhas em diferentes fases de desenvolvimento, desde primórdios até folhas completamente adultas, provenientes do quinto nó,

contadas a partir do nó apical, a fim de evitar os efeitos do desenvolvimento heteroblástico (Gavilanes, 1981), das quais foram obtidas secções.

Lâmina semipermanentes da raiz, caule e folha foram obtidas a mão livre e os cortes transversais foram clareados em solução de hipoclorito de sódio a 20% do produto comercial, por um período que variou de três a cinco minutos, em seguida lavados em água destilada, neutralizada em água acética 1%, e montados em glicerina a 50% (Strasburger, 1924). O corante usado foi a mistura de azul de astra-safrarina (Bukatsch, 1972) ou por azul de toluidina (Dops & Gautié, 1928), seguido os métodos descritos por Kauss & Arduin (1997). As mensurações foram feitas com auxílio do microscópio Zeiss Jena de campo claro, modelo ERGAVAL, adaptado a objetiva ocular micrométrica (OSM R10x), com aproximação de 400x. As fotomicrografias foram obtidas no equipamento fotográfico Olympus, em microscópio óptico Olympus BX60 do Laboratório de Citogenética, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Micrsopia eletrônica de varredura

Plântulas aclimatizadas foram previamente seccionadas, separando-se as folhas, caule e raízes. Todo o material foi lavado em solução-tampão de cacodilato de potássio a 0,05M e pH 6,8 (Postek et al., 1980, citado por Santos, 1995) e, posteriormente, colocado no fixador, gluteraldeído a 3%, deixado em repouso na geladeira durante 48 horas. Depois, retirou-se o gluteraldeído e lavando-se em solução-tampão cacodilato de potássio a 0,05M e pH 6,8 (Gerlach, 1977). A desidratação foi realizada pela série alcoólica (álcool 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e álcool etílico absoluto) por 15 minutos em cada concentração. Os materiais foram secos ao ar e a sombra e retiradas as amostras para montagem e levadas à câmara de metalização utilizando-se metalizador marca Jeol, modelo JFC 1100, em uma câmara de metalização de campânula de vidro transparente pela vaporização da liga de ouro paládio sobre o explante.

Todas as amostras foram analisadas a as eletromicrografias em microscópio eletrônico de varredura, modelo Jeol JSM-5400LV, do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, com 15KV de aceleração de voltagem.

A partir das seções transversais foram efetuadas 4 medições de 5 plantas com auxílio da ocular micrométrica, para a espessura dos parênquimas esponjosos, paliçádicos, das epidermes adaxial e abaxial, e as lâminas foram lutadas com esmalte incolor.

As epidermes foram analisadas, em vista frontal, utilizando-se pequenas porções do terço médio das folhas foram submetidas à dissociação pelo método de Shutze (Sass, 1951). O material obtido foi corado com safranina aquosa e montado em glicerina a 50% (Johansen, 1940). Para análise das epidermes, foi empregado o método de raspagem descrito por Metcalfe (1960). Após a separação, estas foram clarificadas com solução de hipoclorito de sódio a 50%, neutralizadas em água acética a 1:500, lavadas em água destilada, coradas com safranina aquosa e montadas em glicerina a 50%.

A observação dos estômatos foi feita com auxílio de câmara clara adaptada a microscópio Olympus CBB. Na determinação do número de estômatos, estes foram contados em 25 campos microscópicos, com área de cada campo equivalente a 0,045 mm². A partir da área de cada campo e da média aritmética dos estômatos, foi calculada a média da densidade estomática. Os estômatos foram classificados de acordo com Van Cotthen (1970).

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

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

S \Rightarrow número de estômatos;

E \Rightarrow número de células epidérmicas.

No estudo anatômico adotou-se o critério de descrever todos os detalhes estruturais da pimenta longa, destacando-se apenas as diferenças observadas nas plântulas cultivadas *in vitro* em relação àquelas aclimatizadas em casa-de-vegetação

2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com três tratamentos e quinze repetições, sendo cada parcela experimental constou de uma lâmina semipermanente e as variáveis de respostas usadas foram:

- a) índice estomático
- b) número de células;
- c) número de estômatos;
- d) diâmetro polar;
- e) diâmetro equatorial;

2.4 Análise estatística.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste F e as médias contrastadas pelo teste Scott-Knott, ao nível de 5% de significância através do programa estatístico SISVAR 4.0 (Ferreira, 2000).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Descrição anatômica foliar

3.3.1.1 Mesofilo

Pelo resultado da análise de variância (Tabela 1B-Anexos), verifica-se que o fator ambiente, referente às condições de cultivo, foi significativa a 5% de ($p < 0,05$) para a variável de resposta espessura da epiderme adaxial e total do mesofilo, enquanto a epiderme abaxial e os parênquimas paliçádico e lacunoso não apresentaram significância, indicando que estas variáveis de respostas não foram afetadas pelas condições de cultivo. Medri & Lleras (1980) concluem que o espessamento das paredes das células epidérmicas, principalmente da face adaxial, é uma adaptação ao ambiente.

A densidade de fluxo de fótons não causou modificações nos parênquimas paliçádico e lacunoso (Tabela 1), mas diferenciou a epiderme adaxial, o que provocou a significância ($p < 0,05$) do mesofilo foliar. Em pimenta longa, pode-se relacionar esse espessamento à alta intensidade luminosa, possivelmente por causa do aumento na camada de células epidérmicas ocasionado pelo aumento da atividade fotossintética nos tecidos parenquimáticos (Santiago et al, 2001). Chazdon & Kaufman (1993), estudando duas espécies congênicas de *Piper*, observaram que a capacidade fotossintética estava correlacionada com a espessura do mesofilo. Considera-se, geralmente, que quanto menor a intensidade luminosa, maior a expansão da lâmina foliar (Evans, 1973; Whatley & Whatley, 1982). Para Evans (1972), o sombreamento causa um espalhamento da unidade organizacional ao longo de uma área maior, que resulta em maior espaço entre as nervuras secundárias, além de um menor desenvolvimento da nervura principal, não mudando o padrão organizacional.

TABELA 1 Características do mesofilo de plantas cultivadas in vitro e aclimatizadas de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG, 2002.

Ambiente de Cultivo	ESPESSURA \pm DP				Total
	Epiderme Adaxial	Parênquima Paliçádico	Parênquima Lacunoso	Epiderme Abaxial	
In vitro	50,50 \pm 9,92 b	69,67 \pm 7,19 a	70,00 \pm 8,86 a	20,00 \pm 4,63 a	210,37 \pm 15,88 b
Aclimatizada	69,67 \pm 4,42 a	68,67 \pm 7,19 a	69,33 \pm 6,78 a	21,00 \pm 3,87 a	228,67 \pm 12,17 a

DP: Desvio Padrão; Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste F ($p < 0,05$).

Como a densidade foliar específica (relação entre peso e área de folhas) tende a ser menor em folhas de luminosidade amenas, comparadas com aquelas de maior luminosidade (Boardman, 1977), o aumento na espessura do mesofilo (Tabela 1) não é devido apenas a um aumento da biomassa de folhas, mas também a uma maior quantidade de matéria seca total assimilada pelas folhas e que é distribuída para o crescimento do caule e ramos. Quanto às características da anatomia interna de plantas adultas da pimenta longa, segundo Nascimento (1997), a espécie possui folha dorsal convexa, epiderme com células irregulares e anexas uma camada de subepidérmica, seguida de parênquima paliçádico bisseriado formado por células arredondadas heterodimensionais, ricas em cristais tipo ráfides e poliédricos, ocupando praticamente a metade do mesofilo, e outra metade pelo parênquima lacunoso, havendo uma subepiderme abaxial com a presença de colênquima contínuo formado, por células com espessamento angular, sendo a epiderme abaxial constituída de células semelhantes às da epiderme adaxial em forma e tamanho, porém diferentes pela alta concentração de gotículas de óleo em seu interior.

O índice da razão área foliar descrito por Blackman & Wilson (1956) é de grande utilidade na análise das respostas aos fatores de crescimento, dentre

eles a luz, sendo inclusive a sua variação um parâmetro para expressar a tolerância relativa de uma determinada espécie.

Para o índice estomático (*Ie*), observa-se Tabela 2 que o fator tratamento foi significativo ($p < 0,05$) na posição mediana da folha, as plântulas cultivadas *in vitro* apresentou do que maior índice estomático do que àquelas aclimatizadas.

TABELA 2 Quadro de médias para o índice estomático (*Ie*), obtido na avaliação de folhas de pimenta longa. (UFLA, Lavras, MG, 2002).

Região de Corte	Cultivadas <i>in vitro</i>	Aclimatizadas
Mediana da Base	42,82 a C	65,61 a A
Mediana do Meio	43,62 a B	63,42 a B
Mediana do Ápice	43,79 a B	64,23 a A

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

Estas observações estão em consonância com as realizadas por Santiago (1999) em plântas de pimenta longa e por Oliveira (1996) em plantas jovens de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum-Sterculiaceae. As diferenças observadas no índice estomático da pimenta longa sob diferentes condições de cultivo estão relacionadas com as detectadas para *Guarea guidonea* (L.) Sleumer sob diferentes percentagens de fluxo de fótons sinteticamente ativo).

Correlações entre densidade estomática, densidade de células epidérmicas e índice estomático (Tabela 2) indicam que as variações na densidade estomáticas dentro de folhas, nas diferentes condições de cultivo aparecem inicialmente na diferenciação do estômato para depois na expansão da folha, demonstrando que há um alto nível de variação nas características do estômato dentro e entre as folhas.

O aumento no nível de luz nas plântulas, desde as condicionadas e

cultivadas *in vitro* em sala de crescimento, até quando estas são aclimatizadas proporciona um aumento na atividade estomática.

A luminosidade pode induzir diferentes graus de xeromorfia ou intensificar características xeromorfas, relatam Withner et al. (1974) e Bonates (1993). Inúmeros dados experimentais citados na literatura mostram que a quantidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo influencia na divisão celular, no crescimento e na diferenciação da célula, promovendo os efeitos como: alongamento das células e produção de pigmentos e açúcares com o aumento da pressão osmótica. De acordo com considerações feitas por Rizzini (1995), a diferenciação das células nos tecidos paliçádicos depende estritamente da luz solar e guardam proporções com a intensidade luminosa.

3.3.1.2 Epiderme

Em secção transversal da lâmina foliar visualiza-se que o mesofilo é dorsiventral com epiderme uniestratificada, o que é comparável tanto nas plantas aclimatizadas (Figura 2A) como nas cultivadas *in vitro* (Figura 1B), apresentando os estômatos nas duas faces, abaxial e adaxial, e tricomas distribuídos esparsamente ao longo de toda lâmina foliar. Sobre a epiderme deposita-se uma fina cutícula que reveste a borda e a nervura principal, visualizadas nas Figuras 1A, 1A₂, 1B e 1B₂.

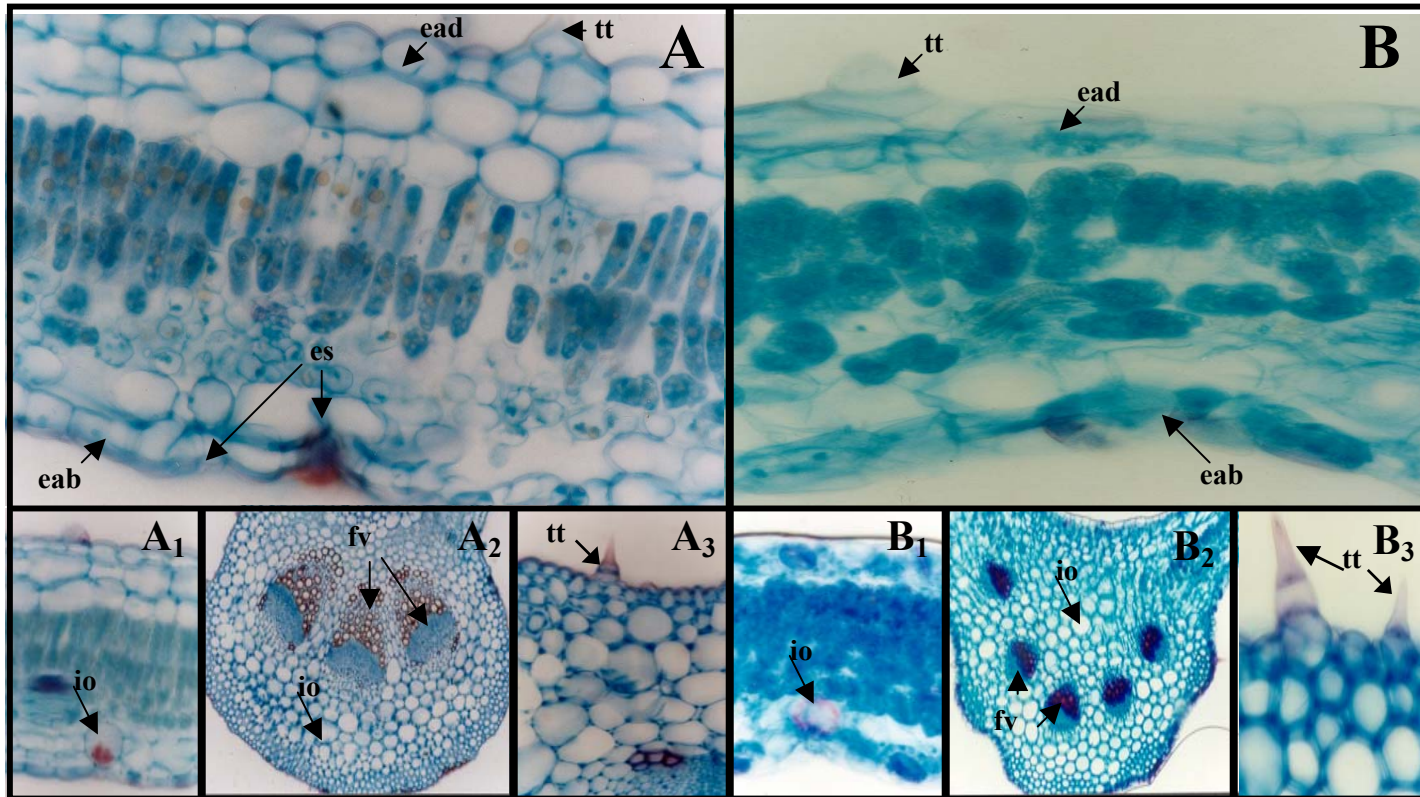


FIGURA 1 Fotomicrografias do corte transversal da lâmina foliar de pimenta longa de plântulas aclimatizadas (A) e cultivadas *in vitro* (B). Detalhe do mesofilo (A₁ e B₁); nervura intercostal (A₂ e B₂); limbo foliar (A₃ e B₃); epiderme adaxial (ead) e abaxial (eab); estômatos (es); tricomas tectores (tt); idioblastos oleíferos (io); feixes vasculares (fv). UFLA, Lavras, MG, 2002.

Em vista transversal (Figura 1A₁), a epiderme adaxial mostra células anticliniais com paredes espessas, retas ou levemente curvas, que lhe conferem formato variado. Na subepiderme (Figura 1A), há dois estratos de células aclorofiladas, praticamente sem espaços intercelulares, poliédricas ou arredondadas, revelando tratar-se possivelmente de uma hipoderme. Nascimento (1997), trabalhando com pimenta longa, e Solereder (1908) e Metcalfe & Chalk (1979), com o gênero *Hibiscus*, descreveram células com as mesmas características encontradas na pimenta longa.

O sistema vascular das plantas aclimatizadas (Figura 1A₂) e das plântulas cultivadas *in vitro* (Figura 1B₂) está representado por feixes de grande, médio e pequeno porte, de organização colateral em forma de semicírculo, envolto por bainha parenquimática e esclerenquimática. Tais bainhas formam extensões ora em direção às duas faces, ora em direção só da face adaxial. Associadas ao floema e xilema, notam-se fibras com paredes lignificadas. Fahn (1988) menciona que as extensões de bainha têm função condutora, levando os produtos dos feixes às células epidérmicas. Segundo Esau (1985), as bainhas envolvem as terminações vasculares de tal maneira que o floema e o xilema, no seu transcurso da folha, não ficam expostos ao ar contido nos espaços intercelulares, o que é comparável aos estudos realizados por Nascimento (1997) em pimenta longa, na qual, segundo o autor, os feixes vasculares estão dispostos em semicírculo, com o floema voltado para fora e o xilema em sentido contrário, observando-se também uma capa de tecido esclerenquimático.

Visualiza-se, nas Figuras 1A₁ e 1B₁, que os idioblastos oleíferos são mais abundantes na subepiderme e se destacam principalmente pela forma esférica e tamanho em relação às demais células. Os tricomas tectores ocorrem com maior frequência na epiderme adaxial (Figura 2A e 2B), enquanto os glandulares (Figura 1A₃ e 1B₃) estão mais concentrados na epiderme abaxial. Sob o ponto de vista evolutivo, Fahn (1988) relata que os tricomas secretores são

as estruturas secretoras, mais recentes, e que, a exemplo dos óleos essenciais (Burger, 1972 e Lütge & Schnepe, 1976), outras classes de compostos podem ser produzidas por esse tipo de tricoma, como flavonóides e quinonas.

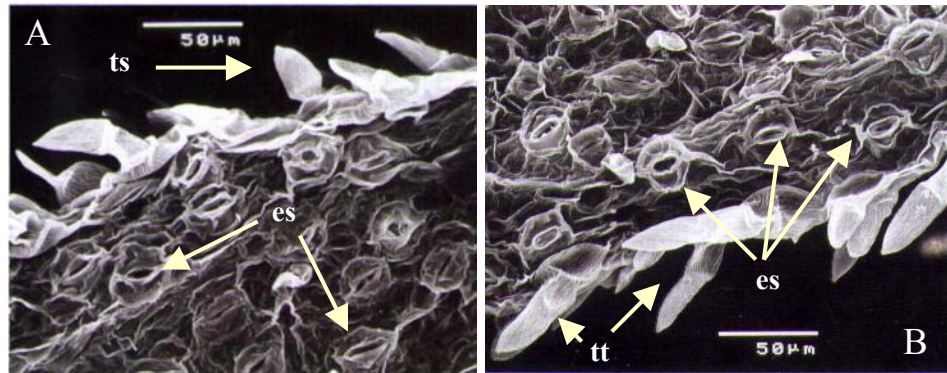


FIGURA 2 Eletromicrografias de MEV da borda da lâmina foliar, face adaxial, de pimenta longa em plântulas aclimatizadas (A) e cultivadas *in vitro* (B); estômatos (es); tricomas tectores (tt); tricomas secretores (ts). EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém, PA, 2002.

O estudo comparativo das condições citadas, visualizadas na Figura 1A e 1B, explica a evolução da diferenciação do mesofilo, ou seja, a expansão diferencial e a divisão celular conduzem ao desenvolvimento das características específicas do mesofilo, bem como ao estabelecimento das diferenças entre parênquima paliçádico e lacunoso (Esau, 1985). Geralmente a diferenciação do mesofilo tem início com um alongamento anticlinal das futuras células em paliçada, acompanhado por divisões anticlinais; essas alterações poderão ser observadas em estudos mais detalhados, o que não invalida as visualizadas nas Figura 1A e 1B.

3.3.2 Descrição anatômica do caule

Pelas Figuras 3A e 3A₁, observa-se em corte transversal do caule de plantas aclimatizadas de pimenta longa, na região mediana do segundo internódio, um revestimento primário com epiderme uniestratificada, intercalada por tricomas tectores e secretores, seguida por uma camada subepidérmica, a primeira periderme. As peridermes subseqüentes, mais profundas, podem iniciar-se mais tarde no mesmo ano, não aparecer durante muitos anos ou jamais aparecer (Esau, 1985). Além das diferenças específicas das espécies, as condições ambientais (Figura 3A e 3B) influenciam o aparecimento das peridermes subseqüentes, como, por exemplo, a exposição à luz solar acelera o desenvolvimento das peridermes profundas (Zeeuw, 1941). Nota-se, em ambas as condições, o anel cambial formado de câmbio fascicular e interfascicular, revelando o crescimento secundário a partir desse internódio, e tantas outras características anatômicas, como a presença de esclereides próxima ao colênquima e a esclerificação da faixa que acompanha internamente os feixes periféricos.

O anel cambial origina o xilema, os raios parenquimáticos parcialmente esclerificados em direção ao centro do órgão e o floema para fora, conforme reporta Nascimento (1997) nos aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de pimenta longa, o que se assemelha aos estudos comparativos das condições de plântulas dessa espécie cultivada *in vitro* e aclimatizada, visualizados nas Figuras 3A e 3B.

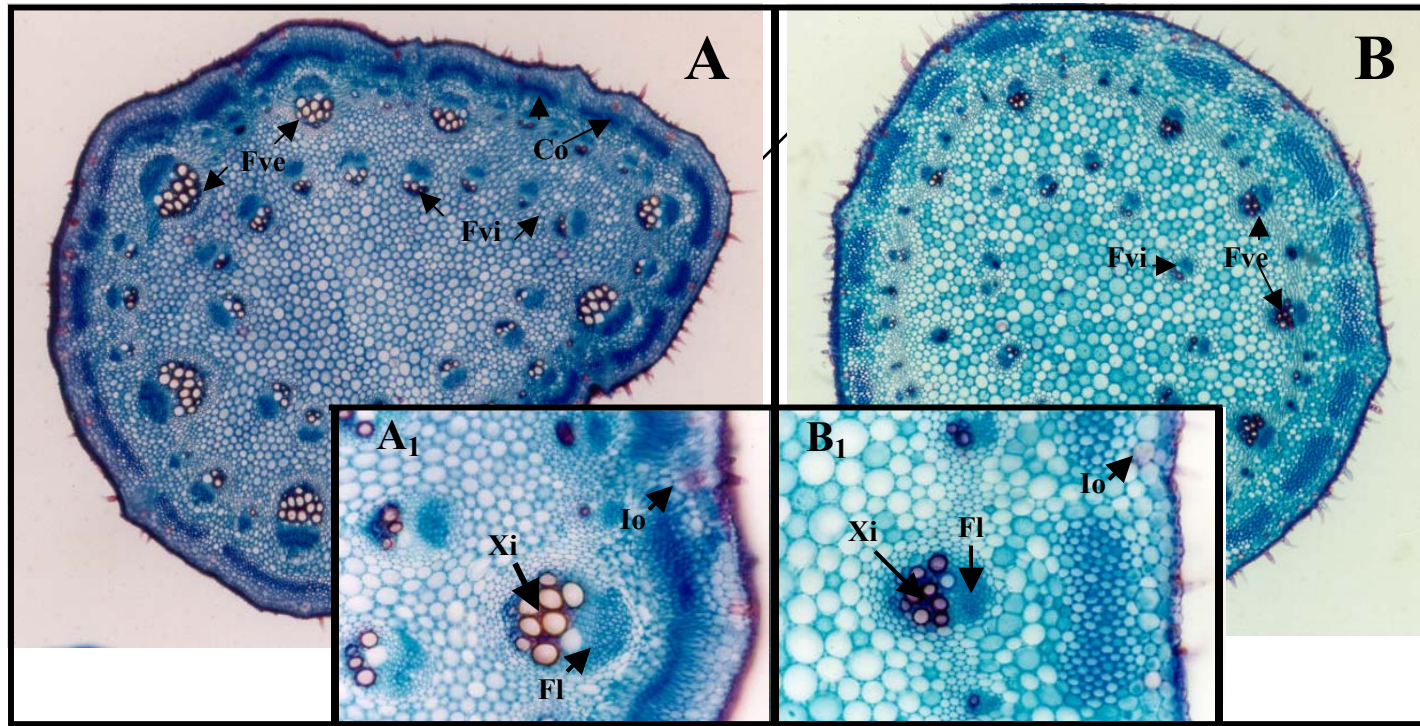


FIGURA 3 Corte transversal do caule, segundo internócio, de pimenta longa em plântulas aclimatizadas (A) e cultivadas *in vitro* (B). Idioblasto oleífero (Io); Colênquima (Co); Feixe vascular interno (Fvi); Feixe vascular externo (Fve); Floema (Fl); Xilema (Xi). UFLA, Lavras, MG, 2002.

As células do parênquima central (Figura 3A₁ e 3B₁) são semelhantes às do parênquima cortical, porém são maiores, mais arredondadas e com paredes mais delgadas. Observam-se os idioblastos oleíferos próximos à epiderme e aos feixes vasculares, os quais, quanto à organização anatômica, encontram-se arranjados de dois anéis medulares, é uma característica também observada por Bond (1931) para as espécies *Piper chaba* Hunter e *Piper tilicefolium* Schlecht. Verifica-se que este é um padrão comum do gênero *Piper*, sendo estes feixes denominados de anômalos (Nascimento, 1997).

3.3.3 Descrição anatômica da raiz

A região cortical da raiz é bem desenvolvida, formada por células heterodimensionais com espaços intercelulares e presença esporádica de aerênquimas (Figura 4A e 4B), sendo a camada mais interna formada por uma endoderme com células ligeiramente transversais e alongadas, com estrias de Caspary não evidentes, semelhante ao observado por Nascimento (1997). A endoderme caulinar é um caráter bastante comum entre as Piperaceae (Bond, 1931). A região vascular, denominada de periciclo, é formada de uma única camada de células heterodimensionais, cuja parte central é constituída por células parenquimáticas arredondadas, com paredes delgadas e pequenos espaços intercelulares, com pólos de xilemas alternados de ninhos de floema (Figura 4A₁) e xilema representado por protaxilema e metaxilema. Segundo Akin (1989), essas estruturas formam barreiras ao ataque microbiano, fato também observado por Poltronieri et al. (1997), em trabalhos realizados nos locais em que a doença fusariose dissimulou as plantações de pimenta-do-reino (*Piper solani*); porém quando foi plantada a pimenta longa, nessa mesma área, não foi observado esse fenômeno.

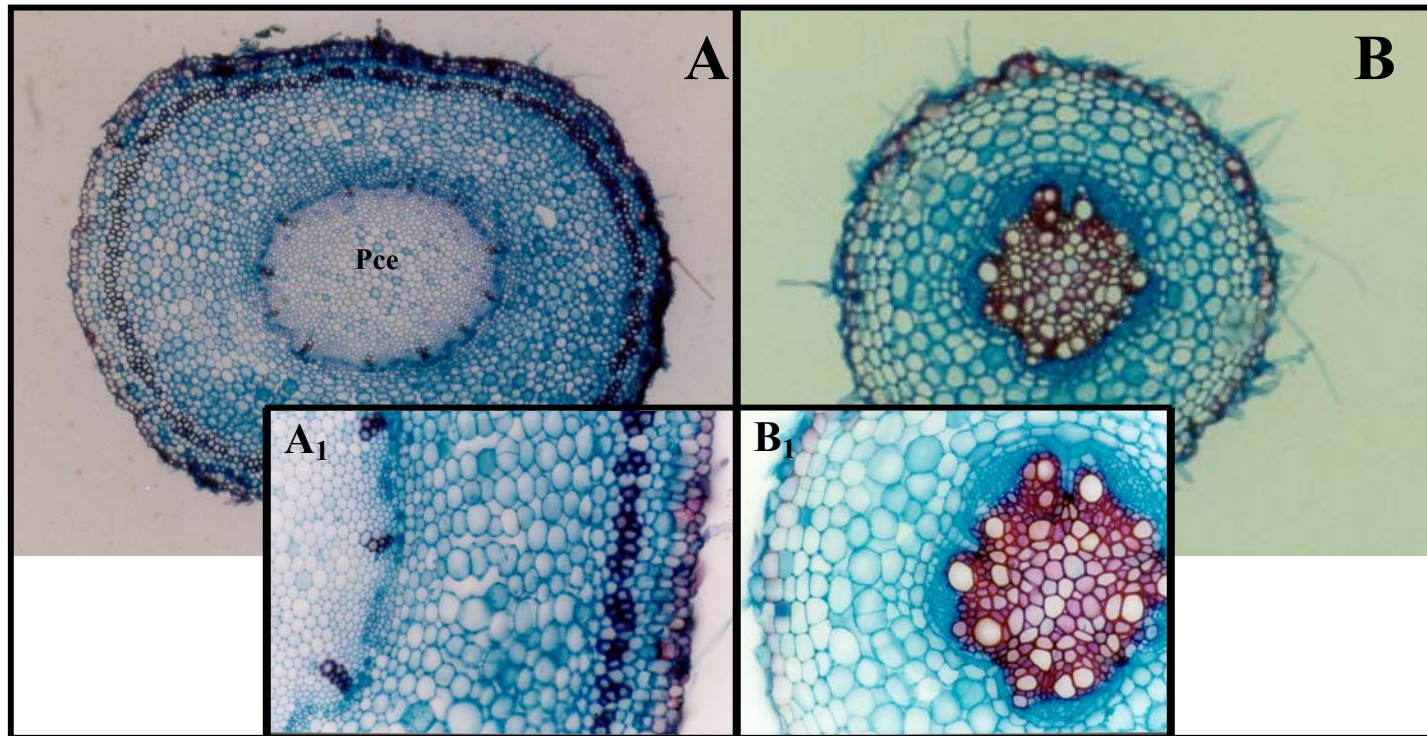


FIGURA 4 Corte transversal da raiz adventícia de pimenta longa em plântulas aclimatizadas (A) e cultivadas *in vitro* (B). UFLA, Lavras, MG, 2002.

3.4 CONCLUSÕES

- Nas condições estudadas, as plantas de pimenta longa cultivada *in vitro* e aclimatizada apresentam similaridade anatômica.
- A manipulação *in vitro* basicamente não causou expressiva alteração nas características anatômicas da pimenta longa.
- Plântulas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas contém células oleíferas na folha, caule e raiz, e apresentam estômatos em ambas as faces, adaxial e abaxial.
- A espécie *Piper hispidinervium*, pimenta longa, pode ser cultivada sob baixa luminosidade.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIN, D. E. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, n. 1, p. 17-25, Jan./Feb. 1989.
- BJÖRKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. In: LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology: physiological plant ecology I**. New York: Springer-Verlag, 1981. v. 12, p. 57-107. (New series).
- BLACKMAN, G. E.; WILSON, G. L. Physiological and ecological studies in the analysis of plant environment, VII. An analysis of the differential effects of light intensity on the net assimilation rate, leaf-area ratio and relative growth rate of different species. **Annals of Botany**, Oxford, n. 43, v. 8, p. 557-561, 1956.
- BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 28, p. 355-377, 1977.
- BOND, G. The stem endodermis in the genus *Piper*. **Transaction Royal Society Edinburgh**, v. 56, p. 695-724, 1931.
- BUKATSH, F. Benerkemgem zeir doppelfarbeing astrablau-safranina. **Microkosmos**, Stuttgart, v. 61, p. 255, 1972.
- BURGER, W. C. Evolutionary trends in the Central American species of *Piper* (Piperaceae). **Brittonia**, Bronx, v. 24, n. 4, p. 356-362, 1972.
- CHAZDON, R. L.; KAUFMAN, S. Plasticity of leaf anatomy of two forest shrubs in relation to photosynthetic light acclimation. **Functional Ecology**, Oxford, v. 7, p. 385-394, May 1993.
- COOMBS, J.; HALL, D. O. (Ed.). **Techniques in bioproductivity and photosynthesis**. Oxford: Pergamon Press, 1989. 192 p.
- CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal: parte I – células e tecidos**. São Paulo: Roca, 1986. 304 p.
- DOP, P.; GAUTIÉ, A. **Manuel de Technique Botanique**. Paris: J. Lamarrre, 1928. 594 p.

- ECKERSON, S. H. The number and size of stomata. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 46, p. 221-224, 1908.
- ESAU, K. **Anatomia vegetal**. Tradução de Dr. José Pons Rossel. 3. ed. Barcelona: Omega, 1985. 779 p. Título original: Plant anatomy.
- EVANS, L. T. The effect of light on plant growth, development and yield. In: SLATYER, R. O. (Ed.). **PLANT RESPONSE TO CLIMATIC FACTORS**. Uppsala, 1970. **Proceedings...** Paris: UNESCO, 1973. p. 21-35.
- FAHN, A. Secretary tissue in vascular plants. **New Physiologist**, Cambridge, v. 108, n. 3, p. 229-257, 1988.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR para windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- FIDELIS, I. **Micropropagação de *Brosimum gaudichaudii* Tréc. (Mamacadela) uma espécie considerada medicinal**. 1998. 109 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- GAVILANES, M. L. **Anatomia e nervação foliar de espécies nativas do gênero *Gomphera* L. (Amaranthaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 1981. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- GAY, A. P.; HURD, R. G. The influence of light on stomatal density in the tomato. **New Phytologist**, Cambridge, v. 75, n. 1, p. 37-46, 1975.
- GERLACH, D. **Botanische mikrotechnik**. Stuttgart: Thieme Verlag, 1977. 311 p.
- GOODWIN, T. W.; MERCER, E. I. Terpenes and terpenoids. In: **Introduction to plant biochemistry**. Braunschweig: Pergamon Press, 1972. p. 256-282.
- GUPTA, B. Correlation of tissues in leaves. Absolute stomatal numbers. **Annals of Botany**, London, v. 25, p. 71-77, 1961.
- HIRANO, E. Relative abundance of stomata in *Citrus* and related genera. **Botanical Gazette**, Chicago, v. 92, p. 276-310, 1931.

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

KAUS, J. E. ; ARDUIN, M. **Manual básico de método em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Seropédica, 1997. 198 p.

LEVIN, D. A. The role of trichomas in plants defense. **Quarterly Review of Botany**, n. 48. v. 1, p. 3-17, 1973.

LÜTGE, U.; SCHNEPE, E. Elimination of secondary plant products. In: LÜTGE, U.; PITMAN, M. G. (Ed.). **Transport in plant II** – part B – tissues and organs. Berlin: Springer-Verlag, 1976. p. 266-277.

MEDRI, M. E.; LLERAS, E. Ecofisiologia de plantas da Amazônia. Anatomia foliar e ecofisiologia de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Castanha -do-Pará) - Lecythidaceae. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 9, n. 1, p. 15-23, 1980.

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

METCALFE, C. R. **Anatomy of monocotyledons**. Oxford: Cleredon Press, 1960. v. 1, 207 p.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. 2. ed. Oxford: Cleredon Press, 1979. v. 1, 276 p.

MITCHELL, R. L. **Crop growth and culture**. Ames: The Iowa State University Press, 1979. 439 p.

NASCIMENTO, M. E. **Aspectos anatômicos dos órgãos vegetativos de *Piper hispidinervium* C. DC. (Piperaceae) e suas estruturas secretoras**. 1997. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Ambiental) – Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

OLIVEIRA, M.N.S. de. **Comportamento fisiológico de plantas de acerola, carambola, pitanga, cupuaçu, graviola, pupunha e biribá em função da baixa disponibilidade de água no solo**. 1996. 67 p, Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PENFOUND, W. T. Plant anatomy as conditioned by light intensity and soil moisture. **American Journal of Botanical**, Botany Columbus, v. 18, p. 558-572, 1931.

- POLTRONIERI, L. S.; ALBUQUERQUE, F. C. de; ROCHA NETO, O. G. da. Reaction of *Piper hispidinervium* to isolates of *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. **Brasilian Phytopathology**, v. 22, n. 1, p. 112, 1997.
- PYYKKÖ, M. The leaf anatomy of east patagonian xeromorphic plants. **Annales Botanici Fennici**, Paris, v. 3, p. 453-622, 1966.
- RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. 2.ed. Rev. e atual. – Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 248p.
- SALATINO, A.; MONTENEGRO, G.; SALATINO, M. L. F. Microscopia eletrônica de varredura de superfícies foliares de espécies lenhosas do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 117-124, dez. 1986.
- SALISBURY, E.J. On the causes and ecological significance of stomatal frequency. With special reference to the woodland Flora. **Philosophical Transaction Royal Society London**, London, n.217, p.1-65, 1927. (Serie B)
- SANTIAGO, E. J. A. de. **Aspectos anatômicos e do crescimento da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC) em condições *in vitro* e *in vivo***. 1999. 118 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SANTIAGO, E. J. A. de; PINTO, J. E. B. P.; CASTRO, E. M. de; LAMEIRA, O. A.; CONCEIÇÃO, H. E. O. da; GAVILANES, M. L. Aspectos da anatomia foliar da pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1035-1042, set./out. 2001.
- SANTOS, J. M. dos. **Microscopia eletrônica de varredura aplicada às ciências biológicas**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1995. 27 p.
- SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Iowa: Iowa State College Press, 1951. 228 p.
- SCHULTZ, A. R. **Botânica sistemática**. Porto Alegre: Globo, 1963. v. 2, 427 p.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometric**, Raleigh, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.
- SENGUPTA, S.; RAY, A. B. The chemistry of *Piper* species: a review. **Fitoterapia**, Milano, v. 58, p. 147-166, 1987.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C. de.; HENRIQUES, M. das G. M. O.; RAMOS, M. F. de S. Óleos essenciais. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v. 3, n. 16, p. 38-43, set./out. 2000.

SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the Dicotyledons**. Oxford: Clarendon Press, 1908. v. 1, 664 p.

STRASBURGER, E. **Handbook of practical botany**. 8. ed. London: George Allen e Nonviirn, 1924. 533 p.

VAN COTTEM, W. R. J. A classification of stomatal types. **Botanical Journal Linnean Society**, London, v. 63, p. 235-246, 1970.

WERKER, E.; FAHN, A. Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) AIT. Development, ultrastructure and secretion. **Botanical Gazette**, v. 142, n. 4, p. 461-476, 1981.

WHATLEY, J. M.; WHATLEY, F. R. **A luz e a vida das plantas**. São Paulo: EPU-EDUSP, 1982. 101 p. (Tema de Biologia, 30)

ZEEUW, C. De. **Influence of exposure on the time of deep cork formation in three northeastern trees**. New York: State College, 1941. 56 p. (Forestry, Syracuse University Bulletin).

PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

Devido às diferenças observadas nas frações de pectina solúvel, hemicelulose e teores de cálcio, principalmente entre os calos com alta e baixa capacidade de regeneração, será interessante, numa próxima etapa, o fracionamento dos componentes pécticos e hemicelulósicos da parede celular desses dois tipos de massas celulares. Essas frações seriam analisadas por cromatografia gélica. As frações que apresentarem diferenças entre os dois tipos de calos serão analisadas num sistema de cromatografia gasosa, acoplado a um espectrômetro de massa (CG-MS) que fornecerá a estrutura química desses componentes. Posteriormente, de posse da seqüência desses açúcares, poderão ser delineados conjuntos de primers que amplifiquem seqüências de interesse utilizando algum tipo de marcador molecular com RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ou Microssatélite. A utilização conjunta dessas técnicas multidisciplinares propiciará a seleção de uma massa de células nos estádios iniciais do desenvolvimento, com alta capacidade de regeneração.

Uma outra opção de pesquisa seria a de comparar os dados de viabilidade entre o azul de metileno e o diacetato de fluoresceína, em calos com alta e baixa capacidade de regeneração.

ANEXOS

ANEXO A	Páginas
TABELA 1A	Resumo da análise de variância relativo ao porcentual de indução, peso (mg) e aspecto dos calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa em diferentes meios de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG. 2002. 145
TABELA 2A	Resumo da análise de variância relativo ao peso médio (mg) e aspecto dos calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o período de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG. 2002. 145
TABELA 4A	Características dos calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002. 146
TABELA 5A	Características distintas dos diâmetros dos protoplastos com alta capacidade de regeneração provenientes de extratos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002. 146
TABELA 6A	Características distintas dos diâmetros dos protoplastos com baixa capacidade de regeneração provenientes de extratos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002. 147
TABELA 7A	Número de protoplastos, em classe diamétricas, provenientes de calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa, durante o período de desenvolvimento. UFLA, Lavras, MG. 2002. 148
TABELA 8A	Resumo da análise de variância das análises químicas de açúcares totais, não redutores e redutores em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG. 2002. 149
TABELA 9A	Resumo da análise de variância das análises químicas de açúcares totais, não redutores e redutores em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante a fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002. 149

TABELA 10A	Resumo da análise de variância das análises químicas de proteínas e amido em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG. 2002.	150
TABELA 11A	Resumo da análise de variância das análises químicas das substâncias pécnicas e a solubilidade em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG. 2002.....	150
TABELA 12A	Resumo da análise de variância das análises químicas de celulose e hemicelulose em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG. 2002.	151
TABELA 13A	Resumo da análise de variância das análises químicas de fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN) e lignina em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG. 2002.	151
TABELA 14A	Resumo da análise de variância das análises químicas de proteínas e amido em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.	152
TABELA 15A	Resumo da análise de variância das análises químicas de substâncias pécnicas e solubilidade em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.	152
TABELA 16A	Resumo da análise de variância das análises químicas de celulose e hemicelulose em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.	153
TABELA 17A	Resumo da análise de variância das análises químicas de fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN) e lignina em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.	153
TABELA 18A	Valores médios das análises em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.	154

TABELA 19A	Valores médios das análises em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.	154
TABELA 20A	Valores médios das análises em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.	154
TABELA 21A	Valores médios das análises em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.	155
TABELA 22A	Valores médios das análises em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.	156
TABELA 23A	Resumo da análise de variância das análises químicas dos elementos essenciais (macro e micronutrientes) em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG. 2002.	157
TABELA 24A	Resumo da análise de variância das análises químicas dos elementos essenciais (macro e micronutrientes) em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de desenvolvimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.	158
TABELA 25A	Teores médios de elementos essenciais (macronutrientes) do crescimento da massa celular de pimenta longa durante o período de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG. 2002.	159
TABELA 26A	Teores médios de elementos essenciais (micronutrientes) do crescimento de calos de pimenta longa durante o período de cultivo <i>in vitro</i> . UFLA, Lavras, MG. 2002.	160
TABELA 27A	Teores médios dos elementos essenciais (macro e micronutrientes) das análises em calos, provenientes de segmentos foliares de pimenta longa, com alta (ACR) e baixa (BCR) capacidade de regeneração durante a fase de desenvolvimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.	161

ANEXO B

Páginas

TABELA 1B	Resumo da Análise de variância do mesofilo foliar, obtidos na avaliação de plântulas de pimenta longa cultivadas <i>in vitro</i> e aclimatizadas. UFLA, Lavras, MG. 2002.	162
-----------	--	-----

TABELA 1A Resumo da análise de variância relativo ao porcentual de indução, peso (mg) e aspecto dos calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa em diferentes meios de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG. 2002.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS		
		% Calos	Peso	Aspecto
Meios de Cultivo	12	12804,819*	3292825,196*	32,969*
Resíduo	247	87,329	212,828	0,491
CV(%)=		13,82	2,32	21,34
Média geral:		67,64	630,123	3,28

* significativo ao nível de 5% pelo teste F. (Valores transformados: Raiz quadrada de $y+0,5$).

TABELA 2A Resumo da análise de variância relativo ao peso médio (mg) e aspecto dos calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o período de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG. 2002.

FV	GL	QUADRADOS MÉDIOS	
		Peso (mg MS)	Aparência dos calos
Período de Cultivo	9	0,113*	4,229*
Resíduo	190	0,017	0,068
CV(%)=		16,69	15,44
Média geral:		0,79	1,69

* significativo ao nível de 5% de pelo teste F. (Valores transformados: Raiz quadrada de $y+0,5$).

TABELA 4A Características dos calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Tempo de Cultivo (dias)	Peso do calo (mg)		Mat. Seca	Crescimento	
	Fresco	Seco	%	Relativo	Absoluto
0	85,4	15,8	18,50	0,00	0,00
7	118,5	19,0	14,35	7,06	7,06
14	164,3	21,9	13,33	22,37	27,85
21	124,6	38,8	31,13	43,56	59,28
28	877,4	142,0	10,73	44,57	77,43
35	652,6	114,3	15,39	48,15	88,30
42	663,7	163,6	41,43	50,91	94,25
49	872,6	311,3	38,39	17,91	95,28
56	874,7	402,1	46,19	17,08	96,09
63	1286,7	399,7	30,47	-3,06	95,97
Média =	572,05	170,45	25,99	24,85	64,15

TABELA 5A Características distintas dos diâmetros dos protoplastos com alta capacidade de regeneração provenientes de extratos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Período de Cultivo	< 20 µm			20 - 35µm			35 - 50µm			> 50µm		
	Media	±	DP	Media	±	DP	Media	±	DP	Media	±	DP
0	16,72	±	2,42	25,96	±	3,98						
7	16,76	±	2,46	28,45	±	4,34	39,42	±	3,95	57,00	±	7,72
14	17,69	±	1,52	28,64	±	3,98	41,09	±	4,09	55,57	±	6,21
21	17,21	±	3,00	28,48	±	4,31	41,50	±	4,03	56,11	±	4,53
28	17,33	±	1,66	29,00	±	3,61	41,29	±	4,24	61,94	±	12,90
35	15,92	±	3,14	29,18	±	3,80	41,37	±	4,37	62,73	±	10,20
42	17,35	±	2,16	28,96	±	3,83	41,96	±	4,79	66,02	±	16,14
49	14,49	±	3,75	28,78	±	4,35	42,58	±	4,01	62,82	±	13,33
56	16,92	±	3,05	28,71	±	3,67	42,02	±	4,37	63,23	±	16,26
63	17,06	±	1,06	28,26	±	3,90	40,95	±	4,02	59,87	±	9,57

DP: Desvio Padrão.

TABELA 6A Características distintas dos diâmetros dos protoplastos com baixa capacidade de regeneração provenientes de extratos foliares de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Período de Cultivo	< 20 μm			20 - 35 μm			35 - 50 μm			> 50 μm		
	Media	\pm	DP	Media	\pm	DP	Media	\pm	DP	Media	\pm	DP
0	0,00	\pm	0,00	0,00	\pm	0,00	0,00	\pm	0,00	0,00	\pm	0,00
7	0,00	\pm	0,00	33,00	\pm	0,00	47,40	\pm	3,39	56,76	\pm	7,47
14	0,00	\pm	0,00	0,00	\pm	0,00	41,57	\pm	5,67	70,74	\pm	9,49
21	0,00	\pm	0,00	26,31	\pm	4,52	45,88	\pm	4,74	60,00	\pm	10,20
28	0,00	\pm	0,00	29,71	\pm	3,66	43,23	\pm	2,77	64,29	\pm	11,40
35	18,84	\pm	1,02	27,19	\pm	4,30	41,56	\pm	5,26	62,83	\pm	8,72
42	19,38	\pm	0,42	28,51	\pm	5,22	42,57	\pm	4,70	60,00	\pm	11,29
49	0,00	\pm	0,00	26,58	\pm	4,80	42,41	\pm	4,39	50,04	\pm	0,00
56	17,08	\pm	1,23	29,39	\pm	4,26	41,70	\pm	4,25	70,82	\pm	21,99
63	17,34	\pm	2,32	27,91	\pm	4,06	40,64	\pm	3,58	72,45	\pm	18,16

DP: Desvio Padrão.

TABELA 7A Número de protoplastos, em classe diamétricas, provenientes de calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa, durante o período de desenvolvimento. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Tempo de Cultivo (dias)	CLASSES DIAMÉTRICAS								TOTAL
	< 20um		20 - 35um		35 - 50um		>50		
	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	
0	326.853.000	0	904.767.000	0	106.582.500	0	0	0	1.338.202.500
7	120.793.500	0	757.920.000	2.368.500	376.591.500	4.737.000	47.370.000	4.737.000	1.314.517.500
14	54.475.500	0	544.755.000	7.105.500	440.541.000	11.842.500	116.056.500	9.474.000	1.184.250.000
21	75.792.000	0	540.018.000	9.474.000	461.857.500	14.211.000	49.738.500	9.474.000	1.160.565.000
28	30.790.500	0	367.117.500	18.948.000	509.227.500	18.948.000	213.165.000	16.579.500	1.174.776.000
35	37.896.000	4.737.000	319.747.500	47.370.000	362.380.500	45.001.500	236.850.000	35.527.500	1.089.510.000
42	11.842.500	4.737.000	172.900.500	26.053.500	198.954.000	49.738.500	116.056.500	30.790.500	611.073.000
49	26.053.500	0	123.162.000	18.948.000	106.582.500	11.842.500	30.790.500	2.368.500	319.747.500
56	4.737.000	7.105.500	118.425.000	45.001.500	104.214.000	33.159.000	54.475.500	52.107.000	419.224.500
63	16.579.500	33.159.000	156.321.000	137.373.000	111.319.500	97.108.500	52.107.000	42.633.000	646.600.500
SubTotal	705.813.000	49.738.500	4.005.133.500	312.642.000	2.778.250.500	286.588.500	916.609.500	203.691.000	9.258.466.500
TOTAL	755.551.50		4.317.775.500		3.064.839.000		1.120.300.500		9.258.466.500

TABELA 8A Resumo da análise de variância das análises químicas de açúcares totais, não redutores e redutores em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS		
		Açúcares totais (mg g ⁻¹)	Açúcares não redutores (mg g ⁻¹)	Açúcares redutores (mg g ⁻¹)
Período de Cultivo	9	0,573 *	0,004 *	0,488 *
Resíduo	60	0,032	0,003	0,034
CV(%)		18,24	55,07	21,89
Média geral		0,977	0,091	0,841

* significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 9A Resumo da análise de variância das análises químicas de açúcares totais, não redutores e redutores em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante a fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

FV	GL	QUADRADO MÉDIO		
		AST	ASR	ANR
Calos	1	57,4088*	47,915*	0,323*
Erro 1	6	0,0004	0,0004	0,007
Tempo	3	22,7641*	21,0133*	0,232 ^{NS}
Erro 2	18	0,1109	0,0054	0,086
Calos X Tempo	3	1,2920*	1,2660*	0,021 ^{NS}
Erro 3	24	0,0054	0,0021	0,007
Cv 1 (%) =		0,08	0,09	9,55
Cv 2 (%) =		1,38	0,32	32,72
Cv 3 (%) =		0,31	0,20	9,41
Média Geral:		24,11	22,98	0,89

* significativo ao nível de 5% pelo teste F.

^{NS} não significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 10A Resumo da análise de variância das análises químicas de proteínas e amido em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da Variação	QUADRADOS MÉDIOS		
	GL	Proteína (mg g ⁻¹)	Amido (mg g ⁻¹)
Período de Cultivo	9	24,221*	1,238 *
Resíduo	60	0,055	0,034
CV(%)		0,71	14,47
Média geral		33,122	1,274

* significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 11A Resumo da análise de variância das análises químicas das substâncias pécicas e a solubilidade em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS			
		Pectina Total (mg 100g ⁻¹)	Pectina Solúvel (mg 100g ⁻¹)	Pectina Insolúvel (mg 100g ⁻¹)	Solubilização (%)
Período de Cultivo	9	6131921,23 *	356379,32 *	8995715,52 *	136,98 *
Resíduo	60	3252,560	3188,357	6153,245	0,339
CV(%)		0,55	2,02	1,04	2,13
Média geral		10352,995	2795,912	7557,084	27,356

* significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 12A Resumo da análise de variância das análises químicas de celulose e hemicelulose em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da Variação	QUADRADOS MÉDIOS		
	GL	Celulose (mg g ⁻¹)	Hemicelulose (mg g ⁻¹)
Período de Cultivo	9	43,833*	4,802 *
Resíduo	60	0,029	0,067
CV(%)		3,15	2,86
Média geral		5,492	9,086

* significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 13A Resumo da análise de variância das análises químicas de fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN) e lignina em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da Variação	QUADRADOS MÉDIOS			
	GL	FDA (%)	FDN (%)	Lignina (%)
Período de Cultivo	9	33,56 *	38,189 *	14,141 *
Resíduo	60	0,155	0,199	0,137
CV(%)		3,04	2,01	5,34
Média geral		12,98	22,234	6,923

* significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 14A Resumo da análise de variância das análises químicas de proteínas e amido em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS	
		Proteína (mg g ⁻¹)	Amido (mg g ⁻¹)
Calos	1	1542,87*	246,08*
Resíduo 1	6	1,03	0,03
Período de Cultivo	3	10,41*	28,48*
Resíduo 2	18	0,10	0,12
Calos X Período	3	9,21*	1,78*
Resíduo 3	24	0,34	0,05
Cv 1 (%)		2,69	1,55
Cv 2 (%)		0,87	2,90
Cv 3 (%)		1,54	1,99
Média Geral		37,80	11,78

* significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 15A Resumo da análise de variância das análises químicas de substâncias pécnicas e solubilidade em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS			
		Pectina Solúvel (mg 100g ⁻¹)	Pectina Insolúvel (mg 100g ⁻¹)	Pectina Total (mg 100g ⁻¹)	Solubilização (%)
Calos	1	492438,78*	63786224,03*	53069476,37*	602,73*
Resíduo 1	6	1270,31	11476,05	6858,80	0,23
Período de Cultivo	3	270116,76*	3903589,74*	4075532,17*	25,91*
Resíduo 2	18	2313,32	243,93	2467,11	0,21
Calos X Período	3	632246,81*	8120709,59*	5444039,30*	113,43*
Resíduo 3	24	1890,86	5639,18	3345,59	0,16
Cv 1 (%)		1,06	1,32	0,72	1,63
Cv 2 (%)		1,43	0,97	0,43	1,53
Cv 3 (%)		1,30	0,92	0,50	1,36
Média Geral		3354,70	8129,73	11484,43	29,64

* significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 16A Resumo da análise de variância das análises químicas de celulose e hemicelulose em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da Variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS	
		Celulose (mg g ⁻¹)	Hemicelulose (mg g ⁻¹)
Calos	1	6,43*	0,42 ^{NS}
Resíduo 1	6	0,07	0,20
Período de Cultivo	3	3,54*	38,30*
Resíduo 2	18	0,09	0,04
Calos X Período	3	4,52*	10,17*
Erro 3	24	0,08	0,03
Cv 1 (%)		7,05	4,51
Cv 2 (%)		8,20	2,00
Cv 3 (%)		7,79	1,72
Média Geral		3,66	10,03

* significativo ao nível de 5% pelo teste F.

^{NS} não significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 17A Resumo da análise de variância das análises químicas de fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN) e lignina em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da variação	GL	QUADRADOS MÉDIOS		
		FDA (%)	FDN (%)	Lignina (%)
Calos	1	0,48 ^{NS}	4,39*	9,36*
Resíduo 1	6	0,11	0,19	0,03
Período de Cultivo	3	13,91*	20,78*	4,50*
Resíduo 2	18	0,04	0,11	0,06
Calos X Período	3	1,92*	7,69*	10,87*
Resíduo 3	24	0,08	0,11	0,11
Cv 1 (%)		2,67	1,94	2,03
Cv 2 (%)		1,60	1,47	2,76
Cv 3 (%)		2,23	1,50	3,66
Média Geral		12,59	22,47	8,91

* significativo ao nível de 5% pelo teste F.

^{NS} não significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 18A Valores médios das análises em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Calos	MÉDIA DAS ANÁLISES ± DP	
	Proteína (mg g ⁻¹)	Amido (mg g ⁻¹)
ACR	43,05 ± 1,39a	13,87 ± 1,07 ^a
BCR	32,55 ± 0,91b	9,68 ± 1,54b

DP: Desvio Padrão; Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste F (p<0,05).

TABELA 19A Valores médios das análises em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Calos	MÉDIA DAS ANÁLISES ± DP			
	Pectina Solúvel (mg 100g ⁻¹)	Pectina Insolúvel (mg 100g ⁻¹)	Pectina Total (mg 100g ⁻¹)	Solubilização (%)
ACR	3448,5 ± 137,29 ± a	9196,9 ± 622,1a	12457,9 ± 670,1a	32,92 ± 1,85a
BCR	3260,9 ± 291,41 b	7062,5 ± 980,19b	10510,9 ± 784,1b	26,36 ± 3,52b

DP: Desvio Padrão; Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste F (p<0,05).

TABELA 20A Valores médios das análises em calos com Alta (ACR) e Baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Calos	MÉDIA DAS ANÁLISES ± DP	
	Celulose (mg g ⁻¹ MS)	Hemicelulose (mg g ⁻¹ MS)
ACR	3,32 ± 0,65 b	10,12 ± 1,23a
BCR	4,00 ± 0,79a	9,94 ± 1,99 b

DP: Desvio Padrão; Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste F (p<0,05).

TABELA 21A Valores médios das análises em calos com alta (ACR) e baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa. UFLA, Lavras, MG. 2002.

MÉDIA DAS ANÁLISES ± DP			
Calos	FDA (%)	FDN (%)	Lignina (%)
ACR	12,7 ± 1,02 a	22,75 ± 0,8 a	9,32 ± 1,24 a
BCR	12,5 ± 0,91 b	22,2 ± 1,64 b	8,5 ± 0,56 b

DP: Desvio Padrão; Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste **F** ($p < 0,05$).

TABELA 22A Valores médios das análises em calos com alta (ACR) e baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de crescimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

CALOS	MÉDIA DOS PERÍODOS DE CULTIVO (dias) ± DP			
	21	28	35	42
	FDA (%)			
ACR	13,97 ± 0,24 a	12,50 ± 0,42 a	13,00 ± 0,23 a	11,27 ± 0,12 a
BCR	14,00 ± 0,29 a	12,00 ± 0,17 b	12,00 ± 0,32 b	12,00 ± 0,17 b
	FDN (%)			
ACR	22,00 ± 0,18 a	24,00 ± 0,23a	22,50 ± 0,5a	22,50 ± 0,29
BCR	20,00 ± 0,24 b	23,33 ± 0,35b	21,43 ± 0,19b	21,43 ± 0,57
	LIGNINA (%)			
ACR	10,00 ± 0,34 a	10,00 ± 0,28 a	10,00 ± 0,41 a	7,27 ± 0,16 b
BCR	9,00 ± 0,14 b	8,00 ± 0,20 b	8,00 ± 0,31 b	9,00 ± 0,28 a
	CELULOSE (%)			
ACR	3,79 ± 0,11 b	2,50 ± 0,17 b	3,00 ± 0,34 b	4,00 ± 0,18 a
BCR	5,00 ± 0,16 a	4,00 ± 0,26 a	4,00 ± 0,34 a	3,00 ± 0,5 b
	HEMICELULOSE (%)			
ACR	8,22 ± 0,13 a	10,00 ± 0,35 b	11,01 ± 0,17 b	11,23 ± 0,11 a
BCR	7,00 ± 0,31 b	12,00 ± 0,20 a	11,34 ± 0,22 a	9,43 ± 0,26 b
	PROTEÍNA (%)			
ACR	40,82 ± 0,13 a	43,74 ± 0,57 a	43,90 ± 0,41 a	43,73 ± 0,69 a
BCR	32,52 ± 0,57 b	32,50 ± 0,64 b	33,53 ± 0,58 b	31,65 ± 0,78 b
	PECTINA SOLÚVEL (mg 100g ⁻¹)			
ACR	3600,2 ± 25,6 a	3527,9 ± 35,6 a	3495,6 ± 23,2 a	3321,8 ± 27,8 a
BCR	2785,7 ± 57,7 b	3440,4 ± 35,6 b	3415,9 ± 23,2 b	3249,7 ± 27,8 b
	PECTINA INSOLÚVEL (mg 100g ⁻¹)			
ACR	6828,9 ± 52,45 b	7120,8 ± 108,0 b	7986,4 ± 81,1 b	6313,8 ± 55,0 b
BCR	10457,2 ± 81,6 a	9741,9 ± 97,1 a	8005,7 ± 77,2 a	8583,0 ± 81,6 a
	PECTINA TOTAL (mg 100g ⁻¹)			
ACR	10429,2 ± 64,2 b	10648,7 ± 72,5 b	11402,4 ± 63,4 b	9563,5 ± 58,0 b
BCR	13242,9 ± 63,2 a	13182,4 ± 58,0 a	11501,3 ± 28,9 a	11904,9 ± 57,7 a
	SOLUBILIZAÇÃO (%)			
ACR	34,52 ± 0,20 a	33,13 ± 0,55 a	29,96 ± 0,34 b	34,07 ± 0,29 a
BCR	21,04 ± 0,44 b	26,10 ± 0,50 b	30,39 ± 0,51 a	27,90 ± 0,50 b
	AÇÚCARES TOTAIS (%)			
ACR	2,58 ± 0,28 b	1,60 ± 0,23 b	1,85 ± 0,11 b	2,43 ± 0,26 b
BCR	2,67 ± 0,21 a	3,59 ± 0,58 a	3,57 ± 0,29 a	2,64 ± 0,11 a

DP: Desvio Padrão; Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste F (p<0,05).

TABELA 23A Resumo da análise de variância das análises químicas dos elementos essenciais (macro e micronutrientes) em calos formados a partir de segmentos foliares de pimenta longa durante o cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da Variação	GL	QUADRADO MÉDIO								
		dag kg ⁻¹					mg kg ⁻¹			
		N	P	K	Ca	Mg	Cu	Mn	Zn	Fe
Período de cultivo	9	2,69 *	0,03 *	3,98 *	0,11 *	0,01 *	1598,57 *	42506,65 *	66893,74 *	326678,12 *
Resíduo	59	0,21	0,01	0,16	0,02	0,01	0,78	173,87	2822,85	6769,63
Cv (%) =		8,4	34,71	13,71	27,27	47,95	3,69	5,64	20,17	21,33
Média Geral:		5,41	0,30	2,93	0,45	0,15	23,92	233,86	263,36	385,71

* Significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 24A Resumo da análise de variância das análises químicas dos elementos essenciais (macro e micronutrientes) em calos com alta (ACR) e baixa (BCR) capacidade de regeneração de pimenta longa na fase de desenvolvimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da Variação	GL	QUADRADO MÉDIO								
		dag kg ⁻¹					mg kg ⁻¹			
		N	P	K	Ca	Mg	Cu	Mn	Zn	Fe
Calos	1	60,76 *	2,42 *	15,27 *	0,62 *	0,176 *	8287,52 *	215140,01 *	104665,01 *	1541310,54 *
Resíduo 1	6	0,65	0,003	1,13	0,002	0,003	5,00	243,39	1222,52	10,82
Tempo	3	2,35 *	0,04 *	0,50NS	0,126 *	0,006 *	292,89 *	12952,88 *	18943,06 *	104621,33 *
Resíduo 2	18	0,62	0,0034	0,17	0,006	0,002	6,35	187,08	983,37	70,13
Calos X Período	3	0,06 ^{NS}	0,003 ^{NS}	0,01 ^{NS}	0,012 ^{NS}	0,0001 ^{NS}	35,81 *	211,92 ^{NS}	17259,26 *	15053,75 *
Resíduo 3	24	0,42	0,01	0,31	0,004	0,003	3,96	423,36	5817,63	74,26
Cv 1 (%) =		18,12	12,22	44,49	8,30	57,29	7,14	5,81	953,04	0,60
Cv 2 (%) =		17,65	14,11	17,45	15,57	42,54	8,05	5,09	11,67	1,54
Cv 3 (%) =		14,59	19,27	32,20	12,96	50,77	6,36	7,66	10,47	1,58
Média Geral:		4,46	0,44	2,38	0,51	0,103	31,31	268,73	299,52	544,24

* Significativo ao nível de 5% pelo teste F.

^{NS} não significativo ao nível de 5% pelo teste F.

TABELA 25A Teores médios de elementos essenciais (macronutrientes) do crescimento da massa celular de pimenta longa durante o período de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Período de Cultivo	Nitrogênio (dag kg ⁻¹)	Fósforo (dag kg ⁻¹)	Potássio (dag kg ⁻¹)	Cálcio (dag kg ⁻¹)	Magnésio (dag kg ⁻¹)
	Media ± DP	Media ± DP	Media ± DP	Media ± DP	Media ± DP
0	6,09 ± 0,61	0,36 ± 0,005	4,58 ± 0,278	0,34 ± 0,011	0,20 ± 0,006
7	5,88 ± 0,46	0,37 ± 0,011	3,63 ± 0,171	0,35 ± 0,010	0,19 ± 0,008
14	5,82 ± 0,24	0,34 ± 0,008	3,36 ± 0,119	0,37 ± 0,011	0,18 ± 0,002
21	5,68 ± 0,28	0,33 ± 0,011	3,05 ± 0,282	0,35 ± 0,013	0,16 ± 0,007
28	5,62 ± 0,58	0,33 ± 0,017	2,74 ± 0,023	0,38 ± 0,010	0,17 ± 0,008
35	5,58 ± 0,42	0,31 ± 0,014	2,56 ± 0,034	0,43 ± 0,012	0,16 ± 0,004
42	5,47 ± 0,46	0,30 ± 0,005	2,46 ± 0,023	0,45 ± 0,011	0,12 ± 0,006
49	5,10 ± 0,49	0,27 ± 0,005	2,20 ± 0,033	0,51 ± 0,014	0,10 ± 0,003
56	4,55 ± 0,40	0,23 ± 0,006	2,20 ± 0,029	0,65 ± 0,010	0,09 ± 0,002
63	4,05 ± 0,47	0,14 ± 0,001	2,40 ± 0,023	0,69 ± 0,012	0,08 ± 0,002

DP: Desvio Padrão.

TABELA 26A Teores médios de elementos essenciais (micronutrientes) do crescimento de calos de pimenta longa durante o período de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Período de Cultivo	Cobre (mg kg ⁻¹) Média ± DP	Manganês (mg kg ⁻¹) Média ± DP	Zinco (mg kg ⁻¹) Média ± DP	Ferro (mg kg ⁻¹) Média ± DP
0	8,90 ± 1,09	152,0 ± 10,1	94,00 ± 6,53	142,50 ± 8,08
7	11,40 ± 0,83	156,0 ± 14,1	143,00 ± 143,00	160,00 ± 6,45
14	12,00 ± 0,5	183,0 ± 13,2	186,28 ± 11,68	196,00 ± 7,85
21	12,57 ± 0,78	183,4 ± 11,5	226,28 ± 12,65	222,67 ± 11,60
28	18,00 ± 1,15	195,1 ± 10	290,00 ± 14,14	277,00 ± 8,17
35	19,30 ± 0,75	220,0 ± 11,7	306,00 ± 12,32	434,28 ± 15,11
42	25,00 ± 0,86	240,0 ± 10,4	330,00 ± 15,56	470,85 ± 12,14
49	38,20 ± 1,15	317,0 ± 11,5	334,42 ± 14,63	640,00 ± 11,54
56	48,00 ± 0,75	333,3 ± 11,7	334,57 ± 16,49	714,00 ± 10,21
63	49,50 ± 0,57	379,6 ± 14,1	410,00 ± 11,55	635,50 ± 12,90

DP: Desvio Padrão.

TABELA 27A Teores médios dos elementos essenciais (macro e micronutrientes) das análises em calos, provenientes de segmentos foliares de pimenta longa, com alta (ACR) e baixa (BCR) capacidade de regeneração durante a fase de desenvolvimento ativo. UFLA, Lavras, MG. 2002.

NITROGÊNIO (dag kg ⁻¹)				
CALOS	Média dos Períodos de Cultivo (dias) ± DP			
	21	28	35	42
ACR	5,88 ± 0,98 a	5,71 ± 0,58 a	5,29 ± 1 a	5,13 ± 0,58 a
BCR	3,87 ± 0,76 b	3,75 ± 0,82 b	3,17 ± 0,58 b	2,85 ± 0,14 b
FÓSFORO (dag kg ⁻¹)				
ACR	0,39 ± 0,09 a	0,38 ± 0,07 a	0,37 ± 0,06 a	0,34 ± 0,07 a
BCR	0,24 ± 0,11 b	0,23 ± 0,09 b	0,23 ± 0,06 b	0,17 ± 0,02 b
POTÁSSIO (dag kg ⁻¹)				
ACR	3,58 ± 0,65 a	3,21 ± 0,55 a	3,18 ± 0,58 a	3,32 ± 0,67 a
BCR	1,54 ± 0,14 b	1,12 ± 0,09 b	0,83 ± 0,12 b	1,17 ± 0,08 b
CÁLCIO (dag kg ⁻¹)				
ACR	0,34 ± 0,11 a	0,39 ± 0,07 a	0,48 ± 0,09 a	0,78 ± 0,12 a
BCR	0,13 ± 0,05 b	0,13 ± 0,03 b	0,27 ± 0,05 b	0,39 ± 0,06 b
MAGNÉSIO (dag kg ⁻¹)				
ACR	0,18 ± 0,09 a	0,17 ± 0,07 a	0,16 ± 0,06 a	0,13 ± 0,02 a
BCR	0,07 ± 0,05 b	0,06 ± 0,02 b	0,04 ± 0,01 b	0,02 ± 0,01 b
COBRE (mg kg ⁻¹)				
ACR	16,40 ± 1,73 a	17,00 ± 1,26 a	20,50 ± 1,15 a	22,41 ± 1,27 a
BCR	4,00 ± 0,71 b	3,90 ± 0,50 b	5,00 ± 0,29 b	6,00 ± 0,58 b
MANGANÊS (mg kg ⁻¹)				
ACR	200,0 ± 6,1 a	207,7 ± 5,3 a	268,0 ± 5,9 a	297,0 ± 4,0 a
BCR	104,0 ± 11,5 b	120,0 ± 12,0 b	160,0 ± 11,9 b	170,0 ± 12,6 b
ZINCO (mg kg ⁻¹)				
ACR	217,0 ± 8,2 a	381,4 ± 8,9 a	507,9 ± 6,9 a	449,0 ± 6,6 a
BCR	48,0 ± 5,9 b	140,0 ± 6,5 b	189,0 ± 5,8 b	137,0 ± 5,9 b
FERRO (mg kg ⁻¹)				
ACR	277,5 ± 5,8 a	318,0 ± 9,2 a	371,0 ± 10 a	538,0 ± 5,9 a
BCR	80,0 ± 9,1 b	150,0 ± 6,4 b	168,4 ± 7,8 b	264,0 ± 11,5 b

DP: Desvio Padrão; Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste F (p<0,05).

TABELA 1B Resumo da análise de variância do mesofilo foliar, obtidas na avaliação de plântulas de pimenta longa cultivadas *in vitro* e aclimatizadas. UFLA, Lavras, MG. 2002.

Causa da Variação	GL	QUADRADO MÉDIO				Total
		Epiderme Adaxial	Parênquima Paliçádico	Parênquima Lacunoso	Epiderme Abaxial	
Ambiente	1	2755,21*	7,50 ^{NS}	3,33 ^{NS}	7,50 ^{NS}	2511,68*
Resíduo	28	58,96	51,67	62,26	18,21	200,06
CV (%)		12,78	10,39	11,33	20,82	6,44
Média geral		60,08	69,17	69,67	20,50	219,52

* Significativo ao nível de 5% pelo teste F.

^{NS} não significativo ao nível de 5% pelo teste F.