

Notas Científicas

Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*

Juliane Dornellas Nunes⁽¹⁾, Giovana Augusta Torres⁽¹⁾, Lisete Chamma Davide⁽¹⁾ e Caio César Salgado⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Lavras, Dep. de Biologia, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: judornellas@bol.com.br, gatorres@ufla.br, lcdavide@ufla.br, caiocesio@yahoo.com.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi detectar diferenças entre duas espécies de pimenta-longa por meio de análise de cariótipos. Foram analisados cinco acessos de *Piper hispidinervum* (Piperaceae) C. DC. e *Piper aduncum* L. (Piperaceae) pertencentes à coleção de germoplasma da Embrapa Acre, utilizando-se o método de esmagamento e coloração de Feulgen. As duas espécies apresentaram número cromossômico $2n = 24$ e cromossomos pequenos e metacêntricos com comprimento médio de 1,38 μm em *P. hispidinervum* e 1,32 μm em *P. aduncum*. Pelos descritores citogenéticos obtidos não há diferença entre as duas espécies.

Termos para indexação: citologia, diferença biológica, cariótipo, Piperaceae, número de cromossomos.

Cytogenetics of *Piper hispidinervum* and *Piper aduncum*

Abstract – The aim of this work was to detect differences between two species of long pepper by karyotypic analysis. Five accessions of *Piper hispidinervum* C. DC. (Piperaceae) and *Piper aduncum* L. (Piperaceae), belonging to germplasm collection of Embrapa Acre, were analysed using squashing technique and Feulgen staining. The chromosome number observed for both species was $2n = 24$ and karyotype presented small metacentric chromosomes, with average length of 1.38 μm in *P. hispidinervum* and 1.32 μm in *P. aduncum*. Karyotypic descriptions pointed out that the species are not different.

Index terms: cytology, biological differences, karyotypes, Piperaceae, chromosome number.

O gênero *Piper* é um dos maiores da família Piperaceae, com pelo menos 1.000 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente da Ásia e do Novo Mundo. É um gênero com boa representatividade comercial e destaque no cenário econômico, sendo a espécie indiana *P. nigrum*, produtora da pimenta-do-reino, a mais difundida no mundo. *Piper hispidinervum*, uma espécie nativa da Amazônia Brasileira, conhecida como pimenta-longa, tem despertado grande interesse como fonte para extração de safrol e sua comercialização.

O safrol, um fenil-éter, é precursor de compostos orgânicos com emprego comercial na indústria farmacêutica, na produção de perfumes e cosméticos, na fabricação de inseticidas piretróides e ainda com potencial para uso na indústria de química fina (Rocha & Ming, 1999).

A coleção de germoplasma de *Piper* da Embrapa Acre conta com três espécies: *P. hispidinervum*, com teor de safrol suficiente para exploração comercial, ou seja, 87 a 97% do óleo essencial; *P. aduncum*, com teor de safrol entre 0,10 e 3,24% e *P. hispidum*, com menos de 1% (Silva & Oliveira, 2000).

Apesar da diferença no teor de safrol, *P. hispidinervum* e *P. aduncum* são morfologicamente muito similares. Portanto, a definição taxonômica de *P. hispidinervum* ainda é controversa e existe a hipótese de que seja uma variedade de *P. aduncum* (Silva, 1993). Em um estudo sobre a diversidade genética da coleção de germoplasma da Embrapa Acre, que usou marcador molecular do tipo RAPD, os autores defendem a hipótese de que se trata de dois grupos distintos. No entanto, o número de acessos de *P. aduncum*, nessa coleção, foi muito restrito e a conclusão sobre a relação genética entre essas duas espécies deve ser fundamentada em estudos adicionais de sua diversidade, bem como na melhor caracterização biológica do germoplasma (Wadt et al., 2004).

Informações citogenéticas têm sido reconhecidas como uma relevante ferramenta para a elucidação de problemas taxonômicos e filogenéticos de plantas, como os identificados na família Piperaceae, que é considerada um grupo taxonômico confuso (Mathew et al., 1999). Apenas 34 espécies do gênero *Piper*, todas asiáticas, apresentaram o complemento cromossômico

caracterizado de alguma forma, mostrando ampla variação de número cromossômico entre espécies e até mesmo dentro de espécies (Dasgupta & Datta, 1976; Samuel & Bavappa, 1981; Jose & Sharma, 1985; Samuel et al., 1986; Joseph et al., 1999; Mathew et al., 1999).

A descrição do complemento cromossômico de *P. aduncum* e *P. hispidinervum* trará subsídios importantes à sua definição taxonômica e também dará suporte ao uso de híbridos interespecíficos para incorporação de caracteres de interesse agrônomo, uma estratégia que já foi usada com sucesso no melhoramento de *P. nigrum* (Sasikumar et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar citogeneticamente acessos de *P. aduncum* e de *P. hispidinervum* presentes na coleção de germoplasma da Embrapa Acre e acrescentar dados ao estudo da variabilidade entre elas. Para tanto, foram avaliados três acessos de *Piper hispidinervum* (BAG 16.7, BAG 19, BAG 19.3) e dois acessos de *P. aduncum* (BAG 203.8 e BAG 207.9). Sementes foram colocadas para germinar a 28°C, em caixas de germinação contendo papel umedecido com água destilada. As radículas foram coletadas com cerca de 0,5 cm de comprimento e pré-tratadas com colchicina 0,01%, a 4°C, por 4 horas. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução gelada de metanol:ácido acético (3:1) e armazenadas a -20°C.

As metáfases colchicínicas foram avaliadas em lâminas preparadas pelo método de esmagamento. Para isso, as raízes fixadas foram submetidas à digestão enzimática da parede celular em solução de celulase 2% e pectinase 20%, por período médio de 4 horas, em câmara úmida, a 37°C. Posteriormente, foi realizada hidrólise em solução de HCl 1 N, a 60°C, por 10–12 min. A coloração foi obtida com reativo de Schiff, por um período médio de 4,5 horas. Os meristemas corados foram isolados em ácido acético 45%, sob microscópio estereoscópio e esmagados sob lamínula, que foi removida com o uso de nitrogênio líquido.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de campo claro Olympus BX 60, equipado com microcâmera digital Optronics acoplada a microcomputador. Para cada espécie, foram selecionadas cinco metáfases, nas quais foram feitas a contagem do número cromossômico e a medição dos braços cromossômicos, por meio do software

de análise de imagem Sigma Scan Pro v. 5. Foram medidas as seguintes variáveis: comprimento do braço longo (BL); comprimento do braço curto (BC); comprimento total do cromossomo (CT = BL + BC); relação de braços ($r = BL/BC$); comprimento do lote haplóide (CLH = ΣCT); comprimento relativo do cromossomo (CR = $100CT/CLH$). A classificação morfológica dos cromossomos foi feita com base na relação de braços, de acordo com Levan et al. (1964), em que cromossomos com r entre 1,0 e 1,7 são metacêntricos (m); cromossomos com r entre 1,7 e 3,0 são submetacêntricos (sm) e cromossomos com r entre 3,0 e 7,0 são subtlocêntricos (st).

Tanto *P. hispidinervum* quanto *P. aduncum* apresentaram número cromossômico $2n = 24$ (Figura 1) em todos os acessos avaliados. Das 34 espécies de *Piper* estudadas até então, apenas *P. cubeba* (Dasgupta & Datta, 1976; Jose & Sharma, 1985), *P. subpetulatum* (Dasgupta & Datta, 1976) e *P. futokazura* (Dasgupta & Datta, 1976) apresentaram $2n = 24$. As demais apresentaram número cromossômico múltiplo de 13 (Samuel & Bavappa, 1981; Jose & Sharma, 1985; Samuel et al., 1986; Joseph et al., 1999; Mathew et al., 1999), o que indica que o conjunto de espécies de *Piper* citogeneticamente conhecidas constitui uma linhagem única com $x = 13$ e vários níveis de ploidia ($2x, 3x, 4x, 6x, 8x, 10x, 12x$ e $16x$).

A determinação do número cromossômico neste trabalho amplia o grupo de espécies com número básico $x = 12$ que, segundo Jose & Sharma (1985), pode ser um grupo primitivo, a partir do qual a linhagem com $x = 13$ evoluiu. *P. hispidinervum* e *P. aduncum* são as primeiras espécies brasileiras a terem seus cromossomos caracterizados e, por isso, é importante que outras venham a ser estudadas citogeneticamente, para que se tenha uma discussão mais conclusiva a respeito do número básico de cromossomos do gênero e sobre as relações evolutivas entre suas espécies.

Em relação à morfologia, nenhum descritor discriminador dos complementos cromossômicos das duas espécies foi observado. Ambas apresentaram 12 pares de cromossomos metacêntricos, com tamanhos reduzidos e compreendidos em intervalos próximos (Tabela 1). Nesse intervalo, o decréscimo progressivo de tamanho foi equivalente nas duas espécies, como pode ser observado nos kariogramas da Figura 1.

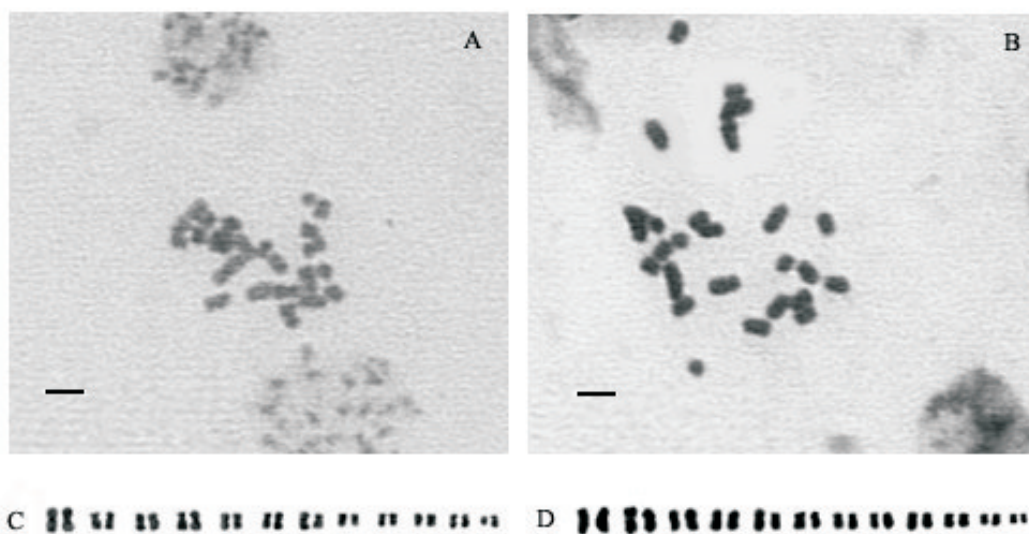


Figura 1. Metáfases somáticas e cariogramas das espécies *Piper aduncum* (A e C) e *Piper hispidinervum* (B e D), ambas com $2n = 24$ cromossomos metacêntricos. Barra = 5 μm .

Tabela 1. Valores médios das medidas cromossômicas dos acessos de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum*⁽¹⁾.

Espécie	2n	FC	ITC (μm)	CCM (μm)	CLH (μm)
<i>Piper aduncum</i>	24	12 m	0,80–2,05	1,32	15,82
<i>Piper hispidinervum</i>	24	12 m	0,81–2,29	1,38	16,59

⁽¹⁾FC: fórmula cariotípica (m, metacêntrico); ITC: intervalo do tamanho cromossômico; CCM: comprimento cromossômico médio; CLH: comprimento do lote haplóide.

Os valores de comprimento de lote haplóide (CLH) apresentaram quantidade muito próxima de cromatina nas duas espécies (Tabela 1). Os valores de comprimento relativo (CR), que correspondem à contribuição de cada cromossomo para o comprimento de todo o lote, variaram de 13,79 a 4,89%, do maior para o menor cromossomo, em *P. hispidinervum*, e de 12,95 a 5,07%, em *P. aduncum*, e a equivalência nas duas espécies se repetiu nos outros dez cromossomos. A posição centromérica, determinada pela relação de braços (r), também foi equivalente nas duas espécies, o que indica posição mediana nos 12 cromossomos.

A avaliação conjunta das informações de CLH, de CR e de r demonstra a equivalência dos dois cariótipos, sem nenhuma evidência de perda ou adição de cromatina ou ainda de alterações cromossômicas estruturais quando se compara *P. aduncum* e *P. hispidinervum*. A semelhança

observada indica necessidade de maior amostragem da variabilidade entre e dentro de acessos a fim de verificar se as pequenas diferenças entre as duas supostas espécies caracterizam diferenciação intra ou interespecífica. A caracterização mais detalhada dos cromossomos dessas duas espécies, com descrição do padrão de distribuição de heterocromatina e identificação de seqüências por hibridização *in situ*, bem como a caracterização de um conjunto maior de espécies de *Piper* da Amazônia, deve contribuir para o melhor entendimento da taxonomia dessas duas espécies.

Existe a possibilidade de cruzamentos entre as duas espécies, caso seja confirmada a categoria específica de *P. hispidinervum*. Essa estratégia pode ser importante para o melhoramento, bem como pode ser usada para aprofundar a investigação sobre as relações taxonômica e evolutiva existentes entre as duas espécies.

A similiaridade cariotípica, apesar de não ser conclusiva, contribuiu para confirmar a hipótese de que se trata de uma única espécie, sendo *P. hispidinervum* uma variedade de *P. aduncum*, com distribuição geográfica restrita.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão de bolsa; à Embrapa Acre, pela disponibilização das sementes.

Referências

- DASGUPTA, A.; DATTA, P.C. Cytotaxonomy of Piperaceae. **Cytologia**, v.41, p.697-706, 1976.
- JOSE, J.; SHARMA, A.K. Structure and behavior of chromosomes in *Piper* and *Peperomia* (Family Piperaceae). **Cytologia**, v.50, p.301-310, 1985.
- JOSEPH, A.; JOSEPH, R.; JOSE, J. Karyomorphometrical analysis in *Piper* species using image analysis system. **Cytobios**, v.97, p.7-11, 1999.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v.52, p.201-220, 1964.
- MATHEW, P.J.; MATHEW, P.M.; PUSHANGANDAN, P. Cytology and its bearing on the systematics and phylogeny of piperaceae. **Cytologia**, v.64, p.301-307, 1999.
- ROCHA, S.F.R.; MING, L.C. *Piper hispidinervum*: a sustainable source of safrole. In: JANICK, J. (Ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999. p.479-481.
- SAMUEL, M.R.A.; BAVAPPA, K.V.A. Chromosome numbers in the genus *Piper*. **Current Science**, v.20, p.197-198, 1981.
- SAMUEL, R.; SMITH, J.B.; BENNETT, M.D. Nuclear DNA variation in *Piper* (Piperaceae). **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v.28, p.1041-1043, 1986.
- SASIKUMAR, B.; CHEMPAKAM, B.; GEORGE, J.K.; REMASHREE, A.B.; DEVASAHAYAM, S.; DHAMAYANTHI, K.P.M.; RAVINDRAN, P.N.; PETER, K.V. Characterization of two interspecific hybrids of *Piper*. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.74, p.125-131, 1999.
- SILVA, A.C.P.R. da; OLIVEIRA, M.N. de. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2000. 13p. (Boletim de Pesquisa, 23).
- SILVA, M.H.L. **Tecnologia de cultivo e produção racional de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C.DC)**. 1993. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- WADT, L.H.O. de; EHRINGHAUS, C.; KAGEYAMA, P.Y. Genetic diversity of 'Pimenta Longa' genotypes (*Piper* spp., Piperaceae) of Embrapa Acre germplasm collection. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.74-82, 2004.

Recebido em 8 de março de 2007 e aprovado em 6 de junho de 2007