FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *Piper hispidum* A PARTIR DE ESTACAS FOLIARES

LEORMANDO FORTUNATO DORNELAS JÚNIOR

Porto Velho (RO)
2018

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL E MEIO AMBIENTE

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *Piper hispidum* A PARTIR DE ESTACAS FOLIARES

LEORMANDO FORTUNATO DORNELAS JÚNIOR

Orientador: Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos

Defesa de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de Concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade, para a obtenção de Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Porto Velho (RO)
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Fundação Universidade Federal de Rondônia

Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

D713r Dornelas Júnior, Leormando Fortunato.

Regeneração de plantas de Piper hispidum a partir de estacas foliares / Leormando Fortunato Dornelas Júnior. -- Porto Velho, RO, 2018.

40 f. : il.

Orientador(a): Prof. Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Fundação Universidade Federal de Rondônia

1.Organogênese in vivo. 2.Enraizamento de folhas. 3.Brotações adventícias. 4.Propagação clonal. I. Santos, Maurício Reginaldo Alves dos. II. Título.

CDU 504

Bibliotecário(a) Cristiane Marina Teixeira Girard CRB 11/897

LEORMANDO FORTUNATO DORNELAS JÚNIOR

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE *Piper hispidum* A PARTIR DE ESTACAS FOLIARES

Comissão Examinadora

Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos
Orientador
Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia

Dr. Vanderlei Maniesi
Membro Interno
Fundação Universidade Federal de Rondônia

Dr. Rogério Sebastião Corrêa da Costa
Membro Externo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Porto Velho, 24 de Setembro de 2018.

Resultado: APROVADO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Leormando Fortunato Dornelas e Maria José Fortunato Dornelas, Não é só pela vida que vocês me deram que eu devo agradecer. Agradeço por ter incutido todos os valores que achavam importantes e por me tornarem na pessoa que sou hoje. Por todo o amor e carinho e sinto um grande orgulho por pertencer a esta família.

> "Honrar o pai e a mãe não é somente respeitá-los, mas também assisti-los nas suas necessidades; proporcionar-lhes o repouso na velhice; cercá-los de solicitude, como eles fizeram por nós na infância" (Allan Kardec).

À Simone Pedrozo Frágoas, minha companheira, namorada "esposa", parceira e amiga, com quem eu sei que passarei por muitos momentos de felicidade como este e é a pessoa que a vida escolheu para ser minha companheira nas horas boas e ruins. Obrigado por sempre estar ao meu lado, me apoiando, incentivando, não deixando eu desistir.

> "Amar é acreditar no outro, dividir sonhos, receber, entregar, perdoar, compreender, aceitar. Amar é querer estar junto, e se separados, unidos pelo pensamento, pelos objetivos, pelos mesmos desejos." (Autor desconhecido).

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos à DEUS, já que ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta.

Agradecimento em especial ao Prof. Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos, pela sua orientação, pela oportunidade, pelo total apoio, confiança e incentivo. Agradeço pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e criticas e total colaboração sempre esclarecendo dúvidas e solucionando problemas, que foram surgindo ao longo desta jornada. sempre disponível e disposto a ajudar, acreditando no meu potencial e sempre mostrando que eu posso ser capaz, e para sempre terá minha eterna gratidão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente – PGDRA da Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR, por me oportunizar um aperfeiçoamento gratuito e de excelência.

Aos Professores do Programa, pela partilha de conhecimento e ensinamentos para a vida.

À Secretária do Programa, Sra. Izabel Tavares, por todo apoio.

Aos colegas de mestrado, pelos momentos divididos juntos, pela união e amizade, trocas de conhecimentos, e agradeço todas as palavras de incentivo que foi mega importânte nesse processo.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/RO, por fornecer todo o suporte necessário permitido a realização do estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Aos meus colegas e amigos, Eric Rios, Ana Carla Soares, e Carolina Barros, pela amizade, paciência, trocas de conhecimentos e vivências. Agradeço de coração a parceria.

À Professora Helen Queite, pela indicação ao mestrado, por acreditar e confiar na minha capacidade, e por tudo isso lhe agradeço.

Agradeço a todos que diretamente ou indiretamente, sempre torceram pelo meu crescimento e que sempre me incentivaram dando conselho e força, para que eu pudesse encarar e vencer esse desafio.

“Para ser um bom observador é preciso ser um bom teórico.”
(Charles Darwin)

RESUMO

Piper hispidum Swingle é um arbusto nativo das terras baixas do México, de distribuição pantropical. A espécie contém amidas, benzenos, ácidos benzóicos, flavonóides e óleos voláteis. Suas atividades antifúngicas, antimicrobianas, antiplasmodiais, leishmanicidas e inseticidas podem ser utilizadas na medicina e na agricultura, o que tem estimulado pesquisas químicas e farmacológicas. A propagação tradicional de espécies de *Piper* não é eficiente, devido à baixa viabilidade e germinação de sementes, recalcitrância, e escasso ou lento enraizamento de estacas. O objetivo da presente pesquisa foi a regeneração de plantas de *P. hispidum*, promovendo a formação de raízes e brotações em secções foliares, visando ao estabelecimento de um método alternativo de propagação dessa espécie. Para isso, foram utilizadas folhas de três tamanhos: pequeno: 4-7 cm de comprimento; médio: 7-10 cm; e grande: 10-13 cm. As folhas foram cortadas em metades (apical e peciolar) por corte transversal no meio da lâmina foliar. As partes cortadas das metades foram imersas em uma solução do hormônio ácido indolbutírico (AIB) a 1000 ppm por 5 e 20 minutos, ou não submetidas ao hormônio. As estacas foram colocadas individualmente em copos plásticos (400 mL) contendo areia e solo (1:1), em casa de vegetação, no Campo Experimental da Embrapa Rondônia, em Porto Velho. Foram utilizadas três posições das metades da folha: apical: metade apical com a secção transversal para baixo; basal: metade peciolar com a secção transversal para cima; e basal invertida: metade peciolar com secção transversal para baixo. Após 82 dias foram avaliados o número e o comprimento das raízes e brotações. Os tratamentos que resultaram em menor proliferação de raízes induziram brotações maiores e mais numerosas. O tamanho das folhas não afetou o número de raízes, mas as folhas pequenas produziram brotações maiores e mais numerosas. A imersão em AIB induziu a produção de raízes. No entanto, o número e o comprimento das brotações foram maiores quando não houve imersão no hormônio. A porção apical gerou raízes mais numerosas e longas, mas as porções basais e basais invertidas produziram maior número de brotações, e a porção basal invertida resultou em maior comprimento das brotações. As estacas de folhas podem ser um método prático para a propagação vegetativa de *P. hispidum*. Para isso, folhas pequenas podem ser utilizadas como fonte de estacas basais e basais invertidas, sem tratamento com auxina.

Palavras-chave: Organogênese *in vivo*; Enraizamento de folhas; Brotações adventícias; Propagação cloral.

ABSTRACT

Piper hispidum Swingle is a shrub native to the lowlands of Mexico, of pantropical distribution. The species contains amides, benzenes, benzoic acids, flavonoids and volatile oils. Its antifungal, antimicrobial, antiplasmodial, leishmanicidal and insecticidal activities can be used in medicine and agriculture, which has stimulated chemical and pharmacological research. The traditional propagation of *Piper* species is not efficient due to the low viability and seed germination, recalcitrance, and poor or slow rooting of cuttings. The objective of the present research was the regeneration of *P. hispidum*, promoting the formation of roots and shoots in leaf sections, aiming at the establishment of an alternative method of propagation of this species. For this, sheets of three sizes were used: small: 4-7 cm in length; medium: 7-10 cm; and large: 10-13 cm. The leaves were cut into halves (apical and petiolar) by transversal cut in the middle of the leaf blade. The cut parts of the halves were immersed in a solution of the indolebutyric acid (IBA) at 1000 ppm for 5 and 20 minutes, or not submitted to the hormone. The cuttings were individually placed in plastic cups (400 mL) containing sand and soil (1: 1), in a greenhouse at the Embrapa Rondônia Experimental Field, in Porto Velho. Three positions of the leaf halves were used: apical: apical half with cross section down; basal: petiolar half with cross section upwards; and inverted basal: peciolar half with cross-section downwards. After 82 days the number and length of roots and shoots were evaluated. Treatments that resulted in lower root proliferation induced larger and more numerous shoots. The size of the leaves did not affect the number of roots, but the small leaves produced larger and larger shoots. The immersion in IBA induced the production of roots in the cuttings. However, the number and length of shoots were greater when there was no immersion in the hormone. The apical portion generated more numerous and long roots, but the inverted basal and basal portions produced a greater number of shoots, and the inverted basal portion resulted in a longer shoot length. Leaf cuttings can be a practical for the vegetative propagation of *P. hispidum*. For this, small leaves can be used as a source of inverted basal stakes, without auxin treatment.

Keywords: Organogenesis *in vivo*; Leaf rooting; Adventitious shooting; Clonal propagation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica do gênero *Piper*. 14

Figura 2 - Planta de *P. hispidum*. 15

Figura 3 - Folha de *P. hispidum*. 15

Figura 4 - Tamanho das folhas: pequena, média e grande. 22

Figura 5 - Posições das porções foliares: apical, basal e basal invertida. 22

Figura 6 - Copo com porções apical, basal e basal invertida em substrato com areia e solo (1:1). 23

Figura 7 - Aspecto do experimento de propagação de P. hispidum por meio de estacas foliares. 23

Figura 8 - Valores médios de número e comprimento de brotações e raízes de *P. hispidum* em relação aos tempos de imersão em AIB. 25

Figura 9 - Crescimento de raízes adventícias em estacas apical e basal. 26

Figura 10 - Valores médios de número e comprimento de brotações e raízes de *P. hispidum* em relação às porções foliares. 27

Figura 11 - Valores médios de número e comprimento de brotações e raízes de *P. hispidum* em relação aos tamanhos das folhas. 28

Figura 12 - Planta com 130 dias produzida a partir de uma estaca foliar basal (seta) de *P. hispidum*. 29

Figura 13 - Planta regenerada a partir de uma estaca foliar basal, após 210 dias de cultivo 29

Figura 14 - Corte transversal da folha. 30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10

2. OBJETIVOS 11

2.1 Objetivo geral 11

2.2 Objetivo especifico 11

3. REFERENCIAL TEÓRICO 12

3.1 O gênero *Piper* (Piperaceae) 12

3.2 A espécie *Piper hispidum* 14

3.3 Constituintes químicos e bioatividade de *P. hispidum* 15

3.4 Utilização de *P. hispidum* na medicina popular 17

3.5 Propagação 18

3.5.1 Propagação sexuada 18

3.5.2 Propagação assexuada por estaquia 18

3.5.3 Propagação assexuada *in vitro* 19

3.6 Ácido indolbutírico 20

4. MATERIAIS E MÉTODOS 22

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 25

5.1 Efeito da imersão em AIB 25

5.2 Efeito das porções foliares 26

5.3 Efeito do tamanho das folhas 28

6. CONCLUSÃO 31

REFERÊNCIAS 32

APÊNDICE 37

1 INTRODUÇÃO

Um novo método de propagação vegetal, até o momento descrito unicamente em uma publicação científica (BASAK et al., 2014), foi testado neste trabalho visando à regeneração de plantas de *Piper hispidum*. Este método consiste na utilização de secções foliares como estacas vegetais, o que representa uma alternativa interessante de propagação vegetal, com diversas vantagens sobre os métodos tradicionais. Em relação à propagação sexuada, por sementes, o presente método não envolve mistura de material genético de diferentes indivíduos, e portanto permite a clonagem de um indivíduo que possua características desejáveis, dependendo da espécie cultivada. Em relação à propagação assexuada, por estacas, este método é muito menos destrutivo para a planta, além de ser mais produtivo, prático e de baixo custo.

A planta escolhida para a avaliação deste método de propagação foi *P. hispidum*, uma espécie nativa do México mas de vasta distribuição pelos trópicos, incluindo a região da Amazônia brasileira. Esta espécie reúne características de interesse para a propagação, pois tem sido amplamente utilizada na medicina popular, devido à bioatividade dos diversos compostos secundários que produz, cujo uso potencial na medicina e na agricultura tem estimulado pesquisas químicas e farmacológicas. Além disso, conforme mencionado por Ahmad et al. (2011), a extensa coleta de plantas do gênero *Piper* nos ambientes naturais, devido ao seu extenso uso na medicina popular, aliada ao desmatamento das florestas tropicais, tem diminuído suas populações e até mesmo ameaçado a espécie, levando a um esgotamento da diversidade genética insubstituível e evidenciando a necessidade do cultivo destas plantas.

Os resultados aqui apresentados da pesquisa, na qual foram avaliados fatores básicos para a utilização em escala ampla deste método. Para isso, foi determinado o tamanho das folhas que devem ser utilizadas, qual a porção foliar (apical ou basal) tem maior potencial de regeneração de plantas e em qual posição estas porções foliares devem ser dispostas no substrato, e a necessidade do emprego de hormônio para o enraizamento das estacas foliares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo da presente pesquisa foi obter a regeneração de plantas de *P. hispidum*, com o enraizamento em estacas foliares e a posterior formação de brotações.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do ácido indolbutírico sobre o enraizamento e a regeneração de plantas a partir de estacas foliares.
- Avaliar o enraizamento e o potencial regenerativo de diferentes porções foliares de *P. hispidum* e posições destas porções no substrato.
- Avaliar o enraizamento e o potencial regenerativo de estacas foliares de *P. hispidum* em relação ao tamanho das folhas utilizadas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O gênero *Piper* (Piperaceae)

O gênero *Piper* (Piperaceae) é um grupo pantropical (Figura 1) com quase 2000 espécies, constituindo um importante elemento das florestas de planície e montanha. A maioria das espécies de *Piper* está reservado a altitudes que variam de 0 a 2500 m, e poucos ocorrem acima de 3000 m. É um dos dez gêneros mais numerosos de angiospermas encontrados nos trópicos, atinge sua maior diversidade em terras baixas da região neotrópical (américas) com aproximadamente 1300 espécies, e uma estimativa de 700 espécies na região paleotrópical (áfrica e ásia) (CHAKRABORTY e SHAH, 2011).

Foram descritos cerca de 19 gêneros para a família Piperaceae. São reconhecidos no Brasil os gêneros *Peperomia* Ruiz e Pav., *Manekia* Trel., *Piper* L. e *Ottonia* Spreng. Os representantes da família são facilmente reconhecidos por apresentarem folhas simples, flores diminutas, aclamídeas reunidas em inflorescências do tipo espiga, ovário súpero com um óvulo e fruto do tipo drupa. No entanto, a dificuldade de delimitação taxonômica em Piperaceae reside no nível específico (CHRIST, 2016).

A maior diversidade de espécies de *Piper* ocorre nos trópicos americanos (700 spp.), seguida pela Ásia (300 spp.), Onde as espécies economicamente importantes são *P. nigrum* L. (pimenta preta) que se tornou uma das principais fontes de temperos em todo o mundo, e *P. betle* L. (bétele) utilizadas para aliviar a prisão de ventre em crianças (JARAMILLO e MANOS, 2001; CHAVEERACH, et al., 2008).

Em todos os trópicos, várias espécies de *Piper* possuem valor econômico indiscutível, são usadas para muitos propósitos, como alimentos, temperos, perfumes, óleos, venenos de peixes, inseticidas, alucinógenos e medicamentos. Nas Américas, as espécies de *Piper* têm sido usadas para tratar uma variedade de doenças ginecológicas, problemas gastrointestinais, depressão, ansiedade, dor e inflamação, bem como infecções bacterianas e fúngicas (MICHEL et al., 2010).

Diversas espécies são utilizadas para fins medicinais: *P. umbellatum* (capeba) para dores de estômago e seus frutos são mastigados com bétele para tosses. Suas folhas também são consumidas cruas ou cozidas com tempero, podendo ser aquecidas e aplicadas no peito para aliviar a tosse e a asma. A decocção de folhas de *P. sarmentosum* é utilizada para curar dores nos ossos e aplicadas nas testas de crianças que sofrem de dores de cabeça. *P. poryphyrophyllum*, uma espécie selvagem com folhas roxas e salpicadas, supostamente

eficazes contra lepra, dores de estômago em crianças e uma variedade de doenças de pele (CHAN e WONG et al., 2014).

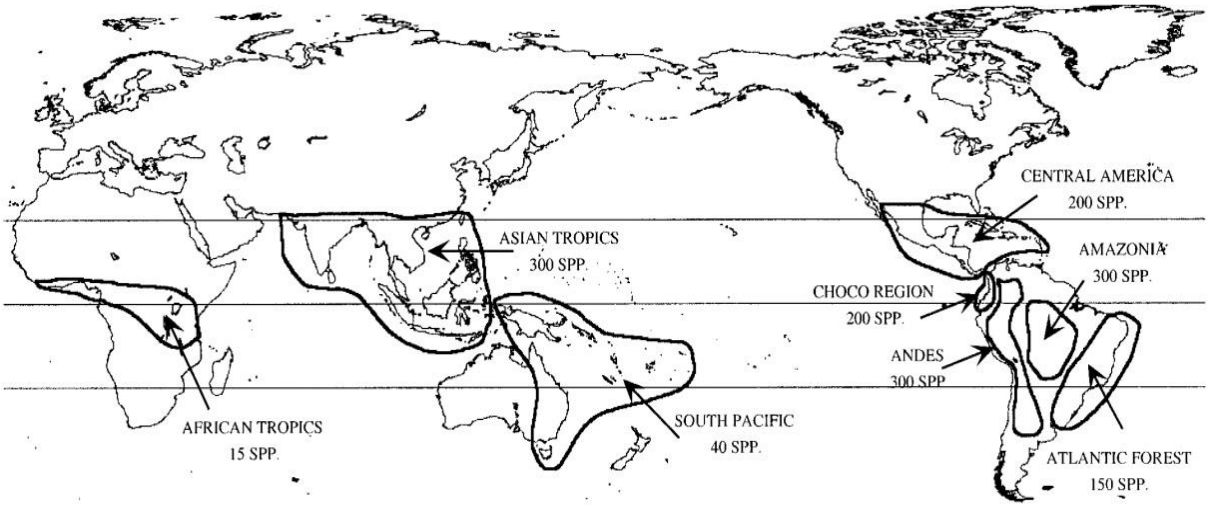
Em sua maioria são trepadeiras, perenes, lenhosas e arbustivas com nódulos e estômatos dilatados ou inchados. As folhas de várias espécies de *Piper* são tipicamente aromáticas ou têm cheiro pungente; são inteiras, dorsiventrais, alternas, raramente opostas ou verticiladas, pecioladas com estípulas. As espécies do gênero são arbustos eretos ou escandentes, aromáticos, apresentam indumento variado, caule articulado e nodoso, podendo ser reconhecidas por sua fruta pulposa (RAHMAN et al., 2016).

As espécies do gênero *Piper* estudadas sob o ponto de vista fitoquímico apresentaram uma grande variedade de metabólitos secundários e podem ser extraídos das espécies de *Piper* e comercializados como perfumes. Também são conhecidos por conter terpenos e resinas, responsáveis pelo gosto adstringente. Investigações fitoquímicas de espécies de Piperaceae mostram variações distintas de flavonóides, dos quais têm sido isolados vários compostos fisiologicamente ativos, sendo alcalóides / amidas, propenilfenóis, lignanas, neolignanas, terpenos, esteroides, kawapironas, piperolídeos, chalconas, diidrochalconas, flavonas e flavanonas. O rastreio fitoquimíco de *Piper* revelou a presença de uma variedade de produtos naturais como ácido mevalônico (monoterpenos e sesquisterpenos), amidas de cinamolo e alquilamidas, aristolactamas, flavona, dihidroflavona, dihidrochalcona e flavonoides (SANTANA, 2012; BRAGA, 2017).

Estudos realizados com plantas do gênero *Piper* nativas e cultivadas no estado de Rondônia têm demonstrado que são produtoras de óleos essenciais, amidas, flavonoides e fenilpropanoides, entre outros metabólitos secundários (FACUNDO et al., 2008).

Christ (2016), destaca os trabalhos de Yuncker (1972, 1973, 1974) que realizou uma vasta revisão das espécies de Piperaceae no Brasil apresentada em uma obra de quatro volumes. Este autor reuniu conhecimento sobre 457 espécies de Piperaceae, inclusive novos táxons para a ciência, e revisou nomes para os gêneros *Piper*, *Peperomia*, *Photomorphe*, *Sarcorhachis* e *Ottonia*. Esta obra é reconhecida como a principal contribuição para o conhecimento de Piperaceae no Brasil, dado que nenhum estudo semelhante foi realizado a partir de então.

Figura 1 - Distribuição geográfica do gênero *Piper* por Jaramillo e Manos (2001).



3.2 A espécie *Piper hispidum*

Piper hispidum é um arbusto nativo das terras baixas do México, conhecido popularmente como “jabo randi”, “falso-jaborandi”, “cordoncillo”, “matico”, “aperta-joão” e “matico-falso”. É uma espécie de distribuição neotropical, comumente encontrada em locais perturbados e florestais. A distribuição geográfica desta espécie se estende pelas Américas, do México à Argentina. No Brasil, encontra-se nos estados do Amazonas, Pará, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina, Mato Grosso, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Rondônia (FACUNDO et al., 2008).

As sementes germina logo após distúrbios naturais ou provocados pelo homem mas também é comum no sub-bosque de florestas de transição e podem persistir em floresta primária. A germinação da espécie é controlada pelo fitocromo e ocorre na natureza somente quando as sementes são repetidamente expostas à luz não-filtrada pela vegetação ou após vários meses de armazenamento no solo (MENG et al., 2014).

A espécie possui porte arbustivo, medindo cerca de 1,8 a 2,0 m de altura (Figura 2), caule cilíndrico, de coloração verde-clara, nodoso, áspero, com lenticelas e ramos mais jovens pubescentes. As folhas (Figura 3) são alternas, simples, curtamente pecioladas, inteiras, de formato ovado, apresentando limbo assimétrico com 15,0 - 17,0 cm de comprimento e 10,0 - 12,0 cm de largura, coloração verde-escura na face adaxial e verde-clara abaxialmente, ápice acuminado e base obtusa. Espigas eretas, 8-14 cm comprimento; pedúnculo até 1 cm comprimento, hirtelo; bractéolas triangular peltadas e franjadas na margem. Quatro estames. Frutos tipo drupas oblongas ou lateralmente comprimidas, papiloso-puberulentas no ápice,

com três estigmas persistentes sésseis. O sistema radicular adventício é extenso, ramificado, constituído por raízes finas que partem da base subterrânea e alargada do caule e assumem posição paralela à superfície do solo (FREIRE, 2015; CUNHA, 2014).

Figura 2. Planta de *P. hispidum*.

Figura 3. Folha de *P. hispidum*.

3.3 Constituintes químicos e bioatividade de *P. hispidum*

Os metabólitos secundários têm um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes; essas moléculas contribuem para que as mesmas possam ter uma boa interação com os diferentes ecossistemas sendo responsáveis por diversas atividades biológicas. Podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas (fitoalexinas). As três famílias de moléculas principais são consideradas: os compostos fenólicos, os compostos terpênicos e esteróides, e os alcalóides (FUMAGALI et al., 2008).

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, englobando desde moléculas simples até outras

com alto grau de polimerização. Estão relacionados, principalmente, com a proteção, conferindo alta resistência a microrganismos e pragas. Nos alimentos, estes compostos podem influenciar o valor nutricional e a qualidade sensorial, conferindo atributos como cor, textura, amargor e adstringência. Na maioria dos vegetais, os compostos fenólicos constituem os antioxidantes mais abundantes (SOARES et al., 2008; EVERETTE et al., 2010).

Os compostos terpênicos e esteróides são caracterizados por apresentar diversas ações farmacológicas, sendo as principais a anti-inflamatória, analgésica e inseticida. Os esteróides vegetais são compostos com 28 ou 29 carbonos, diferindo do colesterol (27 carbonos) pela presença de uma ramificação metila ou etila adicional na cadeia carbônica. Dentre os efeitos dos esteroides vegetais, são reconhecidas suas propriedades hipocolesterolêmicas. Dentre seus benefícios à saúde humana destaca-se a redução da absorção do colesterol da dieta, com consequente redução dos níveis sanguíneos; a redução do risco de doenças cardiovasculares; e inibição do crescimento de certos tipos de tumores malignos (PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Os compostos terpênicos apresentam diversas atividades biológicas, entre as quais se destacam cardioprotetora, gastroprotetora, anti-inflamatória, antitumoral, leishmanicida e anti-hiperglicêmica (CURSINO, et al., 2009). Essas ações farmacológicas são citadas em estudos desenvolvidos por Schwertner et al. (2008) onde ele ressalta atividades significativas contra inflamações, dores hepáticas e úlceras, e ainda atividades antimaláricas, citotoxidade contra células tumorais em proliferação e inibição do vírus HIV-I.

Os alcalóides podem ser definidos como compostos farmacologicamente ativos, contendo um nitrogênio e derivados de aminoácidos não são distribuídos de maneira uniforme no reino vegetal e são mais específicos para alguns gêneros e espécies de plantas. Formam um grupo heterogêneo de compostos naturais que normalmente, apresentam uma estrutura complexa. São constituídos por carbono, hidrogênio e nitrogênio no qual à maioria dos casos, forma parte de um anel heterocíclico, sendo a maioria deles oxigenados. Muitos autores só consideram como verdadeiros alcalóides os compostos com nitrogênio em anéis heterocíclicos e como protoalcalóides os que o possuem numa cadeia lateral acíclica. A sua origem biogenética é normalmente a partir de aminoácidos mas há vários alcalóides que derivam de terpenos e esteróis. São providos de uma grande atividade farmacológica ou toxicológica (FUMAGALI et al., 2008; CABRAL e PITA, 2015).

P. hispidum tem sido vastamente pesquisada em relação aos seus constituintes químicos, os quais podem ser de grande interesse para a medicina e agricultura, o que tem incentivado pesquisas químicas e farmacológicas. Em termos de constituintes químicos, *P. hispidum* contém amidas, benzenos, acidos benzóicos, flavonoides, e óleos essenciais, os

quais têm significativas atividades antifúngica, antimicrobiana, antiplasmodial, leishmanicida e inseticida (MICHEL et al., 2010; SILVA et al., 2014).

Entre os constituintes fixos isolados de *P. hispidum* destacam-se as amidas do tipo isobutílicas, pirrolidínicas, dihidropiridonas, piperidinas, derivados prenilados do acido benzóico, derivados do ácido cinâmico e flavonóides (NASCIMENTO et al. 2012).

3.4 Utilização de *P. hispidum* na medicina popular

A espécie é usada nas farmacopéias tradicionais da América do Sul para muitos propósitos. Suas características adstrigente, diurética, anti-hemorrágica e estimulante do fígado também tem sido descritas. As folhas são utilizadas sob a forma de banhos contra hemorróidas, reumatismos e desinterias; quando frescas são usadas como emplastros em hernia de umbigo de crianças; tendo o mesmo uso no estado seco e reduzido a pó, sendo ainda consideradas hemostáticas (ORLANDELLI et al., 2012).

No Peru, suas folhas são tradicionalmente usadas pelos chayahuitas, um grupo étnico peruano amazônico, como cataplasmas para curar feridas e tratar os sintomas da leishmaniose cutânea, e regular a menstruação (ORLANDELLI et al., 2012). Na Guatemala, é conhecido como “puchuq” e usado pelo povo Q'eqchi como um chá para tratar dismenorréia, amenorréia e dores no corpo. Na Nicarágua, é conhecido como “cordoncillo” também usado para aliviar dores (MICHEL et al., 2010). Na Colômbia, um decocto de folhas é usado para tratar a malária (MORTON, 1981). Na Jamaica é utilizado para dores de estômago e como repelente de insetos (SCOTT et al., 2008).

Na Amazônia brasileira, *P. hispidum* é conhecido pelos nomes vernaculares de “matico” e “aperta-joão”, utilizado para aliviar dores no peito e como agente anti-inflamatório, com inúmeras aplicações na medicina. É mencionado no tratamento de asma, bronquite, febre, dores no abdômen, hemorroidas, como estimulante e inseticida (CUNHA, 2014).

3.5 Propagação

3.5.1 Propagação sexuada

A propagação sexuada, por sementes, é o principal método pelo qual as plantas se reproduzem na natureza, e também um dos mais eficientes, sendo amplamente utilizado na propagação de plantas cultivadas (HARTMANN et al., 2002).

No entanto, a propagação tradicional de espécies de *Piper* por meio de sementes não tem se mostrado eficientes, devido a baixa viabilidade de sementes, à sua recalcitrância, associadas a baixos níveis de germinação, evidenciando a necessidade de métodos alternativos de propagação.

3.5.2 Propagação assexuada por estaquia

A propagação vegetativa é considerada ideal na rápida multiplicação de uma espécie sob ameaça ao tentar manter certas características desejadas, através da separação de partes vegetativas de uma planta. Assim, a partir de um simples exemplar pode-se produzir outra planta geneticamente idêntica ao progenitor, ou seja, um clone, assim como muitos porta-enchertos utilizados na propagação de fruteiras. Em muitas espécies de importância econômica, os plantios são feitos utilizando-se de clones, obtidos por propagação vegetativa (TOOGOOD, 2007; AMRI et al., 2010).

Umas das alternativas para viabilizar plantios uniformes é a propagação assexuada por meio da estaquia, pois esta é muito vantajosa, permitindo em um curto espaço de tempo maximizar a produção de mudas, possibilitando também que apenas uma única planta-matriz possa gerar vários clones, apresentando baixo custo, fácil execução e uniformidade nos plantios, viabilizando uma seleção mais eficiente, quando comparada com a reprodução sexuada (CUNHA et al., 2015).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos sobre a propagação vegetativa por estaquia em razão da necessidade de mudas em viveiros comerciais. É um método de propagação vegetativa que possui a vantagem de garantir a seleção de genótipos superiores, além da maior produção de mudas em menor espaço de tempo. As desvantagens da estaquia incluem a dificuldade de se induzir a produção de raízes adventícias em muitas espécies, bem como a diminuição da capacidade de enraizamento, como a ontogenia da planta (e.g., Eucalyptus spp.), o que torna difícil a produção de raízes em estacas maduras. Sob este aspecto, o

tratamento das estacas com auxinas, principalmente ácido indolbutírico (AIB) é prática bastante difundida (NEVES et al., 2006).

A estaquia baseia-se no princípio de que é possível regenerar uma planta, a partir de uma porção de ramo (regeneração de raízes), ou de uma porção de raiz (regeneração de ramos). Assim, a partir de um segmento, é possível formar-se uma nova planta. A propagação por estacas praticamente não apresenta inconvenientes. Entretanto, nem sempre é viável, especialmente quando a espécie apresenta baixo potencial genético de enraizamento, resultando em pequena percentagem de mudas obtidas. Por sua vez, mesmo que haja formação de raízes, seu desenvolvimento pode ser insuficiente e o percentual de mudas que sobrevivem após o plantio, no viveiro, pode ser muito baixo (FACHINELLO et al., 2005).

No gênero *Piper*, as plantas são convencionalmente propagadas através de estacas de caule, mas este método tradicional não pode ser eficaz para multiplicar a planta proporcionalmente à demanda crescente. Além disso, a propagação vegetativa de espécies de *Piper* por meio de estacas é dificultada devido à escassez ou atraso no enraizamento, evidenciando a necessidade de métodos alternativos de propagação para espécies de *Piper*. (BASAK, 2014; PADHAN, 2015).

3.5.3 Propagação assexuada *in vitro*

Os estudos sobre enraizamento adventício tiveram grandes avanços a partir do ano de 1928, com a identificação do primeiro fitohormônio de ocorrência natural: a auxina ácido indolacético (AIA). Posteriormente, em 1935, auxinas sintéticas análogas ao AIA, como os ácidos indolbutírico (AIB) e naftaleno acético (ANA) foram preconizados como fitorreguladores de enraizamento. Entre os principais fatores relacionados ao enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*, encontram-se os níveis de auxina endógena, as condições inerentes à planta matriz como juvenilidade e genótipo, o meio de cultura, a presença de reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição mineral, a presença de poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos e as condições ambientais de crescimento das plântulas *in vitro* (SOUZA et al., 2007).

As técnicas de cultura de tecidos são amplamente utilizadas para produzir biomassa mais saudável de uma única planta em um curto espaço de tempo e fornecem oportunidades para conservação de germoplasma e regeneração de plantas de tecidos somáticos, ultrapassando a barreira sexual. Podem resultar em genótipos geneticamente estáveis e úteis,

desempenhando um papel importante na propagação clonal, e no melhoramento de plantas das espécies de *Piper* (BHAT et al., 1995; AHMAD et al., 2014).

Zhang (2008), destaca que a grande dificuldade na propagação *in vitro* de *Piper* é a alta ocorrência de contaminação por bactérias e infecções fúngicas, que resultam em grande perda de brotações e, portanto, uma taxa de propagação muito lenta. A contaminação fúngica e bacteriana dos explantes é peculiar a este gênero e, para superar esse problema, a esterilização superfícial dos explantes é feita usando cloreto de mercúrio, cujos efeitos tóxicos em humanos, animais e meio ambiente são bem conhecidos (RAO e SHARMA, 2001).

3.6 Ácido indolbutírico

O crescimento e o desenvolvimento de um vegetal não são possíveis, sem que haja uma comunicação eficiente entre as células, tecidos e órgãos, sendo que a regulação e a coordenação do metabolismo, crescimento e morfogênese dependem da atuação de substâncias químicas chamadas hormônios (RAVEN et al., 1996).

A auxina foi o primeiro hormônio vegetal descoberto, e os primeiros estudos fisiológicos acerca do mecanismo de expansão celular vegetal foram focalizados na ação desse hormônio. De modo geral, para as auxinas naturais emprega-se o termo horônio ou fitormônio e as auxinas sintéticas são denominadas de reguladores de crescimento vegetal (MERCIER, 2008; BARBOSA, 2009).

Dentre as auxinas que apresentam maior efeito no enraizamento, destacam-se o AIB, ANA e AIA, empregadas de diferentes formas e quantidades em estacas caulinares, principalmente por meio de imersão em solução concentrada, ou imersão em pó, cujo concentrado é misturado com talco inerte. As auxinas estimulam as células do periciclo a se dividirem, formando o primórdio radicular, crescendo a raiz lateral através do córtex e da epiderme da raiz, podendo ser utilizadas isoladamente ou em combinação (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O AIB é a auxina sintética mais comumente utilizada na indução do enraizamento adventício e tem sido utilizada em numerosas espécies vegetais tanto por possuir propriedade de promover a formação de primórdios radiculares, como por se tratar de uma substância fotoestável, de ação localizada e menos sensível à degradação biológica em comparação com as demais auxinas sintéticas (PARAJARA, 2015).

O AIB é um composto usado rotineiramente na horticultura para promover o enraizamento de estacas; no peroxissomo, ele é rapidamente convertido em AIA por

oxidação. Tanto livre quanto conjugado, o AIB ocorre naturalmente nas plantas e serve como fonte de auxina para processos específicos do desenvolvimento. Em algumas espécies, tem sido demonstrado também que a auxina se conjuga a peptídeos, glicanos complexos (unidades múltiplas de açúcares) ou glicoproteínas, mas ainda não se conhece o papel fisiológico exato desses conjugados (TAIZ et al., 2017).

Os órgãos em crescimento ativo apresentam maiores concentrações de auxinas (AIB) e tipos de estacas diferentes do ponto de vista fisiológico (idade) apresentam taxas de enraizamento variáveis. A quantidade de auxina necessária para induzir o enraizamento em geral menor em estacas mais jovens (NEVES et al., 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no período de setembro a dezembro de 2017, na Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), em Porto Velho, estado de Rondônia, Brasil. As folhas foram coletadas de plantas de dois anos de idade de *P. hispidum* cultivadas em casa de vegetação (50% de sombra).

Foi designado três tamanhos foliares (Figura 4): pequenas 4-7 cm de comprimento; médias 7-10 cm; e grandes 10-13 cm. As folhas foram cortadas em metades (apical e basal) por corte transversal no meio da lâmina foliar (Figura 5). As partes cortadas das metades foram imersas em uma solução do hormônio AIB a 1.000 ppm por 5 e 20 minutos ou imersas em água, como controle experimental.

Figura 4. Tamanho das folhas: pequena, média e grande.

Figura 5. Posições das porções foliares: apical, basal e basal invertida.

As porções foliares foram colocadas individualmente em ângulo de 45 graus em copos plásticos (400 ml) (Figura 6) contendo uma mistura de areia e solo (1:1), de acordo com o método descrito por Basak et al. (2014). Foram utilizadas três posições das metades da folha: metade apical com a secção transversal para baixo, metade peciolar (basal) com a secção transversal para cima (isto é, pecíolos no interior do substrato) e metade peciolar com a secção transversal para baixo (i.e. pecíolo para cima).

As características fisico-químicas do substrato foram: 520 mg dm^{-3} de P, 0,27 $cmol_c$ dm^{-3} de K, 1,73 $cmol_c$ dm^{-3} de Ca, 0,94 $cmol_c$ dm^{-3} de Mg, 0,0 mg dm^{-3} de Cu, 84,50 mg dm^{-3} de Fe, 23,47 mg dm^{-3} de Mn, 18,37 mg dm^{-3} de Zn, 6,1 $cmol_c$ dm^{-3} de H+Al, 0,0 $cmol_c$ dm^{-3} de Al, 9,05 $cmol_c$ dm^{-3} de CTC; 11,0% de argila, 17,2% de areia fina, 61,7% de areia grossa e 10,2% de silte.

Figura 6. Copo com porções apical, basal e basal invertida em substrato com areia e solo (1:1).

Foram utilizadas 243 porções foliares, sendo três porções em cada copo (81 copos), em esquema fatorial – 3 tamanhos foliares x 3 tipos de porções foliares (daqui em diante referidas como estacas foliares) x 3 tempos de imersão em AIB x 3 blocos x 3 repetições.

Figura 7. Aspecto do experimento de propagação de *P. hispidum* por meio de estacas foliares.

Após 82 dias avaliou-se o número e comprimento das raízes e brotações formadas nas estacas foliares, peso fresco e seco da parte aérea e radicular, e porcentagem de sobrevivência das estacas. As análises de variância e o teste de Tukey ($P < 0,05$) foram realizados utilizando o programa estatístico Assistat 7.5.

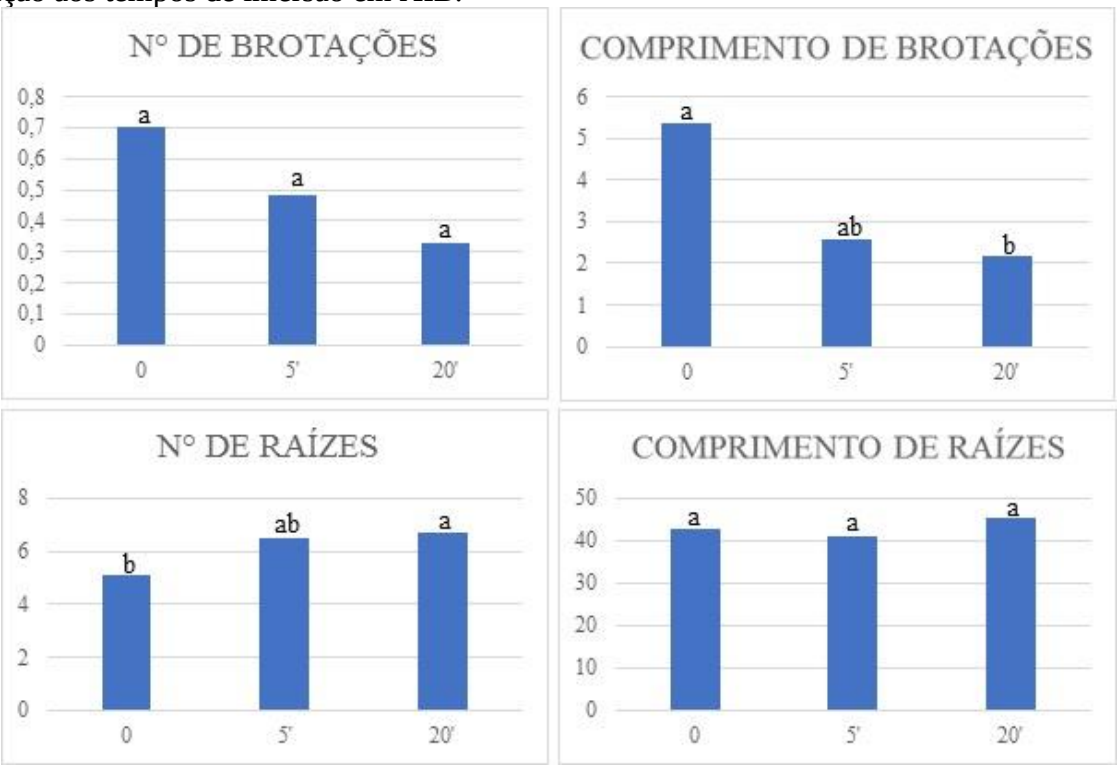
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação significativa entres os fatores tamanhos das folhas, porções foliares e períodos de imersão em AIB (Apêndice). Assim, os referidos fatores foram avaliados individualmente.

5.1 Efeito da imersão em AIB

Na figura 8 estão sumarizados os valores médios de número e comprimento de brotações e raízes de *P. hispidum* em relação aos períodos de imersão em AIB. A imersão em AIB não afetou o número de brotações nas estacas, nem tampouco o comprimento das raízes. A imersão no hormônio estimulou a produção de raízes pelas estacas. No entanto, o comprimento das brotações foi inversamente proporcional ao tempo de imersão em AIB, sendo maior quando não houve imersão no hormônio.

Figura 8. Valores médios de número e comprimento de brotações e raízes de *P. hispidum* em relação aos tempos de imersão em AIB.



*Letras indicam significância na comparação entre os tratamentos (teste de Tukey, 5%).

Um padrão observado na pesquisa atual é que a exposição à auxina resultou em menor desenvolvimento das brotações. O número de raízes foi maior quando as estacas foram

imersas em solução de AIB, mas esse tratamento hormonal teve efeito negativo em relação ao comprimento da parte aérea. Como afirma Mercier (2008), o enraizamento de folhas ou estacas ocorre devido ao acúmulo de auxina na porção imediatamente acima do corte, uma vez que o transporte polar de auxina é interrompido nessa região e, para potencializar esse efeito, a superfície do corte pode ser tratada com uma solução de auxina.

Na indução, a auxina atua como sinal para o início da divisão celular e formação do novo meristema. Durante o crescimento, o ápice e as folhas das plantas produzem o hormônio, que é transportado para todos os tecidos em crescimento, o que pode explicar a presença de raízes em estacas não tratadas com hormônio no presente estudo. Além disso, o antagonismo entre citocininas e auxinas, e consequentemente a inibição de gemas laterais pelas auxinas (GEORGE et al., 2008) pode ser uma explicação para o fato de que a exposição ao AIB teve efeito negativo sobre a formação de brotações nas estacas foliares.

Durante o desenvolvimento normal das plantas, as células específicas do periciclo da raiz primária são pré-determinadas pelos impulsos de auxina no meristema radicular para começar a se dividir ativamente e formar os primórdios das raízes laterais. A auxina aplicada externamente aumenta essa ativação e resulta na formação de mais primórdios. No início da formação das raízes adventícias (Figura 9), no entanto, não existem tais células pré-determinadas presentes. A formação de raízes adventícias requer, portanto, a desdiferenciação celular a fim de adquirir a competência para proliferar e regenerar órgãos (VERSTRAETEN et al., 2013).

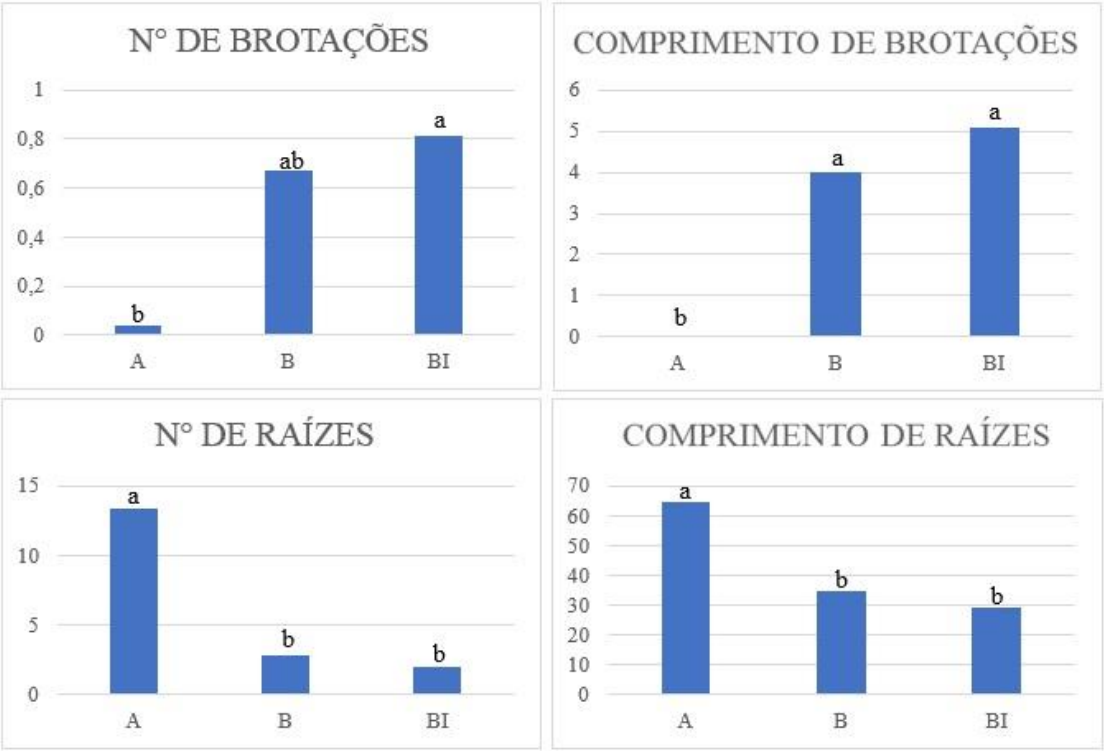
Figura 9. Crescimento de raízes adventícias em estacas apical e basal.

5.2 Efeito das porções foliares

Na figura 10 estão sumarizados os valores médios de número e comprimento de brotações e raízes de *P. hispidum* em relação às porções foliares. O número e o comprimento

das raízes produzidas também foram contrários ao número e comprimento de brotações. Estacas apicais deram origem a um grande número de raízes, mas praticamente falharam na produção de brotos. Estacas basais e basais invertidas deram origem a um menor número de raízes, mas resultaram em brotações em maior número e maiores.

Figura 10. Valores médios de número e comprimento de brotações e raízes de *P. hispidum* em relação às porções foliares.



*Letras indicam significância na comparação entre os tratamentos (teste de Tukey, 5%).

É provável que o grande número de raízes produzidas nas estacas apicais seja devido ao grande número de nervuras expostas após o corte transversal, cada uma delas funcionando como uma microestaca. Por outro lado, as estacas basais e basais invertidas produziram um número relativamente baixo de raízes, mas originaram brotações mais numerosas e mais longas. A fim de propagar as espécies usando esta técnica, recomenda-se usar estacas basais ou basais invertidas.

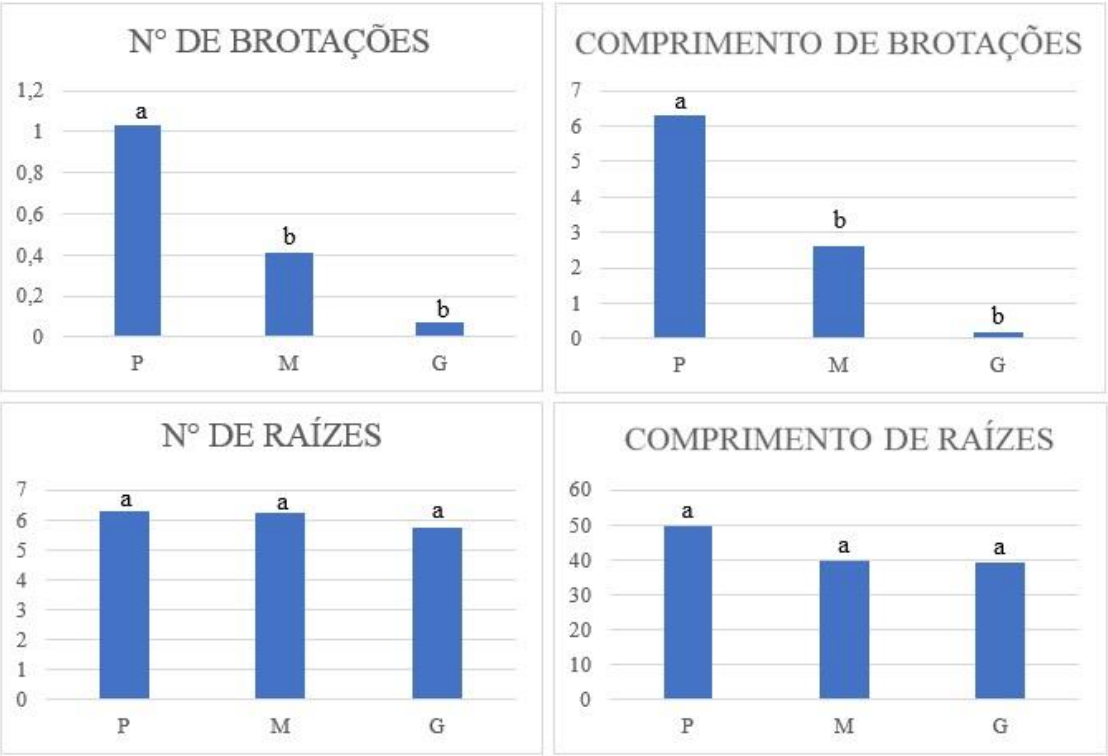
É interessante observar que ainda não se sabe qual é o tecido que dá origem às raízes adventícias em estacas, mesmo em estacas de caule, amplamente utilizadas na horticultura. Como afirma Haissig (1986), a maior parte das informações sobre o metabolismo durante o enraizamento descreve a zona de enraizamento, mas não a localização precisa da iniciação de primórdios. Atualmente, os testes histoquímicos oferecem a única esperança de descrever a diferenciação bioquímica entre as iniciais do primórdio da raiz e suas células progenitoras.

Segundo Verstraeten et al. (2013), as raízes adventícias são definidas como raízes que se desenvolvem em tecidos não radiculares, como folhas, hipocótilos, caules e brotos. Este processo é distinto de outros processos de organogênese, pois envolve a iniciação de novo de um meristema e é bastante raro na ausência de intervenção humana, mas é uma manipulação industrial comumente utilizada para reproduzir cultivares elite. Esses autores realizaram um experimento utilizando indução radicular adventícia em *Arabidopsis thaliana* como modelo para a organogênese radicular e observaram que as raízes adventícias emergiram de células localizadas no centro da estrutura da haste, e secções histológicas apontaram para células do cambio/floema que começam a se dividir com a aplicação de auxina.

5.3 Efeito do tamanho das folhas

Na figura 11 estão sumarizados os valores médios de número e comprimento de brotações e raízes de *P. hispidum* em relação aos diferentes tamanhos de folhas. As folhas pequenas não diferiram das médias e grandes em relação ao número e comprimento de raízes. Porém, induziram brotações mais numerosas e longas do que as folhas médias e grandes.

Figura 11. Valores médios de número e comprimento de brotações e raízes de *P. hispidum* em relação aos tamanhos da folhas.



*Letras indicam significância na comparação entre os tratamentos (teste de Tukey, 5%).

É possível que as folhas jovens, e consequentemente as folhas pequenas, tenham mais plasticidade que as folhas maiores e mais velhas, o que poderia explicar sua maior capacidade de regenerar plantas, como observado neste estudo.

Verstraeten et al. (2013) observam que uma planta precisa manter um certo nível de plasticidade para poder se envolver na formação de novas estruturas e órgãos. Através desta plasticidade, uma planta tem a capacidade de tolerar condições ambientais variáveis através de adaptações morfológicas. Os autores mencionam como exemplo de plasticidade a iniciação de raízes em estacas de caule.

Na Figura 12 e 13 é possível observar uma planta inteira produzida a partir de uma estaca foliar basal.

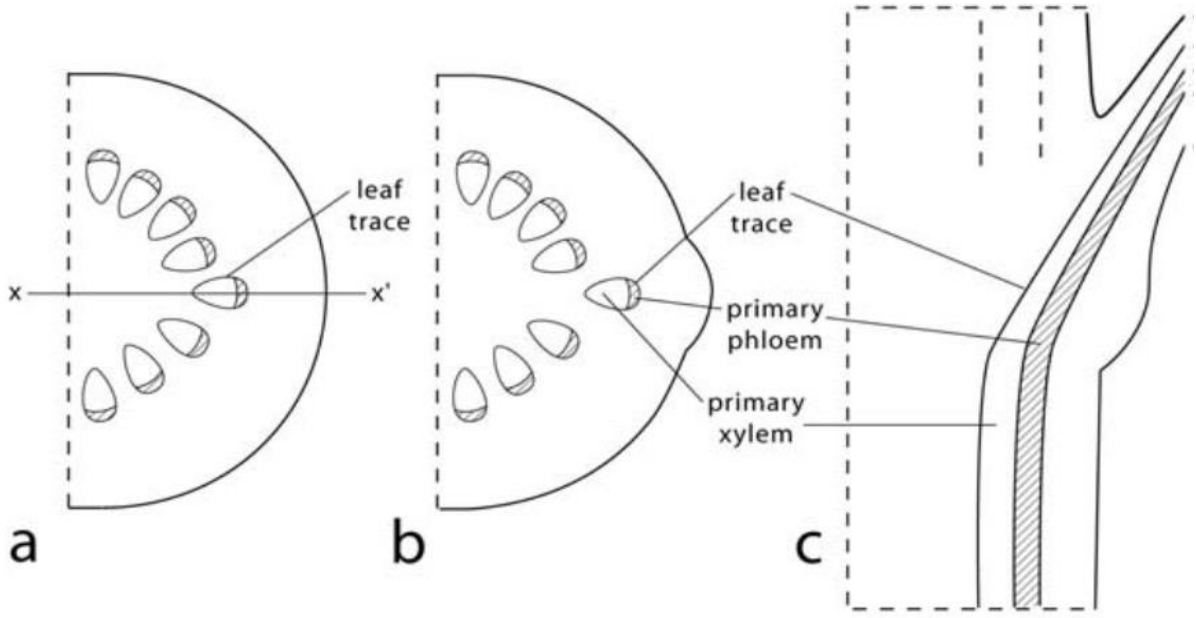
Figura 12. Planta com 130 dias produzida a partir de uma estaca foliar basal (seta) de *P. hispidum*.

Figura 13. Planta regenerada a partir de uma estaca foliar basal, após 210 dias de cultivo.

Neste estudo, evidenciou-se a possibilidade da folha funcionar como uma estaca de caule. Isto é possível porque a folha possui todas as estruturas presentes no caule, incluindo aquelas meristemáticas, como procâmbio e câmbio, que dão origem ao xilema e ao floema primários e secundários, respectivamente. Segundo Raven et al. (2007), o padrão formado

pelos feixes vasculares reflete a estreita relação estrutural e de desenvolvimento entre o caule e as folhas (Figura 14). À medida que o primórdio da folha cresce em comprimento, os feixes procambiais também se diferenciam em direção a ele. Desde o início, o sistema procâmbio da folha é contínuo com o do caule. Em cada nódulo, um ou mais feixes vasculares divergem do cilindro dos feixes do caule, atravessam o córtex e entram na folha. Assim, o mesofilo da folha é completamente coberto por um sistema de nervuras ou feixes vasculares, que é contínuo com o sistema vascular do caule. A nervura mediana e, às vezes, as nervuras de maior calibre mostram crescimento secundário em algumas folhas de dicotiledôneas.

Figura 14. Corte transversal da folha por Beck (2010)



Basak et al. (2014) também utilizaram estacas foliares (porções apicais e basais) para propagar *P. longum*, com ou sem imersão por 30 segundos em AIB (1000 ppm), ANA (1000 ppm) ou uma combinação dos dois hormônios AIB (1000 ppm) + ANA (1000 ppm). Os autores observaram que as estacas basais tratadas com AIB (1000 ppm) + ANA (1000 ppm) resultaram no maior número de raízes e brotações, porcentagens de enraizamento e brotações, comprimento de raiz e sobrevivência das estacas. Esses autores mencionam que esse método pode ser adotado com capital mínimo para produzir material de plantio de qualidade. Além disso, as folhas podem ser obtidas com muito pouco dano à planta.

6 CONCLUSÃO

As estacas de folhas podem ser um método prático para propagar *P. hispidum* vegetativamente.

Não se recomenda a imersão em auxina (ácido indolbutírico), pois embora sua utilização tenha induzido enraizamento, foi negativa em relação à indução de brotações, reduzindo a capacidade regenerativa das porções foliares submetidas ao hormônio.

Quanto às porções foliares, devem ser utilizadas estacas basais e basais invertidas, cujo capacidade regenerativa é maior do que aquela observada em estacas apicais.

Em relação ao tamanho, devem ser utilizadas folhas pequenas (4-7 cm), devido à sua maior plasticidade e consequentemente maior capacidade regenerativa.

REFERÊNCIAS

AHMAD, N.; ABBASI, B. H.; FAZAL, H.; KHAN, M. A.; AFRIDI, M. S. Effect of reverse photoperiod on *in vitro* regeneration and Piperine production in *Piper nigrum* L. **Comptes Rendus Biologies**, v. 337, n. 1, p. 19-28, 2014.

AHMAD, N.; GUO, B.; FAZAL, H.; ABBASI, B. H.; LIU, C-Z.; MAHMOOD, T.; SHINWARI, Z. K. Feasible plant regeneration in black pepper from petiole explants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 18, p. 4590-4595, 2011.

AMRI, E.; LYARUU, H. V. M.; NYOMORA, A. S.; KANYEKA, Z. L.**Vegetative propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. & Perr.): effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings**. New Forests, v. 39, n. 2, p. 183-194, 2010.

BARBOSA, M. C. **Atuação de ácido'beta'-naftoxiacético, ácido indolbutírico e ácido giberélico na morfogênese de microplantas de abacaxizeiro "Gomo-de-Mel"**. 2009. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2009.

BASAK, U. C.; DASH, D. JENA, G. J. P.; MAHAPATRA, A. K. New technique for adventitious rooting and clonal propagation of *Piper longum* L.(Pippali) through leaf cuttings. **African Journal of Plant Science**, v. 8, n. 2, p. 108-112, 2014.

BECK, C. B. The origin of secondary tissue systems and the effect of their formation on the primary body in seed plants. In: ___. **An Introduction to Plant Structure and Development.** 2ª ed. Cambridge: Cambridge University Press, p. 157-165, 2010.

BHAT, S. R.; CHANDEL, K. P. S.; MALIK, S. K. Plant regeneration from various expiants of cultivated *Piper* species. **Plant Cell Reports**, v. 14, n. 6, p. 398-402, 1995.

BRAGA, A. G. S. **Avaliação *in vitro* da atividade de pesticida de *Piper tuberculatum* Jacq. (Piperaceae) para o controle das infestações de *Rhipicephalus microplus* (Ixodideae) e *Haematobia irritans* (Muscidae)**. 2017. 107f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho/RO, 2017.

CABRAL, C.; PITA, J. R. Alcalóides – Relevância na Farmácia e no Medicamento. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 10, p. 1368-1371, 2015.

CHAKRABORTY, D.; SHAH, B. Antimicrobial, antioxidative and antihemolytic activity of *Piper betel* leaf extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 192-199, 2011.

CHAN, E. W. C.; WONG, S. K.. Phytochemistry and pharmacology of three *Piper* species: an update. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 1, n. 9, p. 534-544, 2014.

CHAVEERACH, A.; SUDMOON, R.; TANEE, T.; MOKKAMUL, P. The species diversity of the genus *Piper* from Thailand. **Acta Phytotaxonomica et Geobotanica**, v. 59, n. 2, p. 105-163, 2008.

CHRIST, J. A. **Diversidade morfológica e molecular em *Piper* (Piperaceae) em um fragmento de Floresta Atlântica**. 2016. 101f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre/ES, 2016.

CUNHA, A. L. B. **Propagação vegetativa de *Piper hispidum* Sw. e *Piper tuberculatum* Jacq. em função de diferentes substratos e tipos de estacas**. 2014. 83f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical), Universidade Federal do Amazonas, Manaus/AM, 2014.

CUNHA, A. L. B.; CHAVES, F. C. M.; BATISTA, A. C.; HIDALGO, A. F. Propagação vegetativa de estacas de *Piper hispidum* Sw. em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.17, n.4, p.685-692, 2015.

CURSINO, L. M. C.; MESQUITA, A. S. S.; MESQUITA, D. W. O.; FERNANDES, C. C.; PEREIRA JR, O. L.; AMARAL, I. L.; NUNEZ, C. V. Triterpenos das folhas de Minquartia guianensis Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 181-185, 2009.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteou reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8139-8144, 2010.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. Propagação vegetativa por estaquia. In: ___. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 69-109, 2005.

FACUNDO, V. A.; POLLI, A. R.; RODRIGUES, R. V.; MILITÃO, J. S. L. T.; STABELLI, R. G.; CARDOSO, C. T. Constituintes químicos fixos e voláteis dos talos e frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. e das raízes de *P. hispidum* HB K. **Acta Amazonica**, v. 38, p. 733-742, 2008.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros Tabernaemontana e Aspidosperma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

FREIRE, T. C. **Extrato vegetal de *Piper* com potencial atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii***. 2015. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade Federal de Rondônia, Rolim de Moura/RO, 2015.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant tissue culture procedure-background. In: **Plant propagation by tissue culture**. Springer, p. 1-28, 2008.

HAISSIG, B. E. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. In: **New root formation in plants and cuttings**. Martinus Nijhoff Publishers, p. 141-189, 1986.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. Principles of propagation by cuttings. In:___. **Plant propagation, principles and practices.** Pearson, p. 278-291, 2002.

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

MENG, F.; CAO, R.; YANG, D.; NIKLAS, K. J.; SUN, S. Trade-offs between light interception and leaf water shedding: a comparison of shade-and sun-adapted species in a subtropical rainforest. **Oecologia**, v. 174, n. 1, p. 13-22, 2014.

MERCIER, H. Auxinas. In:___ KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 182-211, 2008.

MICHEL, J. L.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; HUANG, Y.; KRUNIC, A.; ORJALA, J.; VELIZ, M.; SONI, K. K.; SOEJARTO, D. D.; CACERES, A.; PEREZ, A.; MAHADY, G. B. Estrogenic and serotonergic butenolides from the leaves of *Piper hispidum* Swingle (Piperaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 2, p. 220-226, 2010.

MORTON, J.F. **Atlas of medicinal plants of Middle America**: Bahamas to Yucatan. Charles C. Thomas Publisher, p.389-390, 1981.

NASCIMENTO, J. C.; PAULA, V. F.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Occurrence, biological activities and 13C NMR data of amides from *Piper* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2288-2311, 2012.

NEVES, T. S.; CARPANEZZI, A. A.; RIBAS, K. C. Z.; MARENCO, R. A. Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1699-1705, 2006.

ORLANDELLI, R. C.; ALBERTO, R. N.; ALMEIDA, T. T.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos produzidos por fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* Sw. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 10, p. 137-141, 2012.

ORLANDELLI, R. C.; ALBERTO, R. N.; RUBIN FILHO, C. J.; PAMPHILE, J. A. Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. **Genetic Molecular Research**, v. 11, n. 2, p. 1575-1585, 2012.

PADHAN, B. Regeneration of plantlets of *Piper longum* L. through *in vitro* culture from nodal segments. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 05, p. 35-39, 2015.

PARAJARA, F. C. **Propagação vegetativa e desenvolvimento de mudas de espécies nativas por estaquia de ramos herbáceos**. 2015. 71f. Dissertação (Mestrado em Biodivercidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo/SP, 2015.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

RAHMAN, S. F. S. A.; SIJAM, K.; OMAR, D. *Piper sarmentosum* Roxb.: A Mini Review of Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacology. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 5, p. 1-3, 2016.

RAO, M. V.; SHARMA, P. S. N. Protective effect of vitamin E against mercuric chloride reproductive toxicity in male mice. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 6, p. 705-712, 2001.

RAVEN, P.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 5, p. 1-728, 1996.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. O sistema caulinar: estrutura primária e desenvolvimento. In: ___. **Biologia Vegetal**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 454-483, 2007.

SANTANA, H. T. **Estudo fitoquímico de *Piper alatabaccum* Trel & Yunck, 1950 e avaliação da atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* Linnaus, 1762 (Diptera: Culicidae) em condições de campo simulado**. 2012. 91f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho/RO, 2012.

SCHWERTNER, A.B.S.; NAGAO, E. O.; HIDALGO, A. F.; ZAFFARI, G, R. Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácido indolacético (AIA) na propagação *in vitro* da caapeba [*Pothomorphe peltata* (L.) Miq.]. **Revista Brasileira Plantas Medicinais,** v.10, n.1, p.76-81, 2008.

SCOTT, I. M.; JESEN, H. R.; PHILOGÈNE, B. J. R.; ARNASON, J. T. A review of *Piper* spp. (Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 1, p. 65, 2008.

SILVA, R. J. F.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; MENDONÇA, M. S. Rosetas e concrescências cristalinas silicificadas em *Piper* (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 435-446, 2014.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v, 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 4, p. 103-116, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª ed. Artmed Editora, p. 449-484, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6ª ed. Artmed Editora, p. 407-446, 2017.

TOOGOOD, A. **Enciclopedia de la propagacion de plantas**. Blume, p. 1-320, 2007.

VERSTRAETEN, I.; BEECKMAN, T.; GEELEN, D. Adventitious root induction in *Arabidopsis thaliana* as a model for *in vitro* root organogenesis. In:___ **Plant Organogenesis**. Humana Press, p. 159-175, 2013.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil I: *Piper* - Group I, II, III, IV. **Hoehnea** , v. 2, p. 21-366, 1972.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil II: *Piper* - Group V; *Ottonia*; *Pothomorphe*; *Sarcorhachis*. **Hoehnea**, v. 3, p. 29-28, 1973.

YUNCKER, T. G. The Piperaceae of Brazil III – Peperomia; Taxa of uncertain status. **Hoehnea** , v. 4, p. 71-413, 1974.

ZHANG, Y.; LIU, T.; MEYER, C. A.; EECKHOUTE, J.; JOHNSON, D. S.; BERNSTEIN, B.; NUSBAUM, C.; MYERS, R, M.; BROWN, M.; LI, W.; LIU, S. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). **Genome Biology**, v. 9, n. 9, p. 137, 2008.

APÊNDICE

Análises de variância do número e comprimento de brotações e raízes de *P.hispidum* em relação ao tamanho da folha, porção foliar e tempos de imersão em AIB e suas interações.

Número de brotações				
FV	**GL**	**SQ**	**QM**	**F**
Tamanho	2	12,92	6,46	10,14 **
Porção	2	9,21	4,61	7,24 **
Imersão	2	1,88	0,94	1,48 ns
Interação TxP	4	5,45	1,36	2,14 ns
Interação TxI	4	1,89	0,47	0,74 ns
Interação PxI	4	2,93	0,73	1,15 ns
Interação TxPxI	8	5,63	0,70	1,10 ns
(Tratamentos)	(26)	(36,91)		
Blocos	2	0,77		
Resíduo	26	16,57	0,637	
Total	80	54,25		
Comprimento das brotações				
FV	**GL**	**SQ**	**QM**	**F**
Tamanho	2	523,851	261,925	14,622 **
Porção	2	315,176	157,588	8,797 **
Imersão	2	85,11	42,555	2,375 ns
Interação TxP	4	315,307	78,826	4,4 ns
Interação TxI	4	58,215	14,553	0,812 ns
Interação PxI	4	160,548	40,137	2,24 ns
Interação TxPxI	8	63,016	7,877	0,439 ns
(Tratamentos)	(26)	1521,223		
Blocos	2	27,241		
Resíduo	26	465,759	17,913	
Total	80	2014,223		
Numero de raízes				
FV	**GL**	**SQ**	**QM**	**F**
Tamanho	2	5,21	2,605	0,39 ns
Porção	2	2172,32	1086,16	166,33 **
Imersão	2	42.98	21,49	3,29 ns
Interação TxP	4	39,34	9,83	1,5 ns
Interação TxI	4	16,79	4,19	0,64 ns
Interação PxI	4	22,13	5,53	0,84 ns
Interação TxPxI	8	24.44	3,055	0,46 ns
(Tratamentos)	(26)	(2323,21)		
Blocos	2	32,11		
Resíduo	26	169,89	6,53	
Total	80	2515,21		
Comprimento das raízes				
FV	**GL**	**SQ**	**QM**	**F**
Tamanho	2	1836,15	918,07	1,2 ns
Porção	2	19601,37	9800,6	13,33 **
Imersão	2	254,02	127,01	0.71 ns
Interação TxP	4	651,71	162,92	0,22 ns

Interação TxI	4	924,72	231,18	0,31 ns
Interação IxP	4	2888,67	722,16	0,98 ns
Interação TxPxI	8	1681,56	210,19	0,28 ns
(Tratamentos)	(26)	(27838,2)		
Blocos	2	56,39		
Resíduo	26	19102,64	734,71	
Total	80	46997,23		