

TARCYMARA BARATA GARCIA

**ANATOMIA DOS ÓRGÃOS VEGETATIVOS AÉREOS DE TRÊS ESPÉCIES DE
Theobroma L. (MALVACEAE s.l.) COM êNFASE NAS ESTRUTURAS
SECRETORES: ESTRUTURA E HISTOQUÍMICA**

**BELÉM-PA
2012**

TARCYMARA BARATA GARCIA

**ANATOMIA DOS ÓRGÃOS VEGETATIVOS AÉREOS DE TRÊS ESPÉCIES DE
Theobroma L. (MALVACEAE s.l.) COM êNFASE NAS ESTRUTURAS
SECRETORAS: ESTRUTURA E HISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Botânica Tropical, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Andrade de Aguiar-Dias

**BELÉM-PA
2012**

Garcia, Tarcymara Barata

Anatomia dos órgãos vegetativos aéreos de três espécies de *Theobroma* L.(Malvaceae s.l.) com ênfase nas estruturas secretoras: estrutura e histoquímica./
Tarcymara Barata Garcia. – Belém, 2012.

53f.;il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2012.

1. Planta. 2. Anatomia foliar. 3. Malvaceae. 4. Cupuaçu.
5. Planta - estrutura secretora. I. Título.

CDD – 583.685

TARCYMARA BARATA GARCIA

**ANATOMIA DOS ÓRGÃOS VEGETATIVOS AÉREOS DE TRÊS ESPÉCIES DE
Theobroma L. (MALVACEAE s.l.) COM êNFASE NAS ESTRUTURAS
SECRETOoras: ESTRUTURA E HISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia e Museu Paraense Emílio Goeldi, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Botânica Tropical, para obtenção do título de Mestre.

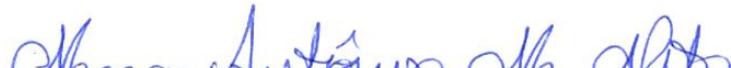
Aprovado em 27 de Fevereiro de 1012.

BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Ana Cristina Andrade de Aguiar Dias - Orientadora
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI


Dra. Andréia Silva Flores – 1º Examinador
INSTITUTO DE AMPARO À CIÊNCIA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO DO ESTADO DE
RORAIMA


Dra. Fernanda Ikiu Borges – 2º Examinador
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL


Prof. Dr. Marco Antônio Menezes Neto – 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Aos meus pais, **Tarcízio e Maria**; a minha irmã **Tarcyane** e ao meu namorado **Wanderson Luis**, por formarem a base sólida da minha vida, por todo incentivo e carinho em todos os momentos.

DEDICO

Dá instrução ao sábio, e ele se fará mais sábio; ensina ao justo, e ele crescerá em entendimento (Pv., 9:9). Porque melhor é a sabedoria do que jóias, e de tudo o que se deseja nada se pode comparar com ela (Pv., 8:11).

AGRADECIMENTOS

Apoio Técnico/Científico:

Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa. Ao coordenador Dr. **João Ubiratan Moreira dos Santos**, corpo docente e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Botânica Tropical.

À CEPLAC pela concessão dos espécimes do presente trabalho, especialmente aos Drs. **Carlos Rogério de Souza Silva** e **Paulo Sérgio Albuquerque**, ao especialista **Romão Satio Kobayashi** e ao técnico laboratorial **Admil de Souza Moura**.

A orientadora que sempre estará presente, Profa. Dra. **Raimunda Potiguara** (*in memoriam*), com quem troquei as minhas primeiras “idéias” no mestrado, por toda sua dedicação e contribuição à pesquisa da anatomia na Amazônia.

A minha atual orientadora Profa. Dra. **Ana Cristina Andrade de Aguiar-Dias**, responsável pelo meu entusiasmo nesse trabalho, a quem admiro e estimo pelo seu esforço e dedicação à pesquisa científica. A cada dia, me surpreendo com sua competência e busca por novos desafios.

Ao Prof. Dr. **Diego Demarco** e à M.Sc. **Tatiani Kikuchi** pela disponibilidade e colaboração nesse trabalho, pelas questões levantadas que sempre me direcionam a uma nova pesquisa bibliográfica.

Ao Dr. **Hilton Túlio** e à M.Sc. **Naiara Abrahim** pelas suas contribuições e ensinamentos nas seções de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Coordenação de Botânica e Laboratório de Anatomia Vegetal:

À Dra. **Ely Simone Gurgel** responsável pelos meus “primeiros passos” na pesquisa científica no Museu Goeldi, pelos muitos conselhos na vida profissional e pessoal. Minha eterna gratidão por sua amizade e carinho.

À Dra. **Alba Lins**, digna de todo respeito e admiração, por sua dedicação à pesquisa e ao Laboratório de Anatomia. Agradeço em nome de todos os alunos do “turno da noite” na Coordenação de Botânica, essas “horas extras” foram valiosas na realização do nosso trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia vegetal: **Suelen Mata, Isabel Nery, Carla Feio, Marleide Chaves, Paulo Marcos, Thália Gama, Joana Filgueira, Cyntia Porfírio, Haiwry Farias, Sueyla Malcher, Genilse Souza, Rose, Breno Serrão e Dayane Pena**, que

tornaram a minha pesquisa uma atividade prazerosa, com suas sugestões e contribuições científicas e “momentos de lazer”.

A todos os amigos da Coordenação de Botânica, especialmente **Júlio Souza e Maria Maricélia Felix**, exemplos de responsabilidade e dedicação profissional.

À Dra. **Flávia Lucas** por seus bons conselhos que me incentivam na vida profissional e pessoal.

Turma de Pós-graduação 2010:

Aos meus amigos da turma da pós-graduação, especialmente aqueles de convivência na Coordenação de Botânica: **Christiane Costa, Eline Garcia, Carolina Santos, Ronan Frodo, Luciana Macedo, Fabiane Silva, Paulo José, Eduardo Silva e Priscilla Prestes**. Deus me deu a experiência única de aprender com vocês, não somente no que se refere às trocas de idéias e conhecimento, mas também, aquilo que se deve fazer para cultivar uma verdadeira amizade, que certamente persistirá com o tempo e a distância. A todos, meus sinceros votos de sucesso profissional e realização pessoal.

A Deus:

Pelos seus ensinamentos, que permitem o meu crescimento espiritual e profissional. Por me abençoar em tudo o que faço, por estar sempre à frente de todas as decisões. Agradeço ao Senhor por me fazer entender que o amor e o respeito são fundamentais em casa ou no trabalho, prevalecendo sobre desavenças e diferenças.

Família e amigos:

À família que tanto amo: **Tarcízio e Maria Garcia** (pais) e **Tarcyane Garcia** (irmã). Que todo amor, carinho e dedicação sejam retribuídos a vocês na forma de realizações pessoais, profissionais e principalmente bônçãos espirituais.

Ao meu namorado **Wanderson Luís**, por estar sempre comigo, me incentivando, me dando os melhores conselhos, amor e carinho; e a sua família, a que tenho muito afeto e admiração.

Aos meus laços familiares, com todo o meu amor e eterna gratidão: tias, tios, primas e primos maternos e paternos; e a minha querida avó **Maria Teles Barata**.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	13
1.1 Referências	16
2. Capítulo 1: Anatomia foliar de três espécies de <i>Theobroma</i> L. (Malvaceae s.l.): fruteiras nativas da Amazônia	18
RESUMO	19
ABSTRACT	19
2.1 Introdução	20
2.2 Material e métodos.....	21
2.3 Resultados.....	22
2.3.1 Pecíolo.....	22
2.3.2 Limbo foliar.....	24
2.4 Discussão.....	29
2.5 Referências	34
3. Capítulo 2: Cavidades e ductos em três espécies de <i>Theobroma</i> L. (Malvaceae s.l.): estrutura e histoquímica	41
RESUMO	42
ABSTRACT	42
3.1 Introdução	43
3.2 Material e métodos.....	44
3.3 Resultados.....	44
3.3.1 Distribuição e estrutura	44
3.3.2 Desenvolvimento e histoquímica	45
3.4 Discussão.....	49
3.5 Referências	51
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 A-H: Pecíolo de *T. grandiflorum*, *T.speciosum* e *T. subincanum*, em secção transversal 22

Figura 2 A-J: Superfície foliar de *T. grandiflorum*, *T. speciosum* e *T. subincanum* 24

Figura 3 A-I: Epiderme do limbo foliar de *T. grandiflorum*, *T. speciosum* e *T. subincanum* 26

Figura 4 A-I: Mesofilo e margem de *T. grandiflorum*, *T. speciosum* e *T. subincanum*, em secção transversal 27

Figura 5 A-I: Nervura central de *T. grandiflorum*, *T. speciosum* e *T. subincanum* 29

Capítulo 2

Figura 1 A-I: Cavidades e ductos mucilaginosos em *T. grandiflorum*, *T.speciosum* e *T. subincanum* 45

Figura 2 A-J: Ductos mucilaginosos nas folhas de *T. grandiflorum*, *T.speciosum* e *T. subincanum* 46

Figura 3 A-F: Cavidades e ductos com conteúdo mucilaginoso em *T. grandiflorum*, *T.speciosum* e *T. subincanum* 47

Figura 4 A-L: Ductos mucilaginosos na nervura central de folhas adultas de *T. grandiflorum*, *T.speciosum* e *T. subincanum* 49

RESUMO

Theobroma (Malvaceae s.l.) é de origem exclusivamente neotropical. O gênero possui 22 espécies, das quais dez são nativas da Amazônia. Dentre as espécies de importância econômica destacam-se *T. cacao* e *T. grandiflorum* (cupuaçu), utilizados nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia, incluindo a produção de chocolate e similares (cupulate). Neste estudo foi realizada a caracterização anatômica do caule e das folhas de três espécies de *Theobroma* (Malvaceae s.l.), enfatizando as estruturas secretoras de mucilagem e contribuindo para o conhecimento biológico das espécies. As espécies apresentaram características anatômicas comuns às Malvaceae s.l., tais como: estrutura vascular do pecíolo, estômatos anomocíticos, cristais de oxalato de cálcio, estruturas secretoras de mucilagem e tricomas estrelados. Pela primeira vez tricomas glandulares e epiderme mucilaginosa foram registrados nas espécies estudadas, sendo a última característica restrita à *T. speciosum*. A densidade dos tricomas estrelados e a presença de idioblastos cristalíferos e fenólicos foram consideradas como mecanismos de proteção contra herbívoros. As características dos tricomas, da nervura central e do mesofilo foram similares entre *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, corroborando a circunscrição das espécies na seção *Glossopetalum*. As estruturas secretoras de mucilagem nas espécies estudadas compreendem cavidades e ductos. As cavidades estão localizadas na região cortical do pecíolo e freqüentemente se fusionam formando cavidades tubulares. Os ductos estão distribuídos no ápice vegetativo, primórdio foliar, caule em desenvolvimento primário e secundário, pecíolo, nervura central e mesofilo. As estruturas secretoras são precocemente formadas no ápice vegetativo, sendo originadas no meristema fundamental, supostamente por processo lisígeno. Testes histoquímicos evidenciaram a presença exclusiva de polissacarídeos ácidos na secreção. A mucilagem representou uma característica conservativa no grupo estudado.

Palavras-chave: cupuaçu, estruturas secretoras, mucilagem, tricomas estrelados, tricomas glandulares.

ABSTRACT

Theobroma (Malvaceae s.l.) is exclusively of neotropical origin. This genus contains 22 species, ten of which are native Amazonian. Among the species of economic importance *T. cacao* and *T. grandiflorum* (cupuassu) stand out due to their utilization in the cosmetic, pharmaceutical and food industries, including fabrication of chocolate and chocolate-like foodstuffs (*cupulate*). In the present work, it was described the stem and leaves anatomy of three *Theobroma* species, emphasizing the mucilage-secreting structures and contributing for biological knowledge of those species. The species have shown anatomical characteristics common to Malvaceae s.l., such as: vascular structure of the petiole, anomocytic stomata, calcium oxalate crystals, mucilage-secreting structures and stellate trichomes. For the first time glandular trichomes were observed in the all species studied whereas mucilaginous epidermis was restricted to *T. speciosum*. Stellate trichomes density and occurrence of crystal and phenolic idioblasts were considered as defense mechanisms against herbivores. Characteristics of trichomes, midrib and mesophyll were similar between *T. grandiflorum* and *T. subincanum*, corroborating the circumscription these species in section *Glossopetalum*. Mucilage-secreting structures observed in the species studied consist of cavities e ducts. The cavities were found in the cortical region of petiole often merged to form tubular cavities. The ducts are distributed in the shoot apices, leaf primordia, stem in primary and early secondary growth, petiole, midrib and mesophyll. The mucilage-secreting structures are precociously produced in the shoot apices, arising from cells of the ground meristem, likely by lysogenesis. The histochemical tests have revealed the presence of acids polysaccharides in the secretion. The mucilage has represented a conservative characteristic in the group studied.

Key-words: cupuassu, glandular trichomes, mucilage, secretory structures, stellate trichomes.

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Malvaceae s.l. está representada por 4.230 espécies, distribuídas em 250 gêneros. Constitui um grupo monofilético e sua atual circunscrição corresponde a quatro famílias tradicionais: *Malvaceae s.s.*, *Bombacaceae*, *Sterculiaceae* e *Tiliaceae* (APG III, 2009).

A família é caracterizada pela presença de tricomas estrelados, folhas com nervação palminérvea, cavidades ou canais mucilaginosos, ácidos graxos ciclopopenóides e inflorescência formada por unidades básicas (unidade bicolor) que consistem de três brácteas, sendo uma estéril e as outras subtendidas cimas laterais ou flores solitárias (Kubitzki & Bayer, 2003). De acordo com este autor, *Malvaceae s.l.* destaca-se pelo uso ornamental (*Dombeya* Cav., *Hibiscus* L. e *Tilia* L.), madeireiro (*Ceiba* Mill. e *Pachira* Aubl.), medicinal (*Guazuma* Plum.), como fornecedora de fibras (*Corchorus* L., *Gossypium* L. e *Urena* L.) e de alimentos (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench., *Cola* Schott. e *Theobroma* L.).

Theobroma (Sterculiaceae senso Cronquist, 1988) possui 22 espécies, com origem neotropical, estendendo-se desde a bacia amazônica ao sul do México. De acordo com as características vegetativas e reprodutivas, como exemplo, tipo de germinação, forma e pubescência das folhas, tipo de pólen e fruto; o gênero está dividido em seis seções: *Andropetalum*, *Glossopetalum*, *Oreanthes*, *Rhytidocarpus*, *Telmatocarpus* e *Theobroma*. Excetuando-se *Andropetalum*, representantes de todas as seções são encontrados no Brasil, ocorrendo dez espécies, todas nativas da Amazônia: *T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. microcarpum*, *T. glaucum*, *T. canumanense*, *T. bicolor* e *T. cacao* (Cuatrecasas, 1964).

Dentre as espécies economicamente importantes do gênero, destacam-se *T. cacao* L. e *T. grandiflorum* (Willd. ex Spreng) Schum. (cupuaçu), cujas sementes constituem a matéria-prima, respectivamente, do chocolate e cupulate, produto similar ao chocolate (Pugliese, 2010). O cupuaçu tem polpa aromática, utilizada na preparação de bebidas, sorvetes, geléias, entre outros produtos, com ampla comercialização na Amazônia, sendo o Pará o principal produtor desta fruta no país (Nogueira & Santana, 2009).

Esta crescente demanda local e internacional vem incentivando novos plantios comerciais de cupuaçu. Entretanto, diversos fatores têm afetado o desenvolvimento desta cultura, destacando-se as doenças como causadoras dos maiores prejuízos econômicos, como exemplo podem ser citadas: morte progressiva (*Lasiodiploidia theobromae* (Pa) Griff &

Maubl), podridão vermelha (*Ganoderma philipii* (Bres. & p. Henn) Bras), mancha de *Phomopsis* (*Phomopsis* sp.) e vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer), todas provocadas por fungos (Gondim *et al.*, 2001).

Os avanços nos conhecimentos científicos e tecnológicos têm promovido estratégias que tendem minimizar a propagação de epidemias na cultura do cacau e do cupuaçu, tais como: indução de resistência (Resende *et al.*, 2007), utilização de cultivares resistentes associadas às podas profiláticas e uso de fungicidas eficientes, entre outras (Alves *et al.*, 2010).

A conservação *ex situ* dos recursos genéticos de *Theobroma* é restrita em razão das suas sementes recalcitrantes, tornando a conservação *in situ*, através de bancos de germoplasma, uma alternativa viável. Nesse sentido, o Pará possui duas coleções *in vivo* de *Theobroma*: “George O'Neill Addison” e “Basil George David Bartley”, a primeira pertencente à CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) e a segunda à Embrapa Amazônia Oriental (Silva *et al.*, 2004).

Estudos anatômicos referentes às espécies de *Theobroma* são restritos às sementes (Santos, 2003; Martini *et al.*, 2003; Martini *et al.*, 2008) e quanto aos órgãos vegetativos, poucos dados são encontrados na literatura científica. Metcalfe & Chalk (1950) descreveram, de modo geral, as características anatômicas da antiga família Sterculiaceae, fazendo breve referência ao gênero. Contudo, ressaltam-se os trabalhos relacionados à anatomia foliar de *T. cacao* (Nakayama *et al.*, 1996) e morfologia foliar de *T. grandiflorum* (Ferreira *et al.*, 2008).

Até o momento, não constam na literatura, informações anatômicas sobre espécies economicamente pouco exploradas, como *T. speciosum* e *T. subincanum*, cuja polpa de sabor adocicado é consumida por populações nativas da Amazônia e suas sementes produzem chocolate considerado de qualidade baixa a aceitável (Cuatrecasas, 1964; Souza & Venturieri, 2010).

Diante da importância econômica de *Theobroma*, em âmbito local e global, e da escassez de estudos anatômicos do gênero, este trabalho teve como objetivo geral realizar o estudo estrutural e histoquímico do eixo vegetativo aéreo *T. grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. speciosum* Willd. ex Spreng. e *T. subincanum* Mart., como contribuição ao conhecimento biológico de plantas nativas da região.

Como objetivos específicos, o presente estudo se propôs a identificar padrões anatômicos entre as espécies estudadas, através de análise comparativa; e inventariar as estruturas secretoras de mucilagem, quanto à origem, estrutura e distribuição.

A dissertação consiste de dois capítulos, redigidos na forma de artigos de acordo com as normas da Revista Brasileira de Botânica e Acta Botanica Brasilica, respectivamente:

- 1. Anatomia foliar de três espécies de *Theobroma* L. (Malvaceae s.l.): fruteiras nativas da Amazônia.**

- 2. Cavidades e ductos em três espécies de *Theobroma* L. (Malvaceae s.l.): estrutura e histoquímica.**

1.1 Referências

- Alves, R.M.; Resende, M.D.V.; Bandeira, B.S.; Pinheiro & T.M; Farias, D.C.R. 2010. Avaliação e seleção de progêneres de cupuaçzeiro (*Theobroma grandiflorum*), em Belém, Pará. **Revista Brasileira de Fruticultura** 32(1): 204-212.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** 161: 105–121.
- Cuatrecasas, J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions from the United State National Herbarium** 35:379-614.
- Ferreira, M.G.R.; Nogueira, A.E.; Damião-Filho, C.F. 2008. Morfologia foliar de *Theobroma grandiflorum* Schum. **Ciência Rural, Santa Maria** 38 (2): 530-533.
- Gondim, T.M.S.; Thomazini, M.J.; Cavalcante, M.J.B; Souza & J.M.L. 2001. Aspectos da produção do cupuaçu. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Acre Documentos 67**.
- Kubitzki, K. & Bayer, C. 2003. **The Families and Genera of Vascular Plants. V. Flowering Plants. Dicotyledons. Malvales, Capparales and Non-betalain Caryophyllales.** Springer, Berlin.
- Martini, M.H.; Lenci, C.G.; & Tavares, D.Q. 2003. Mucilage pockets in cotyledon tissue of *Theobroma speciosum*. **Acta Microscopica** 12(1):65-69.
- Martini, M.H.; Lenci, C.G.; Figueira, A.; Tavares, D.Q. 2008. Localization of the cotyledon reserves of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T. cacao* L. **Revista Brasileira de Botânica** 31(1): 147-154.
- Metcalfe, C.R. & Chalk, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses.** Clarendon Press, Oxford.
- Nakayama, L.H.I.; Soares, M.K.M.; Appenzato-da-Glória, B. 1996. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.). **Scientia Agricola** 53(1).

Nogueira, A.K.M. & Santana, A.C. 2009. Análise de sazonalidade de preços de varejo de açaí, cupuaçu e bacaba no estado do Pará. **Revista de Estudos Sociais** 1(21).

Pugliese, A.G. 2010. **Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate: Composição e possíveis benefícios.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

Resende, M.L.V.; Costa, J.C.B.; Cavalcanti, F.R.; Ribeiro-Júnior, P.M. & Camilo, F.R. 2007. Seleção de Extratos Vegetais para Indução de Resistência e Ativação de Respostas de Defesa em Cacau contra a Vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira** 32(3).

Santos, S.F. 2003. **Estrutura e histoquímica de sementes do gênero *Theobroma* L. (Sterculiaceae).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.

Silva, C.R.S.; Venturieri, G.A.; Figueira, A. 2004. Description of Amazonian *Theobroma* L. collections, species identification, and characterization of interspecific hybrids. **Acta Botanica Brasilica** 18(2): 333-341.

Souza, M.S. & Venturieri, G.A. 2010. Floral Biology of Cacauhy (*Theobroma speciosum* - Malvaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 53(4).

**2. Capítulo 1: Anatomia foliar de três espécies de *Theobroma L.* (Malvaceae s.l.): fruteiras
nativas da Amazônia**

TARCYMARA BARATA GARCIA^{1,2(*)}, TATIANI YURIKO SOUZA KIKUCHI², DIEGO
DEMARCO³, ANA CRISTINA ANDRADE DE AGUIAR-DIAS⁴

1. Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Perimetral, 2501, 66077-901, Universitário, Belém, PA.
2. Museu Paraense Emílio Goeldi, Coordenação de Botânica, Av. Perimetral, 1901, 66077-530, Terra Firme, Belém, PA, Caixa Postal 6109.
3. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Rua do Matão, 277, 05508-090, Butantã, São Paulo, SP, Caixa Postal: 11461.
4. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas – Campus Básico, Rua Augusto Corrêa, 1, 66075-110, Guamá, Belém, PA.

(*) Autor para correspondência: tarcymara@gmail.com

RESUMO

Anatomia foliar de três espécies de *Theobroma* L. (Malvaceae s.l.): fruteiras nativas da Amazônia. *Theobroma* possui relevância econômica devido à utilização de *T. cacao* e *T. grandiflorum* na indústria de chocolate. Neste trabalho, realizou-se o estudo anatômico de *T. grandiflorum*, *T. speciosum* e *T. subincanum*, como contribuição ao conhecimento biológico de espécies nativas da Amazônia. Folhas adultas foram coletadas e fixadas para análises em microscopia de luz e de varredura, segundo técnicas convencionais. As características anatômicas das espécies estão de acordo com as citadas para Malvaceae s.l.: estrutura vascular do pecíolo, estômatos anomocíticos, cristais de oxalato de cálcio, estruturas secretoras de mucilagem e tricomas estrelados, sendo as duas últimas consideradas sinapomorfias da família. Tricomas glandulares foram observados em todas as espécies e idioblastos mucilaginosos foram encontrados na epiderme adaxial de *T. speciosum*. A densidade dos tricomas e a presença de idioblastos cristalíferos e fenólicos foram consideradas como mecanismos de proteção contra herbívoros. Considerando-se a morfologia dos tricomas e da nervura central, bem como, a constituição do mesofilo, evidenciou-se similaridade anatômica entre *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, corroborando a circunscrição das mesmas na seção *Glossopetalum*.

Palavras-chave: cupuaçu, tricomas estrelados, tricomas glandulares.

ABSTRACT

Foliar anatomy of three *Theobroma* L. species (Malvaceae s.l.): native Amazonian fruit trees. *Theobroma* has an economic importance due to use of *T. cacao* and *T. grandiflorum* (cupuassu) in the chocolate industry. In the present paper, it was studied foliar anatomy of *T. grandiflorum*, *T. speciosum* and *T. subincanum*, as a contribution to biological knowledge of Amazon native species. Adult leaves were collected and fixed for *light and scanning microscopy analysis*, through conventional techniques. The anatomical characteristics of species are in agreement with those cited for Malvaceae s.l., such as: vascular structure of the petiole, anomocytic stomata, calcium oxalate crystals, mucilage-secreting structures and stellate trichomes. These last two can be considered *synapomorphy for the family*. Glandular trichomes were observed in all species studied whereas *mucilaginous epidermis* was observed only in *T. speciosum*. Stellate trichomes density and occurrence of crystal and phenolic idioblasts were considered as defense mechanisms against herbivores. It was observed anatomical similarity between *T. grandiflorum* e *T. subincanum* with regard to trichomes and midrib morphology, as well as, mesophyll organization, which corroborates the *circumscription* these species in section *Glossopetalum*.

Key-words: cupuassu, stellate trichomes, glandular trichomes.

2.1 Introdução

Theobroma L., atualmente incluído em Malvaceae s.l. (APG III, 2009), abrange 22 espécies, distribuídas em seis seções, com ocorrência neotropical, estendendo-se da bacia amazônica ao sul do México. No Brasil, o gênero está representado por dez espécies, todas nativas da Amazônia (Cuatrecasas, 1964). Dentre as espécies economicamente relevantes do gênero, destacam-se *Theobroma cacao* L. e *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng) Schum. (cupuaçu) devido a sua utilização nas indústrias cosmética e alimentícia, especialmente na produção de chocolate e produtos similares como o cupulate, respectivamente (Pugliese, 2010).

O cultivo de *T. grandiflorum* iniciou-se no Pará em 1970 e posteriormente foi expandido para toda a região amazônica (Alves *et al.*, 2010). Atualmente, o cupuaçu está entre as frutas de maior dinâmica de produção, comercialização e inserção nos mercados nacional e internacional, sendo o Pará o principal produtor no Brasil (Nogueira & Santana, 2009).

O Pará possui duas coleções *in vivo* de *Theobroma*: "George O'Neill Addison", pertencente à Embrapa Amazônia Oriental e "Basil George David Bartley", estabelecida na "Estação de Recursos Genéticos do Cacau José Haroldo" (ERJOGH) da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), instaladas desde 1945 e 1984, respectivamente. Tais coleções detêm um considerável número de espécies selvagens, híbridos interespecíficos naturais e artificiais, sendo extremamente importantes para a conservação *in situ* de recursos genéticos do gênero, uma vez que, suas sementes são recalcitrantes, tornando a conservação *ex situ* convencional inviável (Silva *et al.*, 2004).

O conhecimento anatômico de *Theobroma* torna-se útil para o estabelecimento e manutenção de coleções de germoplasma, tendo em vista que tais informações fornecem subsídios aos estudos agronômicos, fitopatológicos e programas de melhoramento genético. Entretanto, estudos anatômicos deste gênero são escassos, principalmente em relação aos órgãos vegetativos, entre os quais podem ser citados: Metcalfe & Chalk (1950), Nakayama *et al.* (1996) e Ferreira *et al.* (2008). Quanto aos aspectos anatômicos de espécies economicamente pouco exploradas, como *T.*

speciosum Willd. ex Spreng. (cacauí) e *T. subincanum* Mart. (cupuí), constam na literatura apenas trabalhos referentes às sementes (Santos, 2003; Martini *et al.*, 2008). Embora as sementes destas espécies não sejam comercializadas, a polpa com sabor adocicado é consumida por populações nativas da região amazônica (Souza & Venturieri, 2010).

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo investigar a anatomia foliar de *T. grandiflorum*, *T. speciosum* e *T. subincanum*, como contribuição ao conhecimento biológico de plantas nativas da região amazônica, fornecendo dados que possam evidenciar padrões estruturais no gênero, assim como, em Malvaceae.

2.2 Material e métodos

Folhas completamente desenvolvidas, ao nível do 5º nó visível, foram coletadas de *T. grandiflorum*, *T. speciosum* e *T. subincanum*, provenientes do Município de Moju-PA (1°44'S; 48°30'W) e da ERJOH/CEPLAC (1°12'S; 49°13'W), localizada no município de Marituba-PA. Material testemunho foi herborizado e incorporado no Herbário João Murça Pires como MG 202760, MG 198499 e MG 196837, respectivamente.

O material foi fixado em FAA₇₀ (Johansen, 1940) por 24h; FNT - Formalina Neutra Tamponada (Lillie, 1965) e SFF - Sulfato Ferroso em Formalina (Johansen, 1940) por 48 h, para preservação de substâncias hidrofílicas, lipofílicas e fenólicas, respectivamente. Amostras do terço mediano do pecíolo e do limbo foliar foram desidratadas em série de álcool butílico terciário e incluídas em parafina.

Amostras fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 24 h, foram desidratadas em série etílica para inclusão em hidroxetilmetacrilato Leica® (Gerrits, 1991) e análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Secções transversais e paradérmicas, com 10-12 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo. As secções das amostras incluídas em parafina e historresina foram coradas com safranina/azul de astra (Gerlach, 1969) e azul de toluidina (O'Brien *et al.*, 1964), respectivamente.

A dissociação epidérmica foi feita com solução de peróxido de hidrogênio e ácido acético (Franklin, 1945 modificado), sendo as epidermes coradas em azul de astra e safranina (Bukatsch, 1972 modificado) e montadas em glicerina aquosa a 50% (Purvis *et al*, 1964).

Para as análises no MEV, modelo LEO 1450 VP, as amostras pós-fixadas foram secas em ponto crítico de CO₂ e metalizadas com ouro (Robards, 1978). Microanálises de cristais de oxalato de cálcio foram realizadas através de detector de EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) Gresham acoplado ao MEV.

Utilizou-se cloreto férrico para detectar compostos fenólicos e solução de lugol para amido (Johansen, 1940). As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio Axiolab Zeiss. A classificação adotada para os tricomas glandulares e não-glandulares está de acordo com Hussin & Sani (1998) e Theobald *et al.* (1979), respectivamente.

2.3 Resultados

2.3.1 Pecíolo

O pecíolo das espécies estudadas possui contorno circular em secção transversal. A epiderme é unisseriada apresentando estômatos acima do nível epidérmico (Fig 1A), tricomas glandulares e não-glandulares.

Os tricomas glandulares são do tipo claviforme, constituídos por uma célula basal, pedúnculo unisseriado com 2-3 células de paredes lignificadas e cabeça com 5-9 células secretoras (Fig. 1B).

Os tricomas não-glandulares são multicelulares, estrelados, rotados, constituídos por 4-8 braços. Cada segmento deste é unicelular, cuja dilatação da base forma uma elevação no centro do tricoma. Estes tricomas são sésseis em *T. speciosum* e pedunculados em *T. grandiflorum* e *T. subincanum*. O pedúnculo dos tricomas possui 2-3 séries de células lignificadas, estando geralmente suspenso por elevações epidérmicas (Fig. 1C).

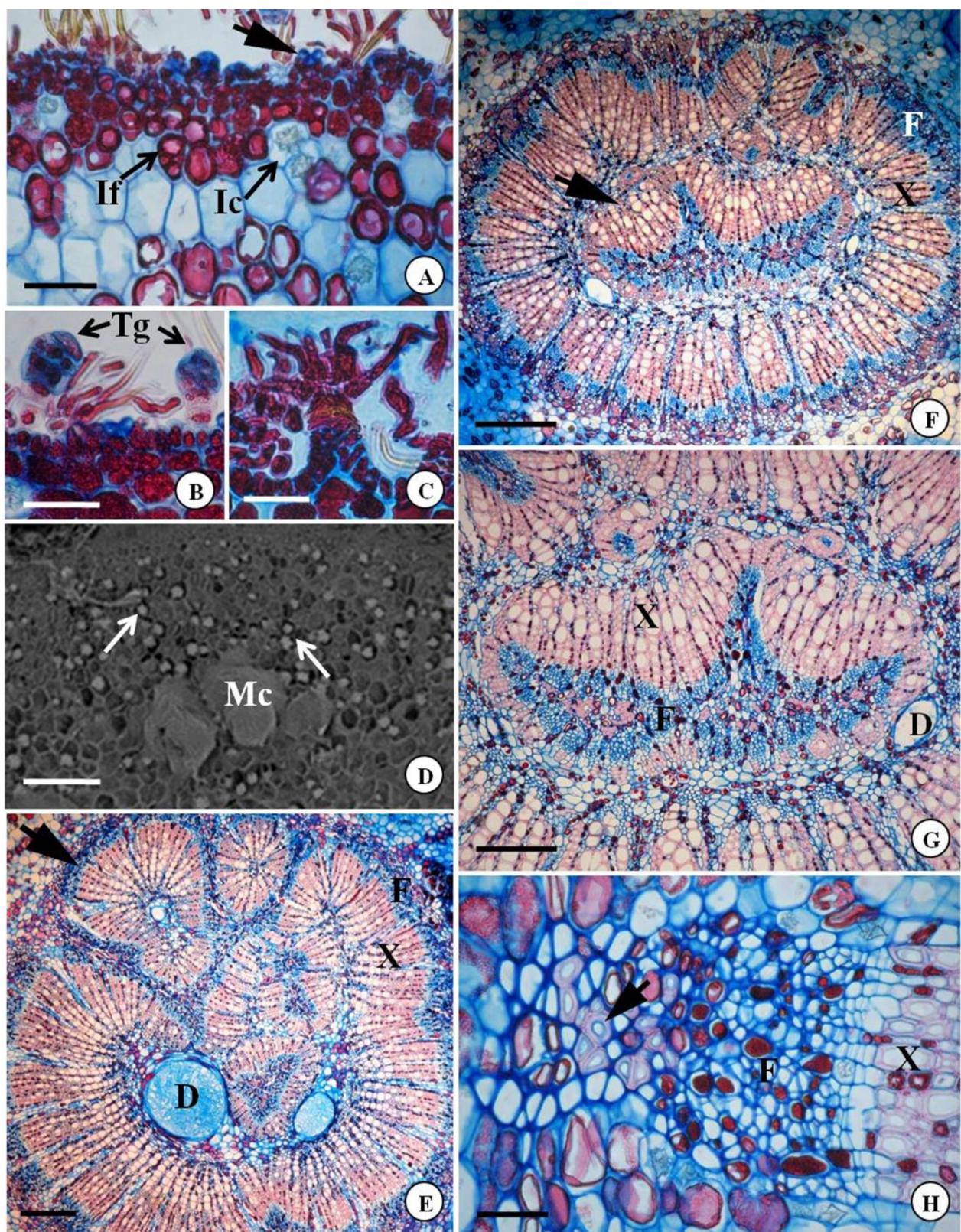


Figura 1 A-H: Pecíolo de *T. grandiflorum* (E e H), *T. speciosum* (A, B, F, G) e *T. subincanum* (C, D), em seção transversal. A: Superfície e córtex, notar a presença de estômatos situados acima do nível epidérmico (seta), idioblastos cristalíferos (Ic) e fenólicos (If). B: Tricomas glandulares (Tg). C: Tricomas estrelados pedunculados. D: Idioblastos contendo drusas na região cortical (seta) e cavidades secretoras de mucilagem (Mc). E-H: Sistema vascular. E e F: Feixes vasculares organizados em arco (E) e anel (F) com feixes acessórios (setas). G: Feixe acessório encerrado na medula exibindo floema intraxilemático. H: Detalhe do feixe vascular evidenciando grupos de fibras (seta). D: Ducto secretor de mucilagem, F: Floema, X: Xilema. Barras: A e H= 50 μ m; B= 40 μ m, C= 30 μ m; D= 400 μ m; E e F= 300 μ m; G= 200 μ m.

O córtex e a medula são constituídos por parênquima fundamental, sendo a medula relativamente escassa contendo ductos secretores de mucilagem (Fig. 1E-G).

Em todas as espécies, o sistema vascular é composto por feixes colaterais e apresenta organização diversificada, sendo os tipos mais comuns em forma de arco (Fig. 1E) ou anel (Fig. 1F), contendo um ou mais feixes acessórios. Freqüentemente, os feixes acessórios apresentam-se encerrados na medula mostrando floema intraxilemático (Fig. 1G). Grupos de fibras com distribuição esparsa ocorrem no floema (Fig. 1H).

Idioblastos fenólicos e cristais de oxalato de cálcio em forma de prismas e drusas foram observados no sistema vascular e fundamental, principalmente na região cortical (Fig. 1A). Substâncias fenólicas também foram visualizadas nas células epidérmicas. As drusas são numerosas no córtex de *T. subincanum* (Fig. 1D).

2.3.2 Limbo foliar

Epiderme - Em vista frontal, as células epidérmicas possuem paredes anticlinais moderadamente onduladas em ambas as faces (Figs. 2A-B), excetuando-se em *T. subincanum*, na qual são retas (Fig. 2C). O revestimento cuticular da face adaxial é liso (Fig. 2D) com depósitos de cera epicuticular em disposição laminar (Fig. 2E). Tricomas glandulares e não-glandulares ocorrem em ambas as faces do limbo, formando um indumento denso na abaxial (Figs. 2F-H), especialmente em *T. subincanum* (Fig. 2I). As espécies apresentam folhas hipoestomáticas com estômatos anomocíticos situados acima do nível epidérmico (Fig. 2J).

Os tricomas glandulares são constituídos basicamente por uma célula basal, pedúnculo unisseriado com células de paredes lignificadas e cabeça secretora. Foram observados dois tipos de tricomas glandulares no limbo: 1) digitiforme, apresenta pedúnculo bicelular e cabeça com 3-4 células, geralmente mostrando-se inclinado em direção à base, encontrado em *T. grandiflorum* e *T. subincanum* (Figs. 3A-B); 2) claviforme, exibe pedúnculo bicelular e cabeça com 4-6 células, restrito à *T. speciosum* (Figs. 3C-D). Na face adaxial os tricomas glandulares são decíduos, ficando

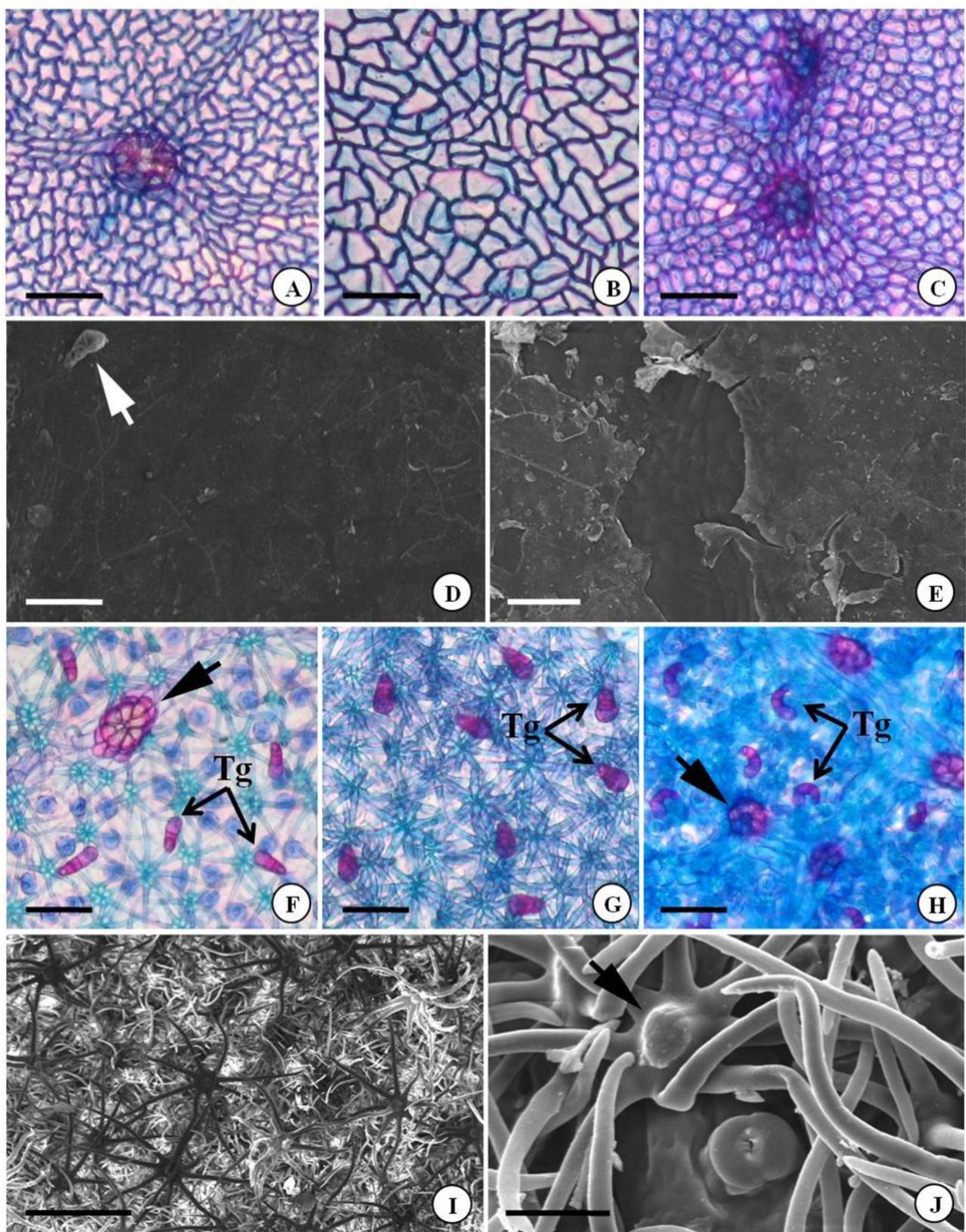


Figura 2 A-J: Superfície foliar de *T. grandiflorum* (A, D, F, J), *T. speciosum* (B, E, G) e *T. subincanum* (C, H, I). A-C: Face adaxial da epiderme em vista frontal, notar bases de tricoma estrelado. B: Detalhe da cutícula lisa na face adaxial, observar tricoma glandular colapsado (seta). E: Detalhe da cera epicuticular do tipo laminar. F-H: Face abaxial da epiderme em vista frontal evidenciando estômatos, tricomas glandulares (Tg), tricomas estrelados sésseis e pedunculados (setas). I: Vista geral do indumento denso. J: Estômato anomocítico situado acima do nível epidérmico e detalhe da elevação (seta) no centro do tricoma estrelado. Barras: A, B, C, F, G, H= 50 μ m; E= 40 μ m; I= 150 μ m; J= 15 μ m.

somente as bases visíveis, porém quando permanecem se encontram colapsados.

Os tricomas não-glandulares são semelhantes aos descritos para o pecíolo. Os tricomas estrelados sésseis estão presentes no limbo de todas as espécies, enquanto que os pedunculados são exclusivos de *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, menos numerosos e ocorrem especialmente sobre as nervuras (Figs. 3E-F). Elevação no centro do tricoma, na região basal, foi observada em ambos os tipos (Figs. 2J, 3E-F).

A epiderme é unisseriada em secção transversal. As células epidérmicas apresentam maior comprimento e paredes periclinais externas geralmente planas na face adaxial, enquanto que na abaxial estas paredes são convexas. A densidade do indumento varia entre as espécies, sendo maior em *T. subincanum* e menor em *T. grandiflorum* (Figs. 4A-C).

Substâncias fenólicas foram observadas na epiderme de todas as espécies, em ambas as faces, ocorrendo como inclusões celulares densas e homogêneas ou granulares, que podem ocupar todo o lume celular. Este conteúdo cora-se de vermelho pela safranina e adquire coloração marrom nas amostras fixadas em SFF (Fig. 3G-H). Idioblastos mucilaginosos foram identificados na epiderme adaxial de *T. speciosum*, corando-se de roxo pelo azul de toluidina (Fig. 3I-J).

Mesofilo - O mesofilo das espécies é dorsiventral (Figs. 4A-F). O parênquima paliçádico consiste de um estrato em *T. speciosum* (Fig. 4E), 1-2 em *T. subincanum* (Fig. 4F) e 1-3 em *T. grandiflorum* (Fig. 4D). O parênquima lacunoso é constituído por 4-5 e 3-4 estratos de células isodiamétricas em *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, respectivamente, enquanto que em *T. speciosum*, este parênquima apresenta três estratos de células alongadas.

Feixes vasculares colaterais estão dispersos no mesofilo das espécies, envoltos por células esclerenquimáticas e parenquimáticas, com conteúdo fenólico, formando bainhas que se estendem até as epidermes (Figs. 4D-F). Em *T. speciosum*, ductos de mucilagem encontram-se associados aos feixes vasculares. Idioblastos contendo cristais prismáticos ou comumente drusas de oxalato de cálcio ocorrem geralmente entre as células do parênquima paliçádico (Fig. 4G-H), alguns com conteúdo mucilaginoso, observados principalmente em *T. grandiflorum*.

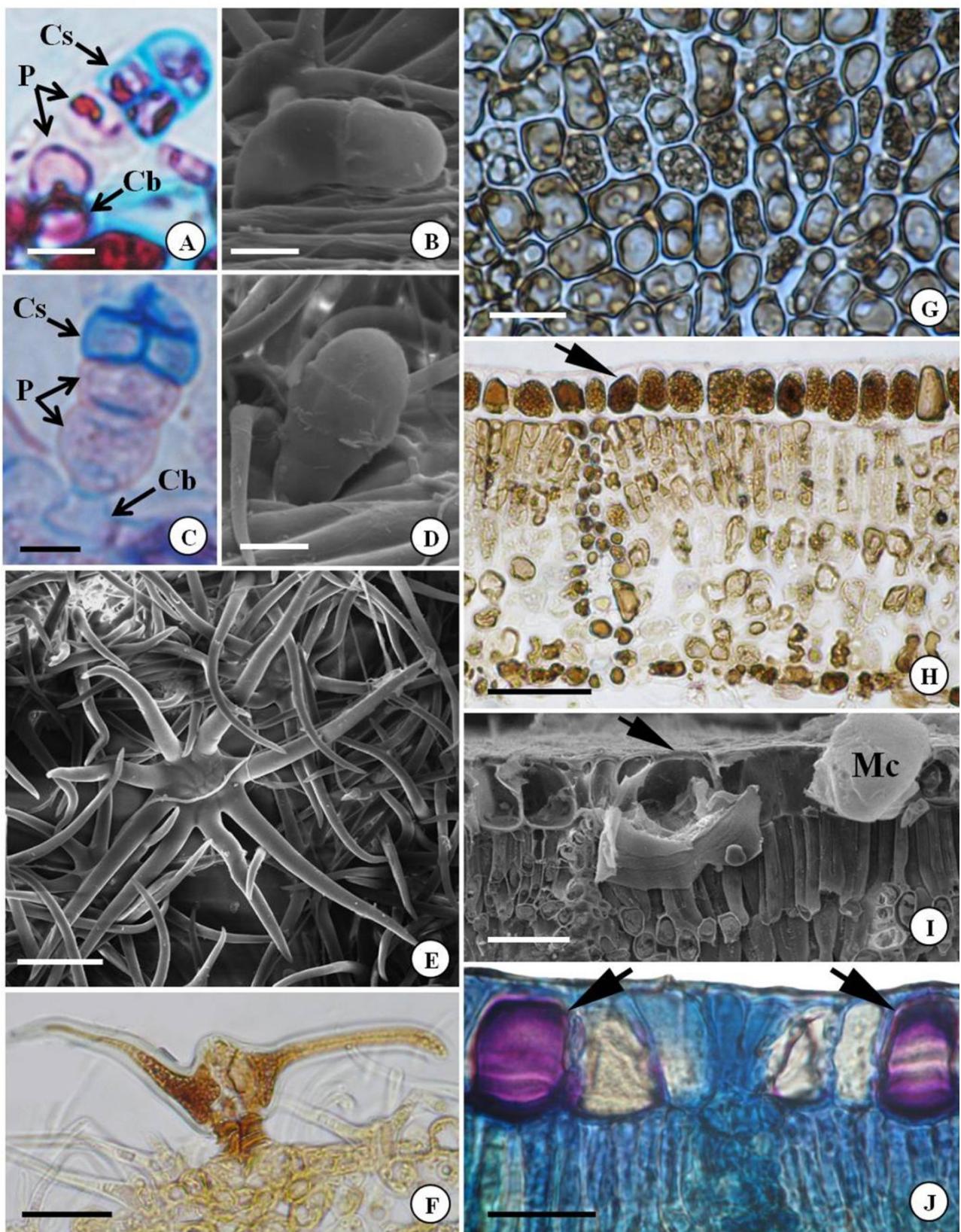


Figura 3 A-I: Epiderme do limbo foliar de *T. grandiflorum* (A, B, G, H), *T. speciosum* (C, D, E, I, J) e *T. subincanum* (F). A-D: Tricomas glandulares do tipo digitiforme (A e B) e claviforme (C e D), constituídos por célula basal (Cb), pedúnculo bicelular (P) e células secretoras (Cs). E e F: Tricomas estrelados pedunculados, notar a elevação no centro. G e H: Idioblastos fenólicos na face adaxial em secção paradérmica (G) e transversal (H). I e J: Idioblastos mucilaginosos (setas) na face adaxial. Mc: Mucilagem. Barras: A, B e J= 10µm; F, G e H= 40µm; B= 20µm; D=12µm; E e I= 30µm.

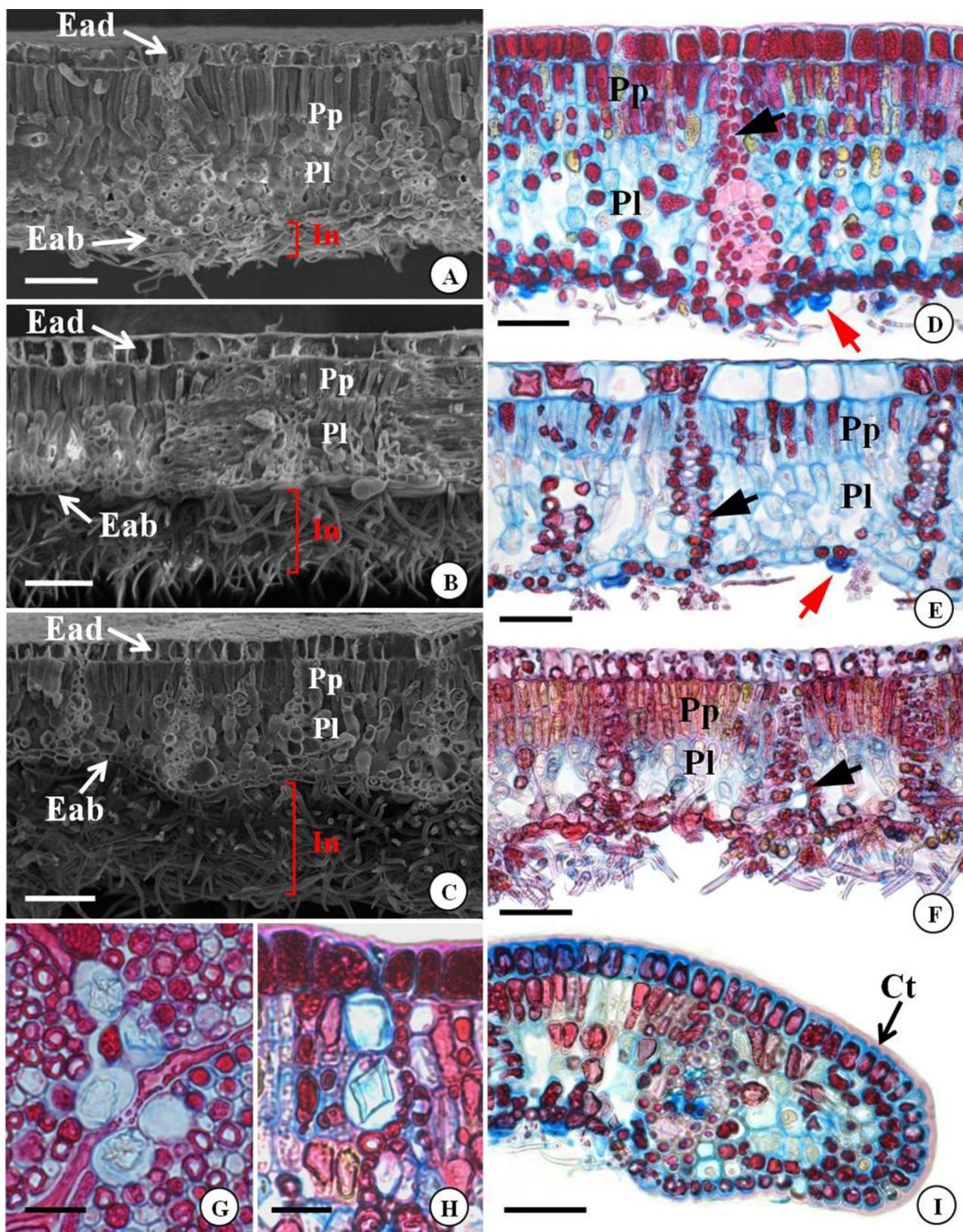


Figura 4 A-I: Mesófilo e margem de *T. grandiflorum* (A, D, G, H, I), *T. speciosum* (B e E) e *T. subincanum* (C e F), em secção transversal. A-F: Constituição do mesófilo mostrando a estratificação dos parênquimas paliçádico (Pp) e lacunoso (Pl). A-C: Variação da espessura do mesófilo (Ms) e densidade do indumento (In) entre as espécies. Em D, E e F: notar a epiderme unisseriada, estômatos elevados (setas vermelhas) e extensões da bainha parenquimática e esclerenquimática (setas pretas). G e H: Idioblastos cristalíferos em secção paradérmica (G) e transversal (H). I: Margem, notar a cutícula (Ct) espessa. Ead: Epiderme adaxial, Eab: Epiderme abaxial. Barras: A, B, C= 50µm; D, E, F, I= 40µm; G e H= 20 µm.

Margem - A margem foliar das espécies exibe forma terminal arredondada em secção transversal e ligeira flexão voltada para face abaxial. A epiderme possui conteúdo fenólico e revestimento cuticular espesso, sendo geralmente desprovida de tricomas. O parênquima consiste de células com contorno arredondado, entre as quais, encontram-se fibras, idioblastos fenólicos e cristalíferos (Fig. 4G-H). Em todas as espécies, esta região apresenta um feixe vascular envolto por bainha esclerenquimática, mostrando-se bem desenvolvido em *T. speciosum*.

Nervura central - A nervura central, em secção transversal, possui formato côncavo-convexo em *T. grandiflorum* e *T. subincanum* (Fig. 5A) e biconvexo em *T. speciosum* (Fig. 5B). Em todas as espécies, logo abaixo da epiderme abaxial ocorrem cerca de duas a três camadas de colênquima angular-lacunar. A região cortical é predominantemente esclerenquimática em *T. grandiflorum* (Fig. 5C), com lamelação de parede celular evidente e parenquimática em *T. speciosum* (Fig. 5D) e *T. subincanum*. O sistema vascular apresenta-se fechado e envolto por bainha esclerenquimática. Os feixes vasculares são colaterais, geralmente organizados em forma de arco, com terminações curvadas na região adaxial (Fig. 5E), ou em forma de anel, com um ou mais feixes acessórios externos ou encerrados na medula (Figs. 5F-G).

Em todas as espécies, idioblastos fenólicos e cristais de oxalato de cálcio em forma de prismas e drusas foram observados no sistema fundamental e vascular. Substâncias fenólicas também foram evidenciadas na epiderme (Fig. 5H). Ductos secretores de mucilagem estão presentes no córtex e medula (Figs. 5E, 5F, 5I). Numerosos grãos de amido foram visualizados na medula, constituindo um parênquima amilífero em *T. grandiflorum* e *T. subincanum* (Fig. 5I).

2.4 Discussão

Os caracteres anatômicos foliares nos táxons estudados, de modo geral, estão de acordo com os citados por Metcalfe & Chalk (1950) para a família Sterculiaceae (atualmente incluída em Malvaceae s.l.), tais como: estrutura vascular do pecíolo, tipo e distribuição estomática, cristais

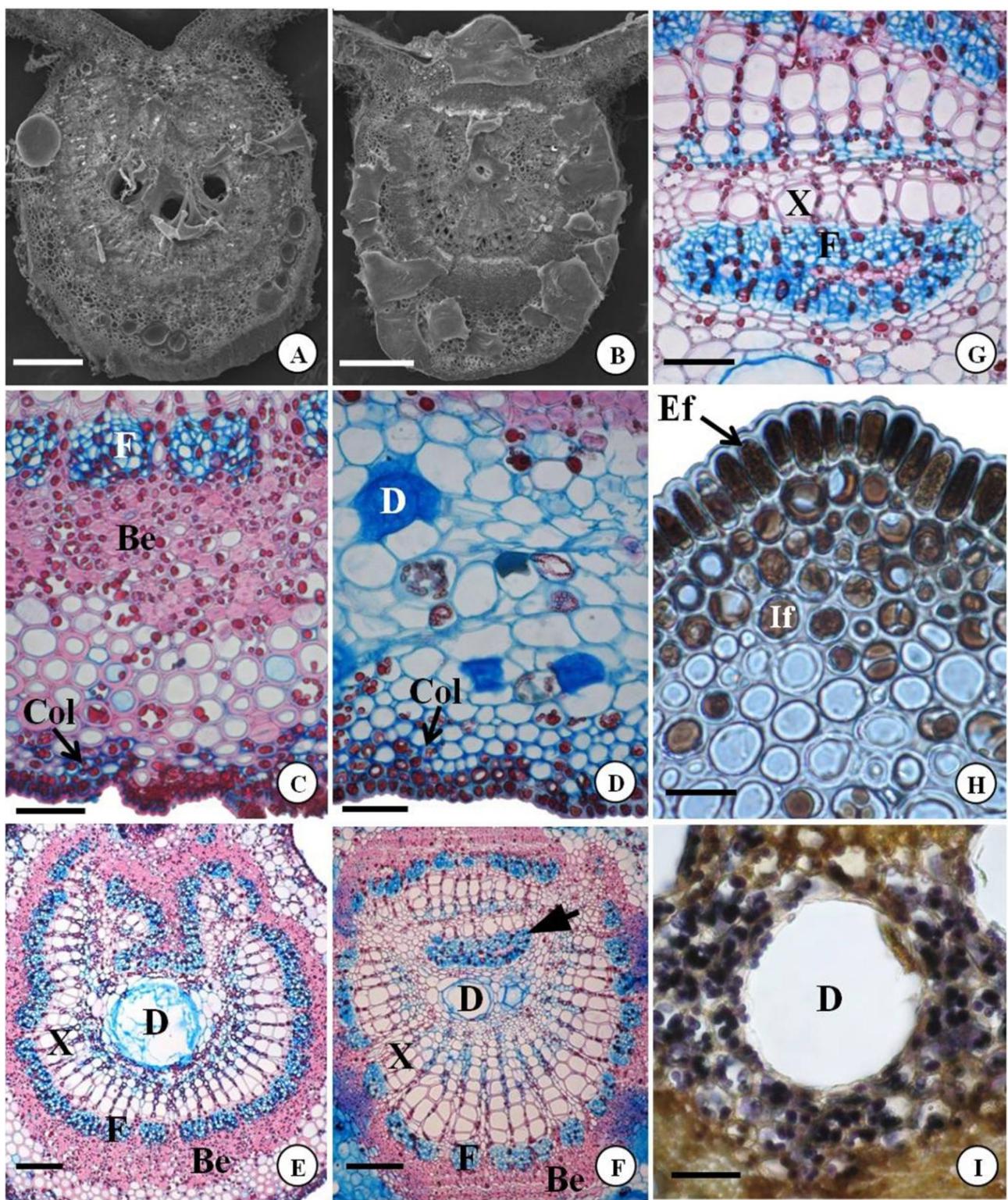


Figura 5 A-I: Nervura central de *T. grandiflorum* (C e E), *T. speciosum* (B, D, F, G, H) e *T. subincanum* (A e I). A e B: Morfologia em secção transversal. C e D: Epiderme e região cortical mostrando o colênquima (Col), notar córtex predominantemente esclerenquimático em (C) e parenquimático em (D). E-G: Sistema vascular envolto por bainha esclerenquimática (Be), com arranjo em arco (E) ou anel (F) encerrando um feixe acessório na medula (seta), notar a ocorrência de ductos secretores (D) na medula. G: detalhe do feixe acessório. H: Epiderme fenólica e idioblastos fenólicos (If) no córtex. X: xilema, F: Floema. I: Grãos de amido nas células parenquimáticas da medula. Barras: A e B= 300µm; C, D, E, F, G, I= 50µm; H= 20µm.

comumente em forma de drusas, estruturas secretoras de mucilagem e tricomas estrelados, sendo os dois últimos considerados sinapomorfias de Malvaceae *s.l.* (APG III, 2009).

A estrutura vascular do pecíolo das espécies estudadas segue o tipo mencionado por Kubitzki & Bayer (2003) para Malvaceae *s.l.*, exibindo arranjo em arco ou anel, com feixes vasculares adicionais que às vezes formam um anel interno.

A presença de tricomas estrelados nas espécies investigadas foi considerada por Cuatrecasas (1964) como um caráter diagnóstico em *Theobroma*. No entanto, além destes, foram identificados tricomas glandulares na epiderme de todas as espécies, embora tenham sido detectadas apenas suas bases remanescentes ou a estrutura completamente colapsada na face adaxial. Evidentemente, os tricomas desta face se encontram em fase pós-secretora nas folhas adultas, sendo ativos em estágios iniciais do desenvolvimento.

Tricomas glandulares claviformes também foram descritos na epiderme cotiledonar de espécies de *Theobroma* (Santos, 2003), incluindo as do presente estudo, bem como, nas folhas de *T. cacao* (Nakayama *et al.*, 1996) e *Pavonia alnifolia* (Pimentel *et al.*, 2011). Em Malvaceae, este tipo de tricoma é comum em nectários florais, a exemplo de *Dombeya wallichii* (Lindl.) K. Schum. e *D. natalensis* Sond. (Rocha *et al.*, 2010); e extra-florais, como em *Hibiscus forsteri* F.D. Wilson (Craven *et al.*, 2006) e *H. pernambucensis* Arruda (Rocha & Machado, 2009).

Os tricomas estrelados apresentados neste estudo são constituídos por até oito braços, característica que também foi demonstrada em espécies de *Hibiscus* (Shaheen *et al.*, 2009). Entretanto em *Hermannia incana* Cav. (Appidi *et al.*, 2008) os tricomas estrelados possuem até 16 braços. O papel destes tricomas na proteção contra herbívoros se aplica às espécies estudadas, considerando-se que *T. grandiflorum*, assim como outras espécies do gênero, é suscetível à infestação por “insetos-praga”, como coleópteros (Barbosa & Fonseca, 2002), lagartas (Lourido *et al.*, 2007) e formigas cortadeiras (Delabie, 1989). A densidade dos tricomas em *Abelmoschus esculentus* Moench apresenta uma correlação negativa com a alimentação e oviposição de insetos, bem como, com a nutrição das larvas (Lokesh & Singh, 2005). Embora as espécies aqui tratadas

tenham apresentado um indumento denso, especialmente em *T. subincanum*, estudos adicionais são necessários para compreender os mecanismos de resistência anti-herbivoria.

Por outro lado, a densidade do indumento diminui a turbulência do ar próximo à superfície foliar, gerando um microclima úmido que pode resultar na redução da difusibilidade de CO₂ (Larcher, 2001). Isto sugere que a posição dos estômatos acima do nível epidérmico funcione como um mecanismo eficiente para absorção de CO₂.

Epiderme mucilaginosa ocorre em órgãos reprodutivos e vegetativos de diversos táxons, sendo relatada nas flores de 349 espécies (Matthews & Endress, 2006) e nas folhas de 69 famílias de eudicotiledôneas (Metcalfe & Chalk, 1950), incluindo Bombacaceae, Tiliaceae, Sterculiaceae e Malvaceae *s.s.*(atualmente circunscritas em Malvaceae *s.l.*). Neste estudo, *T. speciosum* destacou-se por ser a única a apresentar epiderme com idioblastos mucilaginosos, restritos à face adaxial, característica igualmente observada em outras espécies de Malvaceae, tais como: *T. cacao* L. (Nakayama *et al.*, 1996), *Kitaibelia balansae* Boiss. (Güvenç & Duman, 2005), *Pavonia alnifolia* A.St.-Hil. (Pimentel *et al.*, 2009), representantes de *Dombeya* e *Nesogordonia* (Lersten & Curtis, 1997), *Sterculia* (Hussin & Sani, 1998) e *Hibiscus* (Rocha *et al.*, 2002). Conforme a estrutura secretora e o órgão no qual está localizada, a mucilagem desempenha diferentes funções, mas em geral, está relacionada à retenção de água, especialmente nas folhas expostas às condições elevadas de luminosidade (Katayama *et al.*, 2008).

A dorsiventralidade do mesofilo, verificada nas espécies estudadas, é uma característica comumente encontrada em Malvaceae, entretanto, em algumas espécies o parênquima paliçádico (*Heritiera*) ou o lacunoso (*Apeiba*, *Berrya*, *Reevesia*) é reduzido ou escasso (Kubitzki & Bayer, 2003). No caso de *T. speciosum*, as células do mesofilo, em secção transversal, apresentaram-se tipicamente alongadas de modo que os parênquimas são pouco distintos.

O mesofilo das espécies possui extensões da bainha dos feixes vasculares, conectando-se com ambas as faces da epiderme, característica também demonstrada em *T. cacao* (Nakayama *et al.*, 1996), *Luehea divaricata* Mart. (Walker *et al.*, 2008) e espécies de *Hibiscus* (Rocha & Neves,

2000). De acordo com Beck (2010), extensões da bainha do feixe são consideradas como vias de transporte de substâncias, principalmente água, entre as nervuras e as células epidérmicas. Nas espécies estudadas, as células que formam as extensões da bainha podem estar evolvidas na translocação de substâncias fenólicas entre o mesofilo e a epiderme, uma vez que a presença desses compostos foi observada nestas regiões. Santos *et al.* (2011) estudando as dimensões foliares de *Theobroma*, classificou as espécies do presente estudo como constituídas por folhas largas a intermediárias, o que permite afirmar que as extensões da bainha nas espécies estudadas são fundamentais como estruturas de suporte.

A morfologia da nervura central, em secção transversal, mostrou similaridade entre *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, nas quais é côncava-convexa e variou em *T. speciosum*, destacando-se como biconvexa. A estrutura vascular é semelhante nas três espécies. A presença de esclerênquima na nervura central, característica pronunciada em *T. grandiflorum*, foi relatada por Metcalfe & Chalk (1950) para o gênero.

Cristais de oxalato de cálcio foram observados sob a forma de prismas e drusas. Em todas as espécies, as drusas foi o tipo predominante, característica também encontrada em espécies de *Sterculia* (Hussin & Sani, 1998). Entretanto, em representantes de *Dombeya* e *Nesogordonia* o tipo prismático predominou (Lersten & Curtis, 1997). Nas espécies analisadas, as drusas concentram-se no pecíolo, enquanto que no limbo, os idioblastos cristalíferos são tipicamente observados em meio ao parênquima paliçádico. O valor taxonômico destes cristais em Malvaceae foi ressaltado por Rocha & Neves (2000) para segregar espécies de *Hibiscus*. Entre as diversas funções atribuídas aos cristais de oxalato de cálcio nos vegetais, citam-se: armazenamento de cálcio, remoção do cálcio em excesso no sistema metabólico, regulação da luz durante a fotossíntese em plantas de ambiente de sombra e proteção contra herbivoria (Franceschi & Nakata, 2005). O aumento da síntese dos cristais nas folhas de *Sida rhombifolia* L. está intimamente relacionado à ação de herbívoros, ainda que a disponibilidade de cálcio seja limitada (Flores, 2001).

A presença de compostos fenólicos foi observada no pecíolo e limbo foliar de todas as espécies. Compostos fenólicos em *Theobroma* são mencionados em órgãos reprodutivos (Martini *et al.*, 2008) e vegetativos (Griffiths, 1958), constituindo um mecanismo de defesa contra patógenos, em função dos seus efeitos tóxicos e inibidores de enzimas hidrolíticas, tal como ocorre em *T. cacao* em relação à *Crinipellis perniciosa* (Nojosa *et al.*, 2003).

Neste trabalho, similaridades estruturais foram verificadas entre *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, considerando-se a morfologia dos tricomas e da nervura central, bem como, a constituição do mesofilo, corroborando a circunscrição dessas espécies na seção *Glossopetalum* (Cuatrecasas, 1964).

Agradecimentos

Ao CNPq pela Bolsa de Mestrado concedida à primeira autora. Aos Laboratórios de Anatomia Vegetal e Microscopia Eletrônica de Varredura do Museu Paraense Emílio Goeldi; e a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, pela assistência técnica.

2.5 Referências

Alves, R.M.; Resende, M.D.V.; Bandeira, B.S.; Pinheiro & T.M; Farias, D.C.R. 2010. Avaliação e seleção de progêneres de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*), em Belém, Pará. Revista Brasileira de Fruticultura 32(1): 204-212.

APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.

Appidi, J.R.; Grierson, D.S & Afolayan, A.J. 2008. Foliar Micromorfology of *Hermannia icana* Cav. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 (16): 2023 – 2027.

Barbosa, M.G.V. & Fonseca, C.R.V. 2002. Coleopterofauna visitante de *Theobroma grandiflorum* Schum. (Sterculiaceae) de uma plantação nos arredores de Manaus, Amazonas, Brasil. *Acta amazonica* 32(1): 83-100.

Beck, C.B. 2010. An Introduction to Plant Structure and Development Plant. Anatomy for the Twenty-First Century. Second Edition. Cambridge University Press, New York.

Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfarbung Astrablau-Safranin. *Mikrakosmos* 61(8): 255.

Craven, L.A.; Miller, C. & White, R.G. 2006. A new name, and notes on extra-floral nectaries, In *Lagunaria* (Malvaceae, Malvoideae). *Blumea* 51(2).

Cuatrecasas, J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Contributions from the United State National Herbarium 35:379-614.

Delabie, J.H.C. 1989. Novas opções para controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus brunneus* e *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae: Attini), na região cacaueira da Bahia, Brasil. *Agrotrópica* 1(3): 173-180.

Ferreira, M.G.R.; Nogueira, A.E. & Damião-Filho, C.F. 2008. Morfologia foliar de *Theobroma grandiflorum* Schum. *Ciência Rural* 38(2): 530-533.

Flores, B.M. 2001. Herbivory and Calcium Concentrations Affect Calcium Oxalate Crystal Formation in Leaves of *Sida* (Malvaceae). *Annals of Botany* 88: 387-391.

Franceschi, V.R. & Nakata, P.A. 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and function. Annual Review of Plant Biology 56: 41-71.

Franklin, G. L. 1945. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. Nature 155(3924).

Gerlach, D. 1969. Botanische Mikrotechnik. Eine Einführung, Georg Thieme, Stuttgart.

Gerrits, P. O. 1991. The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology State University Groningen, Netherlands.

Güven, A. & Duman, H. 2005. Morphology and anatomy of *Kitaibelia balansae* (Malvaceae), with notes on chorology in Turkey. Biologia Bratislava 60: 4-1.

Hussin, K.H. & Sani, Z.M. 1998. Comparative leaf anatomical studies of some *Sterculia* L. species (Sterculiaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 127: 159–174.

Griffiths, L.A. 1958. Phenolic Acids and Flavonoids of *Theobroma cacao* L. Separation and Identification by Paper Chromatography. Biochemistry Journal 70(1): 120–125.

Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill Book Co.

Katayama, H.; Takano, R. & Sugimura, Y. 2008. Localization of mucilaginous polysaccharides in mulberry leaves. Protoplasma 233: 157–163.

Kubitzki, K. & Bayer, C. 2003. The Families and Genera of Vascular Plants. V. Flowering Plants. Dicotyledons. Malvales, Capparales and Non-betalain Caryophyllales. Springer, Berlin.

Lersten, N.R. & Curtis, J.D. 1997. Leaf anatomy of *Dombeya* and *Nesogordonia* (Sterculiaceae), emphasizing epidermal and internal idioblasts. *Plant Systematics and Evolution* 207:59-86.

Lillie, R.D. 1965. Histopathologic techniques and practical histochemistry. New York: McGraw Hill.

Lokesh & Singh, R. 2005. Influence of Leaf Vein Morphology in Okra Genotypes (Malvaceae) on the Oviposition of the Leafhopper species *Amrasca biguttula* (Hemiptera: Cicadellidae). *Entomol Gener* 28(2): 103–114.

Lourido, G.; Silva, N.M. & Motta, C. 2007. Parâmetros Biológicos e Injúrias de *Macrosoma tipulata* Hübner (Lepidoptera: Hedylidae), em Cupuaçuzeiro *Theobroma grandiflorum* (Wild ex Spreng Schum) no Amazonas. *Neotropical Entomology* 36(1).

Martini, M.H.; Lenci, C.G.; Figueira, A. & Tavares, D.Q. 2008. Localization of the cotyledon reserves of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T. cacao* L. *Revista Brasileira de Botânica* 31(1): 147-154.

Matthews, M.L. & Endress, P.K. 2006. Floral structure and systematics in four orders of rosids, including a broad survey of floral mucilage cells. *Plant Systematics and Evolution* 260: 199–221.

Metcalfe, C. F. & Chalk, L. 1950. Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses. Oxford: Clarendon Press.

Nakayama, L.H.I.; Soares, M.K.M. & Appezato-da-Glória, B. 1996. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). *Scientia Agricola* 53(1).

Nogueira, A.K.M. & Santana, A.C. 2009. Análise de sazonalidade de preços de varejo de açaí, cupuaçu e bacaba no estado do Pará. *Revista de Estudos Sociais* 1(21).

Nojosa, G.B.A; Resende, M.L.V., Aguilar, M.A.G.; Bezerra, K.M.T. & Anhert, D.E. 2003. Componentes Fenólicos e Enzimas Oxidativas em Clones de *Theobroma cacao* Resistentes e Suscetíveis a *Crinipellis perniciosa*. *Fitopatologia brasileira* 28(2).

O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.

Pimentel, R.R; Machado, S.R. & Rocha, J.F. 2011. Estruturas secretoras de *Pavonia alnifolia* (Malvaceae), uma espécie ameaçada de extinção. *Rodriguésia* 62(2).

Pugliese, A.G. 2010. Compostos fenólicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e do cupulate: Composição e possíveis benefícios. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

Purvis, M.J.; Colller, D.C. & Walls, D. 1964. *Laboratory Techniques in Botany*. London, Butterwoths.

Robards, A.W. 1978. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells*. J.L. Hall (eds.). New York, Elsevier.

Rocha, J.F. & Neves, L.J. 2000. Anatomia foliar de *Hibiscus tiliaceus* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae). *Rodriguésia* 51: 113-132.

Rocha, J.F.; Neves, L.J. & Pace, L.B. 2002. Estruturas secretoras em folhas de *Hibiscus tiliaceus* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda. *Revista Universidade Rural* 22: 43-55.

Rocha, J.F. & Machado, S.R. 2009. Anatomy, ultrastructure and secretion of *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae) extrafloral nectar. *Revista Brasileira de Botânica* 32(3): 489-498.

Rocha, J.F.; Pimentel, R.R.; Rosa, M.M.T. & Machado, S.R. 2010. Anatomia e histoquímica dos nectários florais de *Dombeya wallichii* (Lindl.) K. Schum. e *Dombeya natalensis* Sond. (Malvaceae) *Rev. Biol. Neotrop.* 7(1): 27-36.

Santos, S.F. 2003. Estrutura e histoquímica de sementes do gênero *Theobroma* L. (Sterculiaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.

Santos, R.C; Pires, J.L. & Correa, R.X. 2011. Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. *Genet Resour Crop Evol.*

Shaheen, N.; Ajab, M.; Yasmin, G. & Hayat, M.Q. 2009. Diversity of Foliar Trichomes and Their Systematic Relevance in the Genus *Hibiscus* (Malvaceae). *International Journal of Agriculture & Biology* 11(3).

Silva, C.R.S.; Venturieri, G.A. & Figueira, A. 2004. Description of Amazonian *Theobroma* L. collections, species identification, and characterization of interspecific hybrids. *Acta Botanica Brasilica* 18(2): 333-341.

Souza, M.S. & Venturieri, G.A. 2010. Floral Biology of Cacauhy (*Theobroma speciosum* - Malvaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53(4).

Larcher, W., 2001. *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin

Theobald, W.L.; Krahulik, J.L. & Rollins, R.C. 1979. Trichome description and classification. In: C.R. Metcalfe & L. Chalk (eds.). *Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of the leaf and stem, with a brief history of the subject*. Clarendon Press, Oxford 1: 40-53.

Walker, C.I.B.; Zanetti, G.D.; Ceron, C.S. & Manfron, M. P. 2008. Morfoanatomia e Histoquímica das Folhas de *Luehea divaricata* Mart. *Latin American Journal of Pharmacy* 27 (2): 203-10.

**3. Capítulo 2: Cavidades e ductos em três espécies de *Theobroma* L. (Malvaceae s.l.): estrutura e
histoquímica**

Tarcymara Barata Garcia^{1,2(*)}, Tatiani Yuriko Souza Kikuchi², Diego Demarco³, Ana Cristina Andrade de Aguiar-Dias⁴

1. Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Perimetral, 2501, 66077-901, Universitário, Belém, PA.
2. Museu Paraense Emílio Goeldi, Coordenação de Botânica, Av. Perimetral, 1901, 66077-530, Terra Firme, Belém, PA, Caixa Postal 6109.
3. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Rua do Matão, 277, 05508-090, Butantã, São Paulo, SP, Caixa Postal: 11461.
4. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas – Campus Básico, Rua Augusto Corrêa, 1, 66075-110, Guamá, Belém, PA.

(*) Autor para correspondência: tarcymara@gmail.com

RESUMO

A presença de estruturas secretoras de mucilagem está entre as sinapomorfias de Malvales. *Theobroma* (Malvaceae s.l.) destaca-se pela relevância econômica de *T. cacao* e *T. grandiflorum* (cupuaçu), utilizadas na produção de chocolate e cupulate, respectivamente. Estruturas mucilaginosas nos órgãos vegetativos do gênero foram descritas somente em *T. cacao*. Este trabalho se propôs a estudar as estruturas secretoras de mucilagem em três espécies de *Theobroma*, quanto à distribuição, anatomia e histoquímica. Ápices vegetativos, caule e folhas em diferentes fases de desenvolvimento foram coletados, fixados e processados para análises em microscopia de luz e de varredura, segundo técnicas convencionais. As estruturas secretoras de mucilagem nas espécies estudadas compreendem cavidades e ductos. As cavidades estão localizadas no córtex do pecíolo e freqüentemente se fusionam formando cavidades tubulares. Os ductos estão distribuídos no ápice vegetativo, primórdio foliar, caule em desenvolvimento primário e secundário, pecíolo, nervura central e mesofilo. Estas estruturas são precocemente formadas no ápice vegetativo, sendo originadas no meristema fundamental, supostamente por processo lisígeno. A manutenção da atividade secretora em estádios de desenvolvimento tardios está relacionada à presença de bainha e faixa de células meristemáticas em associação com os ductos. A secreção é exclusivamente mucilaginosa, mostrando-se como uma característica conservativa no grupo estudado.

Palavras-chave: cupuaçu, estruturas secretoras, mucilagem.

ABSTRACT

Presence of mucilage-secreting structures is among the *synapomorphies* of Malvales. *Theobroma* (Malvaceae s.l.) stands out due to economic importance of *T. cacao* e *T. grandiflorum* (cupuassu), which are utilized in the production of chocolate and *cupulate*, respectively. Mucilaginous structures in the vegetative organs of genus were described only in *T. cacao*. The purpose of this work was to study the mucilage-secreting structures of three *Theobroma* species as regards distribution, anatomy and histochemistry.

Shoot apices, stem and leaves in different periods of development were collected, fixed and processed for *light and scanning microscopy analysis*, through conventional techniques. Mucilage-secreting structures observed in the species studied consist of cavities e ducts. The cavities were found in the cortical region of petiole often merged to form tubular cavities. The ducts are distributed in the shoot apices, leaf primordia, stem in primary and early secondary growth, petiole, midrib and mesophyll. The mucilage-secreting structures are precociously produced in the shoot apices, arising from cells of the ground meristem, likely by lysogenesis. Maintenance of secreting activity in the late stages of development is related to presence of meristematic cells sheet and layer in association with ducts. The secretion is exclusively mucilaginous, representing a conservative characteristic in the group studied.

Palavras-chave: cupuassu, mucilage, secretory structures.

3.1 Introdução

Estruturas secretoras de mucilagem estão entre as sinapomorfias químicas e anatômicas da ordem Malvales (Kubitzki & Bayer, 2003; APG III, 2009). Em Malvaceae s.l., tais estruturas incluem tricomas, idioblastos, cavidades e ductos, presentes em órgãos vegetativos e/ou reprodutivos, como, por exemplo, em espécies de *Dombeya* Cav. e *Nesogordonia* Baill. (Lersten & Curtis, 1997), *Hibiscus* L. (Rocha & Neves, 2000; Rocha *et al.*, 2002), *Theobroma* L. (Martini *et al.*, 2003) e *Guazuma ulmifolia* Lam. (Galina *et al.*, 2005).

A secreção mucilaginosa, de aspecto viscoso ou fluido, é constituída principalmente por polissacarídeos ácidos e/ou neutros de elevada massa molecular, entretanto, proteínas, compostos fenólicos e terpenos podem estar presentes. A mucilagem está relacionada principalmente às funções de retenção de água; reserva de carboidratos; reflexão luminosa e consequente redução da transpiração; dispersão de sementes, atuando como adesivo e evitando o dessecamento das mesmas; captura de presas por plantas carnívoras e lubrificação dos ápices caulinar e radicular (Fahn, 1979).

Considerando-se a diversidade de funções das estruturas secretoras de mucilagem e sua ampla ocorrência em espécies de Malvaceae, até o momento, dados referentes à distribuição, formação e desenvolvimento, sítios de síntese e secreção dessas estruturas são escassos para os representantes desta família. Contudo, ressaltam-se os recentes trabalhos sobre *Pavonia alnifolia* A.St.-Hil. (Pimentel *et al.*, 2011) e *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Rocha *et al.*, 2011). Em *Theobroma* (Malvaceae, s.l.), poucos trabalhos foram realizados enfatizando as estruturas secretoras de mucilagem, as quais foram relatadas em sementes (Santos, 2003; Martini *et al.*, 2008a; b) e folhas de *T. cacao* (Nakayama *et al.*, 1996), espécie mais conhecida do gênero devido a sua importância econômica na indústria de chocolate e seus derivados.

Theobroma (Malvaceae, s.l.) abrange 22 espécies com distribuição neotropical, destacando-se *T. cacao* (cacau) e *T. grandiflorum* (cupuaçu) pela sua utilização nas indústrias cosmética, farmacêutica, de chocolate e produtos similares como o cupulate (Pugliese, 2010). O cupuaçu tem polpa aromática, utilizada na preparação de bebidas, sorvetes, geléias, entre outros produtos, com ampla comercialização na Amazônia, sendo o Pará o principal produtor desta fruta no país (Nogueira & Santana, 2009). Embora outras espécies do gênero, como *T. speciosum* Willd. ex Spreng. (cacauí) e *T. subincanum* Mart. (cupuí) sejam economicamente pouco exploradas, a polpa com sabor adocicado é muito apreciada por populações nativas da região amazônica e suas sementes produzem chocolate considerado de qualidade baixa a aceitável (Cuatrecasas, 1964; Souza & Venturieri, 2010).

Este trabalho teve por objetivo investigar as estruturas secretoras de mucilagem, quanto à distribuição, anatomia e caracterização química da exsudato em três espécies de *Theobroma*, nativas da Amazônia.

3.2 Material e métodos

O material estudado de *T. grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. speciosum* Willd. ex Spreng. e *T. subincanum* Mart. foi coletado no Município de Moju-PA ($1^{\circ}44'S$; $48^{\circ}30'W$) e na Estação Experimental de Recursos Genéticos do Cacau “José Aroldo” (ERJOH) da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacauzeira - CEPLAC ($1^{\circ}12'S$; $49^{\circ}13'W$), localizada no município de Marituba-PA. Material testemunho foi herborizado e incorporado no Herbário João Murça Pires como MG 202760, MG 198499 e MG 196837, respectivamente.

Foram selecionados os ápices caulinares e os terços medianos de caule primário e secundário (1^a a 5^a região internodal visível), pecíolos e lâminas foliares (1º ao 5º nó visível). O material foi fixado em FAA por 24h (Johansen, 1940), formalina neutra tamponada (FNT) por 48h (Lillie, 1965) e sulfato ferroso em formalina por 48h (Johansen, 1940) para preservação de substâncias hidrofílicas, lipofílicas e fenólicas, respectivamente. As amostras foram desidratadas em série de álcool butílico terciário e incluídas em parafina.

Amostras fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 24 h, foram desidratadas em série etílica tanto para inclusão em hidroxetilmetacrilato Leica® (Gerrits, 1991) quanto para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Secções transversais e padérmicas, com 10-12 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo, coradas em safranina e azul de astra (Gerlach, 1969) e azul de toluidina (O’Brien *et al.*, 1964).

Para as análises no MEV, modelo LEO 1450 VP, as amostras após fixadas foram secas em ponto crítico de CO₂ e metalizadas com ouro (Robards, 1978).

As análises histoquímicas foram realizadas em amostras frescas, seccionadas à mão, e no material incluído em “paraplast”, seccionado em micrótomo rotativo. As principais classes de metabólitos presentes nas estruturas secretoras das espécies foram investigadas utilizando-se ácido periódico/reagente de Schiff – PAS (Mcmanus, 1948), vermelho de rutênio (Johansen, 1940), ácido tânico/cloreto férrico (Pizzolato e Lillie, 1973), sudan black B (Pearse, 1980) e cloreto férrico para detecção de polissacarídeos totais, mucilagens ácidas, mucilagens neutras, lipídeos e compostos fenólicos, respectivamente.

As imagens em microscopia de luz foram obtidas em fotomicroscópio Axiolab Zeiss.

3.3 Resultados

3.3.1 Distribuição e estrutura

Nos táxons estudados, numerosas cavidades secretoras estão distribuídas na região cortical do pecíolo de folhas jovens (Figs. 1A) e adultas (Figs. 1C-D, 3A). Em secção transversal e longitudinal, as cavidades são geralmente isodiamétricas, constituídas por células epiteliais achatadas (Fig. 1B).

Entretanto, as cavidades adjacentes freqüentemente se fusionam (Fig. 1C) formando estruturas alongadas, com lume de contorno irregular, as quais serão aqui tratadas como cavidades tubulares (Fig. 1D), uma vez que o comprimento das mesmas é relativamente menor ao dos ductos desta região.

Em todas as espécies, os ductos secretores são longitudinalmente alongados, ocorrendo em ápices vegetativos (Fig. 1E), no caule em desenvolvimento primário (Fig. 1G) e secundário e nas folhas jovens e adultas. Em todas as regiões, ductos contíguos se fusionam lateral e longitudinalmente. No primórdio foliar, os ductos foram observados exclusivamente em *T. speciosum* (Fig. 1F).

No caule das espécies, os ductos estão presentes no córtex e na medula (Fig. 1G, 1H). Adicionalmente, ductos associados ao floema secundário foram encontrados em *T. grandiflorum* (Fig. 3B) e *T. subincanum* (Fig. 3C). Os ductos da região medular apresentam distribuição similar nas três espécies, sendo um de posição central e os demais periféricos (ductos perimedulares), cujo epitélio secretor está envolvido por uma bainha uni a bisseriada de células achatadas com características meristemáticas (Fig. 1I).

Nas folhas jovens e adultas, os ductos estão localizados na região medular do pecíolo (Figs. 2A-C) e na nervura central do limbo (Figs. 2D-E). Em *T. speciosum*, além destas regiões, os ductos foram visualizados no mesofilo em associação com os feixes vasculares (Fig. 2J).

Os ductos da nervura central localizam-se na região cortical e medular (Figs. 2F-G, 4A-B). Em secção transversal, os ductos medulares possuem lume circular delimitado por células epiteliais achatadas (Fig. 2H), exceto em *T. speciosum*, na qual são elipsóides (Figs. 2I, 3F), sendo constatada em todas as espécies a presença de bainha semelhante à descrita para o caule (Fig. 4C). Os ductos corticais, por sua vez, são menos calibrosos, apresentando lume e células epiteliais com diferentes formas e tamanhos (Fig. 3E, 4D), distribuídos na face abaxial em *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, assim como, em ambas as faces de *T. speciosum*. Nas folhas adultas destas últimas espécies, a região cortical é parenquimática, observando-se próximo aos ductos uma faixa estreita de células achatadas com características meristemáticas (Fig. 4E), a qual está ausente em *T. grandiflorum*, cujo córtex é predominantemente esclerenquimático com ductos pouco numerosos.

3.3.2 Desenvolvimento e histoquímica

Os ductos são precocemente formados no ápice vegetativo, originando-se do meristema fundamental. Na nervura central das espécies foram observados conteúdo celular remanescente e células epiteliais inteiramente livres no lume dos ductos medulares (Figs. 4I, 4L) correspondendo à fase secretora em folhas adultas.

A secreção no lume das cavidades e ductos geralmente forma lamelações concêntricas, corando-se de roxo quando submetida ao azul de toluidina (Figs. 4A-E). Esta secreção é exclusivamente mucilaginosa reagindo positivamente ao vermelho de rutênio (Figs. 4F-H) e ao PAS (Figs. 4I-L).

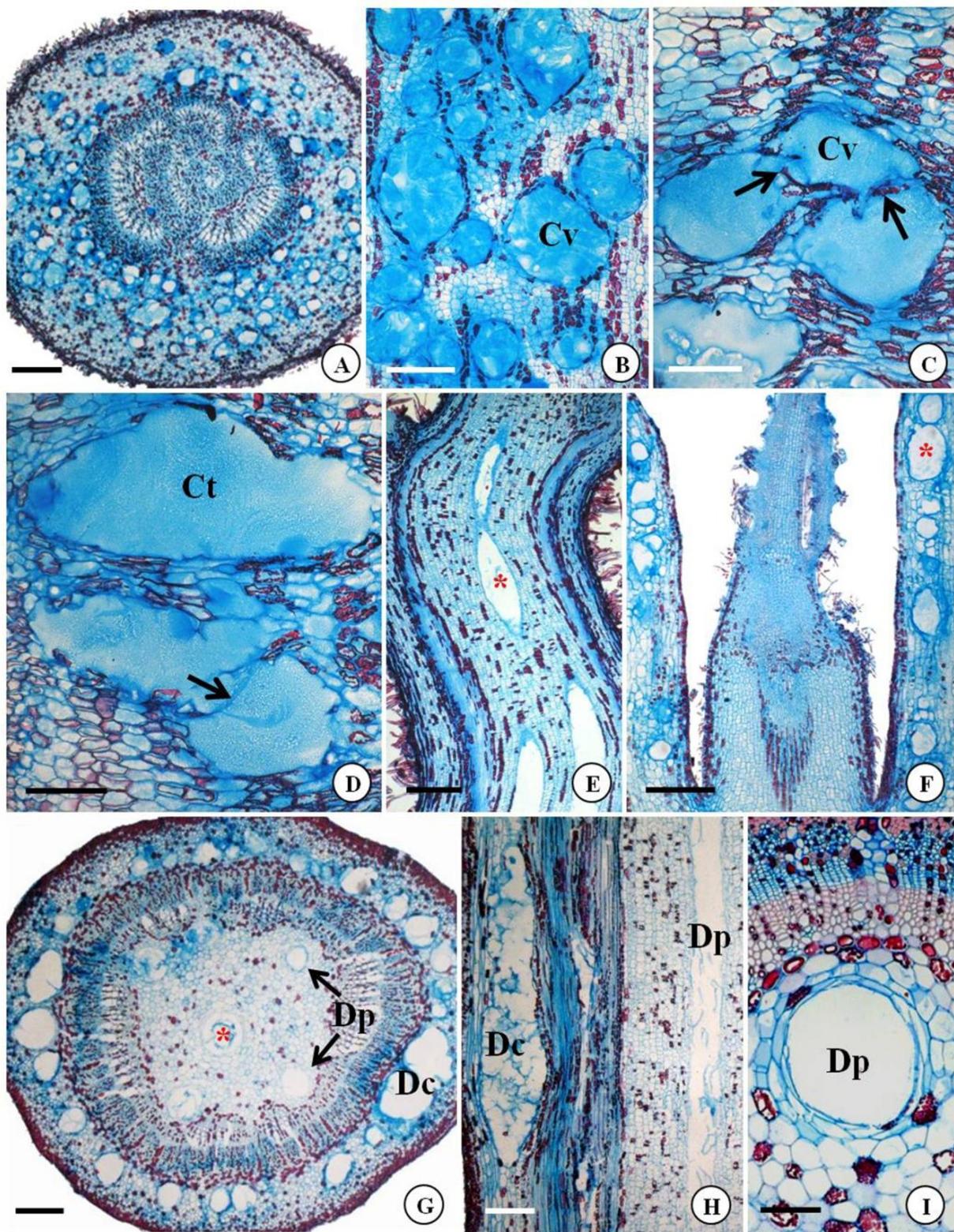


Figura 1 A-I: Cavidades e ductos mucilaginosos em *T. grandiflorum* (B, C, D, E e H), *T. speciosum* (F e I) e *T. subincanum* (A e G). A-D: Cavidades (Cv) na região cortical do pecíolo jovem (A e B) e adulto (C e D), notar resquícios de parede celular (setas) entre cavidades adjacentes que se fusionam formando cavidades tubulares (Ct). E-I: Ductos (*) no ápice vegetativo (E), no primórdio foliar (F) e no caule em desenvolvimento primário (G-I). G: Distribuição dos ductos corticais (Dc) e medulares de localização central (*) e periférica (Dp). I: Detalhe do ducto perimedular. Secções transversais: A, G e I; e longitudinais: B-F e H. Barras: A, E, G= 300µm; B= 40µm; C, D e F= 200µm; H e I= 100µm.

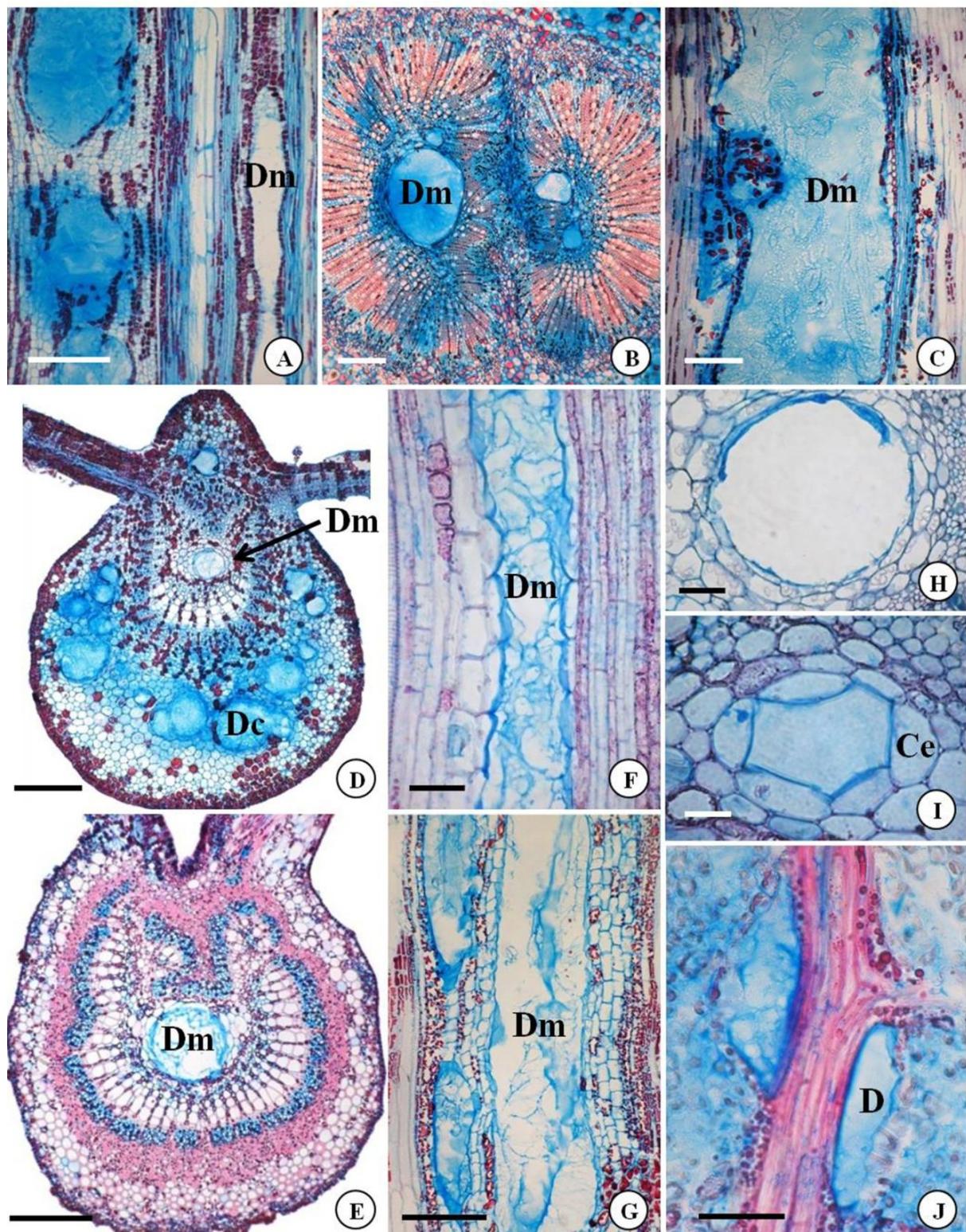


Figura 2 A-J: Ductos mucilaginosos nas folhas de *T. grandiflorum* (B e E), *T. speciosum* (A, D, F, I e J) e *T. subincanum* (C, G e H). A-C: Ductos medulares (Dm) no pecíolo jovem (A) e adulto (B e C). D-I: Nervura central da folha jovem (D) e adulta (E-I) evidenciando-se ductos corticais (Dc) e medulares (Dm). Em (I) notar células epiteliais elipsóides conspícuas. J: Ductos (D) associados aos feixes vasculares. Secções transversais: B, D, E, H e I; longitudinais: A, C, F e G; e paradérmica: J. Barras: A, E e G= 200 μ m; B= 300 μ m, C= 30 μ m; D= 40 μ m; F, C e H= 50 μ m; I= 20 μ m.

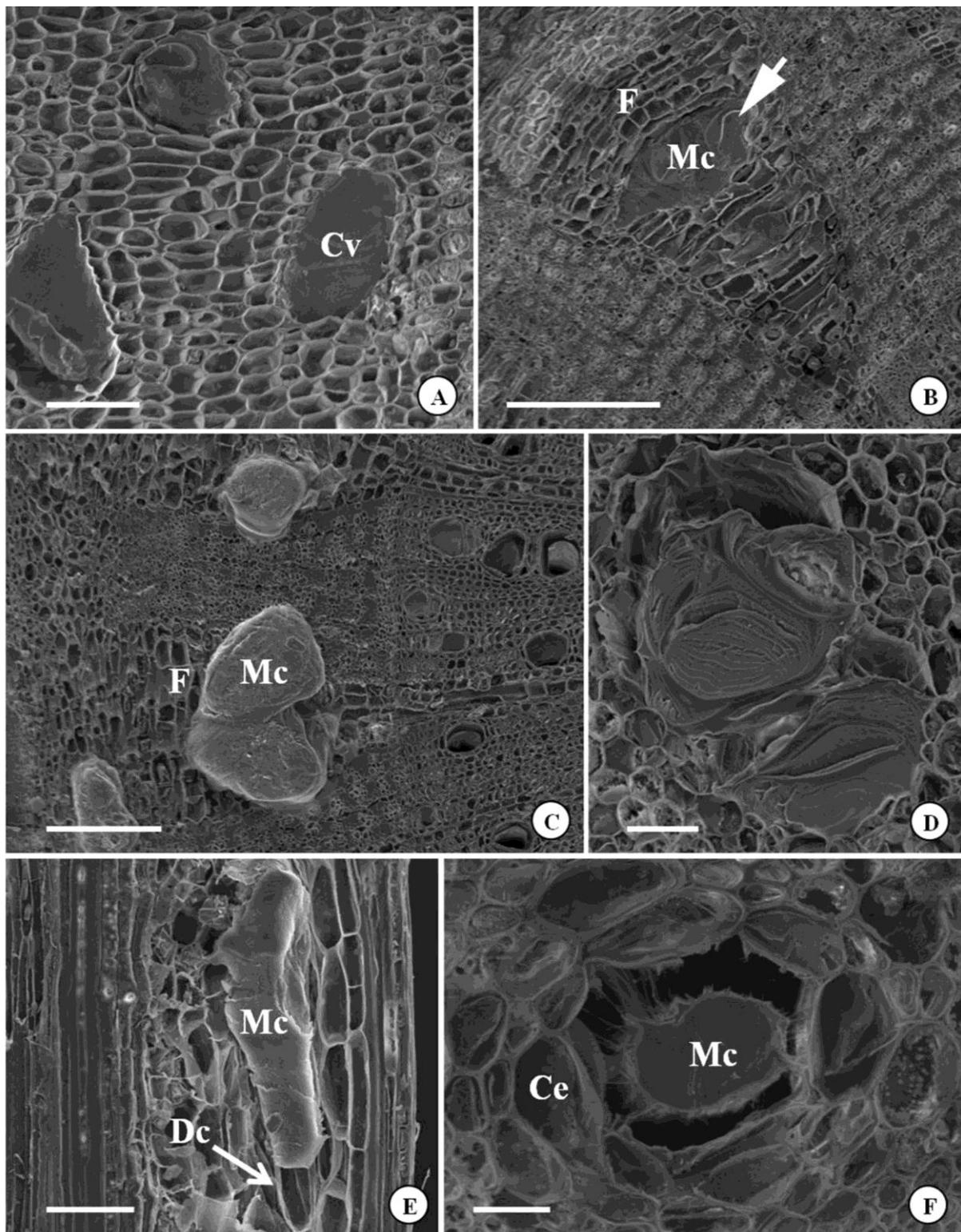


Figura 3 A-F: Cavidades e ductos com conteúdo mucilaginoso (Mc) em *T. grandiflorum* (B e D), *T. speciosum* (A, E e F) e *T. subincanum* (C). A: Cavidades (Cv) no pecíolo adulto. B-D: Ducto (seta) no floema (B e C) e no córtex (D) do caule em desenvolvimento secundário, com lamelações de secreção evidentes. E-F: Nervura central exibindo ducto cortical (E) e medular (F), neste último, notar células epiteliais elipsóides conspícuas. Dc: Ducto cortical. Secções transversais: B, C e F; e longitudinais: A, D e E. Barras: A= 100 μ m; B= 250 μ m, C= 180 μ m; D= 50 μ m; E= 60 μ m; F= 30 μ m.

Entretanto, o teste para mucilagens neutras reagiu negativamente. Substâncias lipídicas e fenólicas não foram encontradas na secreção, no último caso, verificado pela reação negativa ao cloreto férrico e análises do material fixado em SFF. Grãos de amido, cristais de oxalato de cálcio e compostos fenólicos foram ocasionalmente observados nas células epiteliais e da bainha.

3.4 Discussão

A secreção presente nas estruturas secretoras de *T. grandiflorum*, *T. speciosum* e *T. subincanum*, investigadas no presente estudo, é de fato mucilaginosa.

Estruturas secretoras de mucilagem foram relatadas por Metcalfe & Chalk (1950) em Malvaceae s.s., Bombacaceae, Sterculiaceae e Tiliaceae (atualmente circunscritas em Malvaceae s.l.).

Em *Theobroma*, até o momento, estas estruturas foram relatadas somente em órgãos reprodutivos, ocorrendo na forma de idиoblastos (Santos, 2003) e sacos (Martini *et al.*, 2003); e no eixo vegetativo aéreo de *T. cacao*, caracterizadas como canais (Nakayama *et al.*, 1996). Este estudo relatou, pela primeira vez, a ocorrência de cavidades e ductos secretores de mucilagem nos órgãos vegetativos aéreos de *T. grandiflorum*, *T. speciosum* e *T. subincanum*.

As cavidades secretoras encontradas nas espécies estudadas apresentaram variação morfológica, sendo adotada aqui a terminologia de Thadeo *et al.* (2009) para distinguir cavidades propriamente ditas, as quais possuem lume isodiamétrico e cavidades tubulares, constituídas por lume ligeiramente alongado, porém menores que os ductos.

As cavidades tubulares aqui observadas são formadas por meio da fusão de cavidades adjacentes, ampliando consideravelmente o lume destas estruturas. Este processo foi igualmente verificado entre ductos contíguos em todas as regiões analisadas. Em *Hibiscus pernambucensis*, Rocha *et al.* (2011) mencionaram que a fusão entre estruturas secretoras adjacentes resulta da lise de células que as separam, ao que denominaram de “degenerescênciа gomosa”.

Ductos localizados na periferia da medula podem ter origem do meristema fundamental ou procambial (Paviani & Jeronymo, 1992). Em todas as espécies, ductos perimedulares estão presentes na estrutura primária e secundária do caule, sendo originados a partir do meristema fundamental. A ocorrência destes ductos também foi evidenciada em *T. cacao* (Nakayama *et al.*, 1996), *Hibiscus* (Rocha & Neves, 2000; Rocha *et al.*, 2002) e *Pavonia alnifolia* A.St.-Hil. (Pimentel *et al.*, 2009).

Cavidades e ductos mucilaginosos em Malvaceae são originados por processos esquizógeno, lisígeno ou esquizolísígeno (Metcalfe & Chalk, 1950; Kubitzki & Bayer, 2003). Em *T. cacao* cavidades mucilaginosas lisígenas foram relatadas na raiz, caule, flores e folhas (Nussinovitch, 2010). Acredita-se que a formação dos ductos nas espécies estudadas é lisígena, uma vez que foram encontradas células

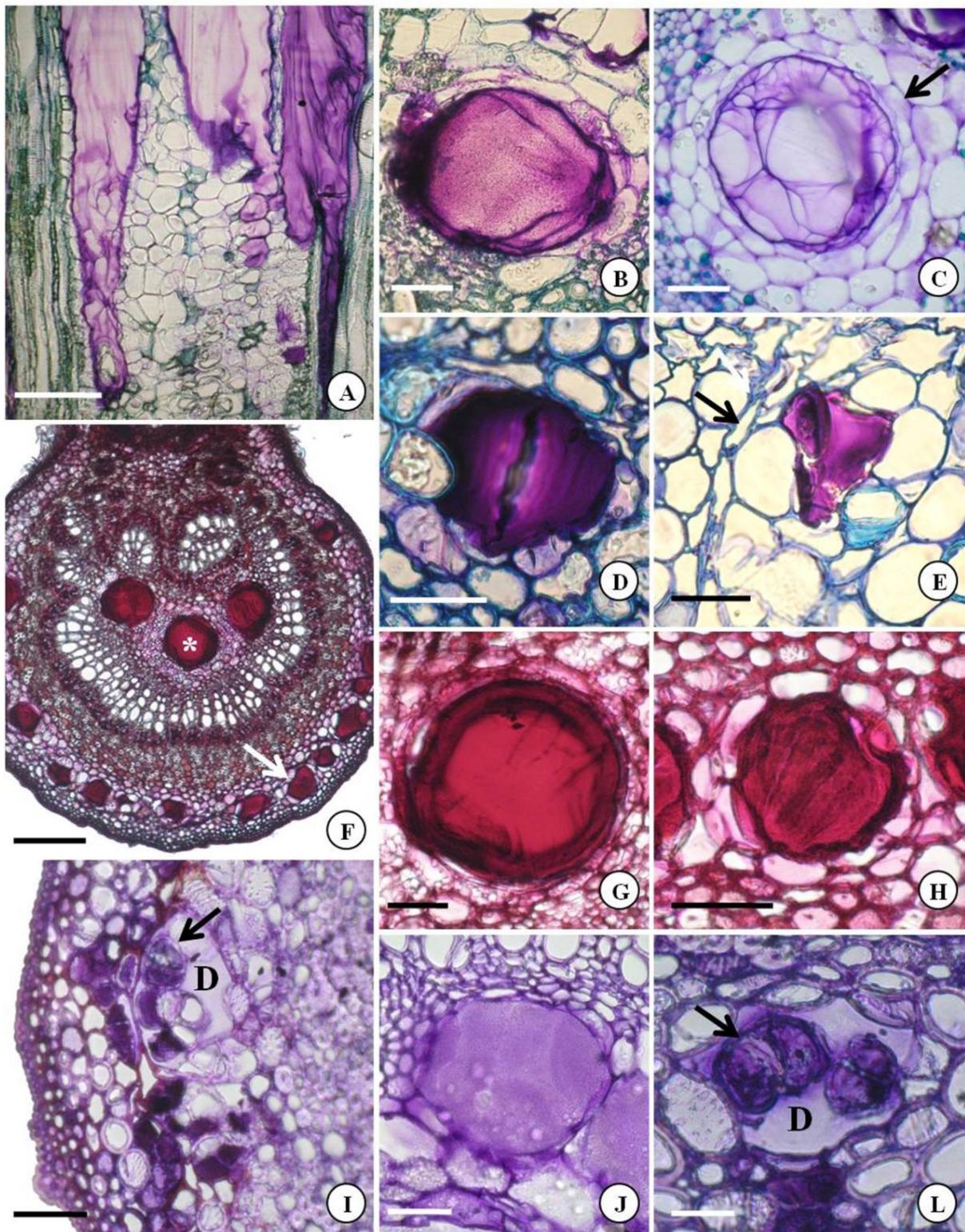


Figura 4 A-L: Ductos mucilaginosos na nervura central de folhas adultas de *T. grandiflorum* (I e L), *T. speciosum* (B, D e E) e *T. subincanum* (A, C, F, G, H e J). A-E: Mucilagem corada de roxo pelo azul de toluidina em ductos medulares (A-C) e corticais (D e E). Notar a bainha (seta) em torno do ducto medular (C) e a faixa de células achatadas (seta) próximo ao ducto cortical (E). F-L: Secreção exclusivamente mucilaginosa evidenciada pela reação positiva ao vermelho de rutênio (F-H) e ao PAS (I-L) no lume dos ductos medulares (*, G e J) e corticais (seta branca, H e L). As setas pretas indicam células epiteliais internalizadas no lume dos ductos, em vista geral (I) e em detalhe (L). Secção longitudinal: A e transversal: B-L. Barras: A= 200µm; B-E, G- I, L= 50µm; F= 100µm; J= 40µm.

epiteliais inteiramente livres no lume. Contudo, a lisogênese foi observada apenas na fase adulta da folha, somente a constatação em fases anteriores poderia afirmar se a origem é exclusivamente lisígena ou esquizo-lisígena.

Nos táxons estudados, a presença de bainha em torno dos ductos medulares e da faixa estreita de células meristemáticas associada aos ductos corticais, possivelmente, relacionada à renovação celular e à manutenção da atividade secretora em ductos com secreção holócrina, incorporando novas células ao epitélio secretor. Esta bainha também foi registrada em espécies de Anacardiaceae (Machado & Carmello-Guerreiro, 2001; Sant'anna-Santos *et al.*, 2006).

Nas espécies estudadas, a mucilagem presente nas cavidades e ductos é homogênea, composta exclusivamente por polissacarídeos ácidos. Em *Hibiscus pernambucensis* (Rocha *et al.*, 2011) e *Pavonia alnifolia* (Pimentel *et al.*, 2009), além de polissacarídeos ácidos, a secreção também contém polissacarídeos neutros e substâncias fenólicas.

A mucilagem geralmente está relacionada à retenção de água, contribuindo para a adaptação em ambientes xéricos, como é o caso das espécies anteriormente mencionadas. Contudo, esta função não se aplica às espécies estudadas, considerando-se que sua ocorrência natural e cultivo são realizados em ambiente com umidade relativa do ar e precipitação elevadas (Gondim *et. al.*, 2001).

Nas sementes de espécies de *Theobroma*, a síntese de mucilagem, lipídeos, proteínas, amido e polifenóis constituem as reservas cotiledonares (Martini *et al.*, 2008a; b). Nas espécies estudadas, a síntese de mucilagem pode estar associada à reserva de carboidratos no eixo vegetativo aéreo. A constituição essencialmente polissacarídica da secreção provavelmente está associada à nutrição dos abundantes afídeos encontrados nas folhas destas espécies, uma vez que substâncias fenólicas, com potencial anti-herbivoria, estão ausentes no exudato (Gondim *et al.*, 2001).

Embora as espécies estudadas tenham apresentado estruturas secretoras numerosas e bem desenvolvidas, são necessárias novas investigações para estabelecer uma relação entre a síntese de mucilagem e reserva de carboidratos no eixo vegetativo aéreo. Independentemente da função aparente, a mucilagem, neste estudo, representou uma característica conservativa no grupo estudado.

Agradecimentos

Ao CNPq pela Bolsa de Mestrado concedida à primeira autora. Aos Laboratórios de Anatomia Vegetal e Microscopia Eletrônica de Varredura do Museu Paraense Emílio Goeldi; e a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, pela assistência técnica.

3.5 Referências

- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.
- Fahn, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press, London.

Galina, K.J.; Sakuragui, C.M.; Rocha, J.C.B.; Lorenzetti, E.R. & Mello, J.C.P. 2005. Contribuição ao Estudo Farmacognóstico da mutamba (*Guazuma ulmifolia* - Sterculiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense** 24 (2): 225-33.

Gerlach, D. 1969. **Botanische Mikrotechnik: eine Einführung**. Stuttgart: Georg Thieme.

Gondim, T.M.S.; Thomazini, M.J.; Cavalcante, M.J.B; Souza & J.M.L. 2001. Aspectos da produção do cupuaçu. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Acre Documentos 67**.

Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book Co.

Kubitzki, K. & Bayer, C. 2003. **The Families and Genera of Vascular Plants. V. Flowering Plants. Dicotyledons. Malvales, Capparales and Non-betalain Caryophyllales**. Springer, Berlin.

Lersten, N.R. & Curtis, J.D. 1997. Leaf anatomy of *Dombeya* and *Nesogordonia* (Sterculiaceae), emphasizing epidermal and internal idioblasts. **Plant Systematics Evolution** 207:59-86.

Lillie, R.D. 1965. **Histopathologic techniques and practical histochemistry**. New York: McGraw Hill.

Machado, S. R. & Carmello-Guerreiro, S.M. 2001. Estrutura e desenvolvimento de canais secretores em frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Acta Botanica Brasilica** 15(2): 189-195.

Martini, M.H.; Lenci, C.G.; & Tavares, D.Q. 2003. Mucilage pockets in cotyledon tissue of *Theobroma speciosum*. **Acta Microscopica** 12(1): 65-69.

Martini, M.H.; Lenci, C.G.; Figueira, A. & Tavares, D.Q. 2008a. Localization of the cotyledon reserves of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum., *T. subincanum* Mart., *T. bicolor* Bonpl. and their analogies with *T. cacao* L. **Revista Brasileira de Botânica** 31(1): 147-154.

Martini, M.H.; Lenci, C.G.; Figueira, A. & Tavares, D.Q. 2008b. Polyphenolic cells and their interrelation with cotyledon cells in seven species of *Theobroma* (Sterculiaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 31(3): 425-431.

Metcalfe, C. F. & Chalk, L. 1950. **Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses**. Oxford: Clarendon Press.

Nakayama, L.H.I.; Soares, M.K.M. & Appenzato-da-Glória, B. 1996. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). **Scientia Agricola** 53(1).

Pimentel, R.R; Machado, S.R. & Rocha, J.F. 2011. Estruturas secretoras de *Pavonia alnifolia* (Malvaceae), uma espécie ameaçada de extinção. **Rodriguésia** 62(2).

Robards, A.W. 1978. **An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells.** In: **Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells.** J.L. Hall (eds.). New York, Elsevier.

Rocha, J.F. & Neves, L.J. 2000. Anatomia foliar de *Hibiscus tiliaceus* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae). **Rodriguésia** 51: 113-132.

Rocha, J.F.; Neves, L.J. & Pace, L.B. 2002. Estruturas secretoras em folhas de *Hibiscus tiliaceus* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda. **Revista Universidade Rural** 22: 43-55.

Sant'Anna-Santos, B.F.; Thadeo, M.; Meira, R.M.S.A. & Ascensão, L. 2006. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). **Revista Árvore** 30(3): 481-489.

Santos, S.F. 2003. **Estrutura e histoquímica de sementes do gênero *Theobroma* L. (Sterculiaceae).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.

Souza, M.S. & Venturieri, G.A. 2010. Floral Biology of Cacauhy (*Theobroma speciosum* - Malvaceae). **Brazilian Archives Biology Technology** 53(4): 861-872.

Thadeo, M.; Alves-Meira, R.M.S; Azevedo, A.A. & Araújo, J.M. 2009. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). **Revista Brasileira de Botânica** 32(2): 329-338.

Venturieri, G.A. & Ribeiro-Filho, A.A. 1995. A polinização manual no cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann). **Acta Amazonica** 25(3/4): 181-192.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo anatômico das espécies de *Theobroma* L. (Malvaceae s.l.), investigadas neste trabalho, possibilitou o conhecimento de estruturas, até então, tratadas de modo geral, como ocorrentes no gênero e na família.

No primeiro capítulo, baseando-se nas características dos tricomas glandulares, mesofilo e nervura central, foi possível estabelecer similaridades anatômicas entre espécies da mesma seção (*T. grandiflorum* e *T. subincanum*). O indumento das espécies foi interpretado como uma característica adaptativa para proteção contra herbivoria, baseando-se nos estudos de entomofauna típica do gênero, causadora de diversas patologias. Entretanto, estudos fitopatológicos são necessários para um melhor conhecimento desses mecanismos.

Até o momento, a ocorrência de tricomas glandulares e epiderme mucilaginosa no gênero foram citadas apenas em *T. cacao*. No referido capítulo, tricomas glandulares foram registradas pela primeira vez nas espécies estudadas, enquanto que a epiderme mucilaginosa constituiu uma característica distintiva em *T. speciosum*.

Embora a presença de cavidades e ductos secretores de mucilagem seja comum em Malvaceae s.l., esta característica foi pouco estudada nos gêneros da família. Nos órgãos vegetativos de *Theobroma*, estas estruturas foram relatadas somente em *T. cacao*. Neste estudo, as estruturas secretoras de mucilagem encontradas nas folhas e caule de *T. grandiflorum*, *T. speciosum* e *T. subincanum* são relevantes para estudos filogenéticos da família, tendo em vista sua recente reestruturação.

O segundo capítulo apresentou uma visão geral da distribuição das cavidades e ductos mucilaginosos no eixo vegetativo aéreo das espécies, sendo encontradas desde o início do desenvolvimento das folhas e caule.

Neste capítulo, foi verificado também que a atividade secretora se inicia precocemente no ápice vegetativo e permanece no caule e na folha em estádios de desenvolvimento posteriores. Esta manutenção da atividade secretora em estádios de desenvolvimento tardios foi relacionada à presença da bainha e da faixa meristemática associadas aos ductos.

Até o momento, o estudo respondeu às questões estruturais e histoquímicas. Dados ultraestruturais serão acrescentados para (re) formulações quanto ao processo de formação sugerido das estruturas secretoras.