

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA-UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

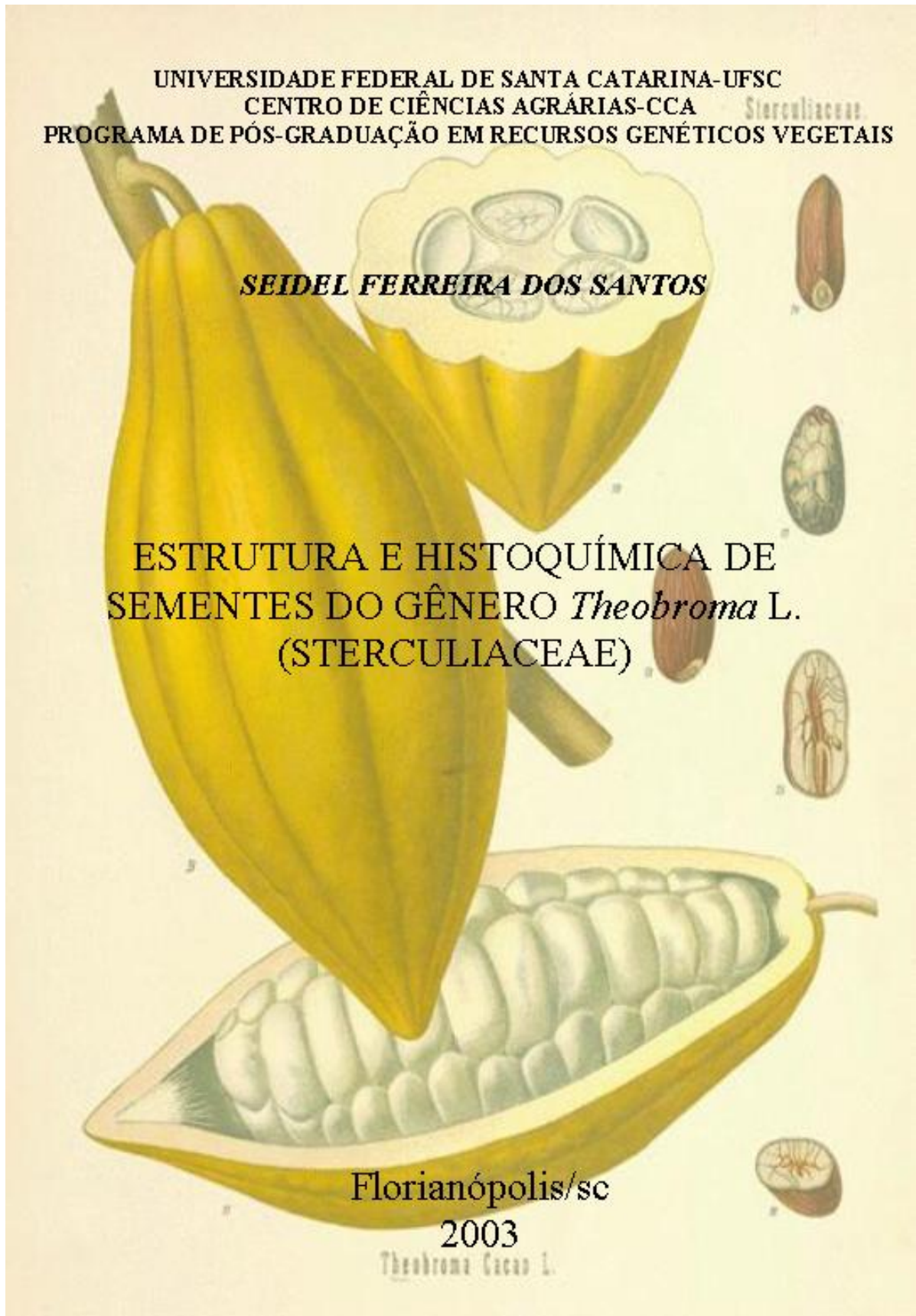
Sterculiaceae.

SEIDEL FERREIRA DOS SANTOS

ESTRUTURA E HISTOQUÍMICA DE
SEMENTES DO GÊNERO *Theobroma* L.
(STERCULIACEAE)

Florianópolis/sc
2003

Theobroma Cacao L.





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS- CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS**

SEIDEL FERREIRA DOS SANTOS

**ESTRUTURA E HISTOQUÍMICA DE SEMENTES DO GÊNERO
THEOBROMA L. (STERCULIACEAE).**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Santa
Catarina, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais para
obtenção do título de "Magister
Scientiae".

Orientadores: **Giorgini Augusto Venturieri- PhD.**
João de Deus Medeiros- DSc.

**FLORIANÓPOLIS/SC
2003**

**ESTRUTURA E HISTOQUÍMICA DE SEMENTES DO
GÊNERO *Theobroma* L. (STERCULIACEAE)**

SEIDEL FERREIRA DOS SANTOS

Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e Membros da
Comissão Examinadora.

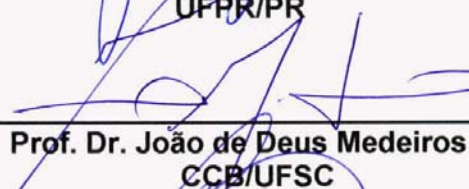
Comissão Examinadora:



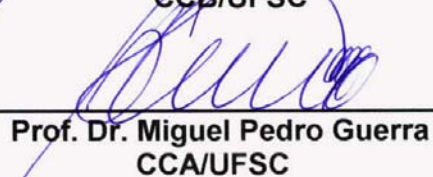
**Prof. Dr. Giorgini Augusto Venturieri
CCB/UFSC**



**Prof. Dr. Yedo Alquini
UFPR/PR**



**Prof. Dr. João de Deus Medeiros
CCB/UFSC**



**Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
CCA/UFSC**

Dedicatória

“Dedico este trabalho aos meus pais que tanto amo (José e Joaquina). Todo esforço seria inútil sem o amor incondicional de vocês, que sempre esteve presente em minha vida apesar da distância e do tempo”.

“Dedico à Dra. Raimunda Vilhena Potiguara, pela dedicação, carinho e amizade”.

***“Nenhuma outra vez a natureza concentrou, num espaço
Tão pequena tanta abundância de suas substâncias.
valiosas, como o fez na semente do cacau”.***

Alexander Von Humboldt (1769-1859)

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, meu eterno amigo e meu único conforto, que nunca me abandonou e fez com que meus pés suportassem a longa caminhada. Obrigado meu Deus pelo Dom da **VIDA** e por ter me dado serenidade e sabedoria!!!!!!!!!!

A minha família (José, Joaquina, Martha e Anderson) meu porto seguro, onde sei que sempre vou ser acolhido no final de cada jornada, obrigado pelo apoio moral e financeiro, fundamental para a realização deste trabalho, mas principalmente pelo amor que nos une a cada dia.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias pela oportunidade de realizar este curso.

Ao CNPq/Programa Trópico Úmido- PTU, processo CNPq N.º 469915/00-5 pelos recursos alocados para o desenvolvimento desta tese.

Ao professor Dr. Giorgini Augusto Venturieri do CCB/BEG pela orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho na UFSC.

Ao professor Dr. João de Deus Medeiros, Diretor do Centro de Ciências Biológicas, pela orientação sobre as análises anatômicas e sugestões valiosas.

À professora Dra. Zenilda L. Bouzon do CCB/UFSC que sempre me acolheu quando necessitei e pelos ensinamentos e orientação nas técnicas de microscopia e histoquímica.

Aos meus poucos e verdadeiros amigos que sempre torceram e confiaram em mim: Nilda Santos, Lenilze Carvalho, Celita Moreira e Silvana Melo.

Ao Erison Rodrigues meu amigo de sempre muito especial, pela força e amizade presente durante este trabalho.

A Fundação Botânica Margaret Mee- FBMM, pela bolsa concedida, para a finalização deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Giorgio Cristino Venturieri da Embrapa Amazônia Oriental, pelo auxílio na coleta em campo e elaboração do material fotográfico.

A Dra. Raimunda C. Vilhena Potiguara/MPEG, por ter mostrado o caminho da pesquisa científica.

A Pesquisadora Alba Lins, grande incentivadora e amiga sempre presente.

Ao Téc. Luís Carlos Lobato, pelo auxílio do material histológico.

Aos colegas do Departamento de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi, Eunice Macedo, Adalgisa Alvarez, Elielson Rocha, Léa Carreira, Regina Lobato e Hélen Sotão.

Aos amigos do mestrado Gunther Barbosa e Patrícia Flores, pela força e amizade.

A Msc. Márcia Stefani, pelo apoio no laboratório de Anatomia Vegetal e sugestões e principalmente pelo cafezinho de toda tarde.

Ao mestrando e amigo Márcio Silva pela ajuda, colaboração e ótima convivência.

As pessoas queridas que conheci na UFSC: Heloísa Neves, Leonardo David, Dra. Luciane Ouriques e Dra. Neci Moraes.

As bibliotecárias do Museu Paraense Emílio Goeldi Ana Maria, Fátima, Francileila, Graça e Edina.

A todas as pessoas que de uma forma ou outra contribuíram para a finalização desta obra.

Obrigado!

LISTA DE FIGURAS- CAPÍTULO I

Pag.

- FIGURA 01 Estrutura anatômica da semente madura de *T. cacao* L. **A-** semente em secção longitudinal; **B-** detalhe da semente em corte longitudinal, adaptado de AKISSUE & OLIVEIRA (1991). 40
- FIGURA 02 Coleção de frutos de *Theobroma* “Addison O’Neill”- Embrapa Amazônia Oriental/Belém-PA. 41
- FIGURA 03 *T. grandiflorum*. **A-** Planta cultivada; **B-** Aspecto geral do fruto; **C-** aspecto externo da semente; **D-** Semente em secção longitudinal. 42
- FIGURA 04 *T. obovatum*. **A-** aspecto da árvore; **B-** detalhe do fruto; **C-** fruto (corte longitudinal); **D-** fruto (corte transversal); **E-** semente (corte longitudinal); **F-** aspecto externo de uma semente. 43
- FIGURA 05 *T. speciosum*; **A-** aspecto geral da árvore; **B-** fruto (aspecto geral), **C-** fruto (corte transversal); **D-** semente (aspecto externo); **E** e **F-** semente em corte longitudinal (detalhe do embrião). 44
- FIGURA 06 *T. subincanum*. **A-** aspecto geral da árvore; **B,C, D-** detalhe do fruto (observar polpa de coloração branca); **E-** aspecto externo da semente. 45
- FIGURA 07 *T. obovatum* x *T. subincanum*. **A** e **B-** aspecto geral do fruto, **C-** Fruto em corte longitudinal; **D-** fruto em corte transversal; **E-** aspecto geral da semente; **F-** semente em corte longitudinal 46
- FIGURA 08 *T. grandiflorum*. **A-** superfície do tegumento externo (MEV); **B-** tricomas (tr) na epiderme externa (MEV); **C-** detalhe dos tricomas (tr) na epiderme externa do tegumento externo (MEV); **D-** Idioblasto com mucilagem em secção transversal (MEV); **E-** Idioblastos de mucilagem agrupados no tegumento externo; **F-** detalhe do idioblasto de mucilagem no parênquima do tegumento externo. 47
- FIGURA 09 *T. grandiflorum*. **A-** secção transversal evidenciando os feixes vasculares (fv) e a camada de células esclerificadas (seta), **B-** camada de células esclerificadas e epiderme interna do tegumento interno, **C-** células parenquimáticas do tegumento externo (MEV); **D-** parênquima cotiledonar mostrando células com compostos fenólicos (seta); **E-** superfície da epiderme interna do tegumento interno; **F-** células do parênquima cotiledonar (MEV). 48
- FIGURA 10 *T. grandiflorum*. **A-** Células do parênquima cotiledonar com núcleos (seta) bem evidenciados; **B-** idioblastos com conteúdo fenólico (seta); **C-** tricomas glandulares na epiderme cotiledonar; **D-** tricoma glandular com formação de pedúnculo. 49
- FIGURA 11 *T. grandiflorum*. **A-** Detalhe do eixo hipocótilo-radícula, células com conteúdo fenólico (seta). 50
- FIGURA 12 *T. obovatum*. **A-** Idioblastos de mucilagem no tegumento externo; **B-** detalhe da epiderme externa do tegumento externo.; **C-** Idioblastos de mucilagem no tegumento externo; **D-** parênquima cotiledonar (seta) MEV; **E** e **F-** eixo hipocótilo-radícula.; **G-** detalhe dos feixes vasculares (fv) no tegumento externo. 51
- FIGURA 13 *T. obovatum*. **A-** camada de células esclerificadas; **B** e **C-** cristais de oxalato de cálcio na superfície da epiderme interna do tegumento externo (seta) MEV; **D-** células do parênquima cotiledonar (evidenciando os núcleos e conteúdo fenólico); **E-** tricomas 52

- glandulares na epiderme cotiledonar com pedúnculo; **F**- detalhe dos tricomas glandulares sem formação de pedúnculo.
- FIGURA 14 *T. speciosum*. **A**- Idioblastos de mucilagem no tegumento externo; **B**- 53
parênquima do tegumento externo (MEV); **C**- detalhe das drusas nas
células parenquimáticas (seta); **D**- camada de células esclerificadas
(seta); **E**- camada de células esclerificadas (MEV); **F**- detalhe da
epiderme interna do tegumento interno (epi).
- FIGURA 15 *T. speciosum*. **A**- células do parênquima cotiledonar com compostos 54
fenólicos (seta); **B**- idioblastos com mucilagem (id) no parênquima
cotiledonar; **C**- idioblastos (id) agrupados no parênquima
cotiledonar; **D**- tricomas (tr) glandulares com haste longa na epiderme
cotiledonar; **E**- estômatos (seta) na epiderme cotiledonar.
- FIGURA 16 *T. subincanum*. **A**- superfície da epiderme externa do tegumento 55
externo MEV; **B**- saco de mucilagem (sm) no parênquima do
tegumento externo; **C**- sacos de mucilagem (seta) MEV; **D**- camada
de células esclerificadas (seta) e parênquima cotiledonar (pcot); **E**-
epiderme interna do tegumento interno (seta); **F**- cristais na epiderme
interna do tegumento interno (MEV).
- FIGURA 17 *T. subincanum*. **A**- parênquima cotiledonar; **B**- drusas na epiderme 56
cotiledonar (seta preta); **C**- tricomas (tr) glandulares na epiderme
cotiledonar; **D**- tricomas (tr) glandulares com pedúnculo.
- FIGURA 18 *T. obovatum* x *T. subincanum* **A**- secção, idioblastos de mucilagem 57
(seta grande), camada de células esclerificadas (seta menor) e
parênquima cotiledonar (pcot) MEV; **B**- células do parênquima
cotiledonar (pcot); **C**- células do parênquima cotiledonar evidenciando
grãos de amido (seta) MEV; **D**- camada de células esclerificadas (seta)
MEV.
- FIGURA 19 *T. obovatum* x *T. subincanum*. **A**- estruturas de reserva encontradas no 58
eixo hipocótilo-radícula (seta) MEV; **B**- células do parênquima
cotiledonar com núcleos evidentes (seta); **C**- drusas entre a epiderme
cotiledonar (seta menor) e feixes vasculares (fv); **D**- tricomas
glandulares na epiderme cotiledonar (tr).
- FIGURA 20 *T. grandiflorum* x *T. subincanum*. **A**- tricoma (tr) na epiderme externa; 59
B- detalhe do tricoma na epiderme externa (seta); **C**- idioblastos com
mucilagem no tegumento externo; **D**- células esclerificadas (seta); **E**-
feixes vasculares em secção longitudinal (fv) no parênquima; **F**- resto
de endosperma entre os cotilédones (seta).
- FIGURA 21 *T. grandiflorum* x *T. subincanum*. **A**- células do parênquima sub- 60
epidérmico (seta); **B**- drusas no parênquima (seta); **C**- tricomas
glandulares na epiderme do parênquima cotiledonar (seta); **D**-
tricomas glandulares na epiderme cotiledonar com formação de haste
longa (seta).
- FIGURA 22 *T. grandiflorum* x *T. obovatum*. **A**- epiderme externa do tegumento 61
externo (epe); **B**- Idioblastos com mucilagem no tegumento; **C** e **D**-
detalhe das células do parênquima; **E**- camada de células em paliçada
(seta).
- FIGURA 23 *T. grandiflorum* x *T. obovatum* **A**- tricoma glandular (tr) na epiderme 62
cotiledonar; **B**- tricoma estrelado na epiderme cotiledonar (seta); **C**-
células do parênquima cotiledonar (observar conteúdo fenólico) (seta).

LISTA DE FIGURAS - CAPÍTULO II

Pag.

- FIGURA 01 *T. grandiflorum*. **A** e **B**- células do parênquima cotiledonar PAS positivas (destacando grãos de amido (seta) e parede celular (cabeça de seta)); **C**- células do parênquima cotiledonar CBB positivas evidenciando núcleos (seta); **D**- região do eixo embrionário mostrando reação positiva ao CBB (seta); **E** e **F**- células do parênquima cotiledonar CBB positivas evidenciando corpos protéicos (seta) e corpos lipídicos (cl). 82
- FIGURA 02 *T. grandiflorum*. **A**- sacos de mucilagem no tegumento externo evidenciando reação metacromática ao AT-O (sm); **B**- sacos de mucilagem com reação positiva ao AB (sm); **C**- sacos de mucilagem no eixo hipocótilo radícula com reação metacromática ao AT-O (seta); **D**- sacos de mucilagem no eixo hipocótilo-radícula com reação positiva ao AB (seta). 83
- FIGURA 03 *T. subincanum*. **A**- Idioblastos com mucilagem no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O (sm); **B** e **C**- Idioblastos com mucilagem no tegumento externo (seta maior) e a região entre os cotilédones (seta menor) mostrando reação positiva ao AB; **D**- células do parênquima cotiledonar CBB positivas com pequenas granulações protéicas (seta). 84
- FIGURA 04 *T. subincanum*. **A**- células do parênquima cotiledonar com citoplasma positivo ao CBB e com idioblastos com corpos lipídicos (seta); **B**- células do parênquima cotiledonar evidenciando corpos protéicos (cabeça de seta); **C** e **D**- células do parênquima cotiledonar PAS positivas com reação na parede celular (cabeça de seta) e grãos de amido no citoplasma (seta maior). 85
- FIGURA 05 *T. speciosum*. **A**- Idioblastos com mucilagem no tegumento externo AB positivos (seta); **B**- Idioblastos com mucilagem no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O. 86
- FIGURA 06 *T. speciosum*. **A** e **B**- células do parênquima cotiledonar PAS positivas com reação na parede celular (cabeça de seta) e grãos de amido no citoplasma (seta); **C** e **D**- idioblastos no parênquima cotiledonar mostrando reação positiva ao AB (seta); **E**- idioblastos no parênquima cotiledonar com reação metacromática ao AT-O (seta); **F**- células do parênquima cotiledonar com reação positiva ao CBB (seta). 87
- FIGURA 07 *T. obovatum*. **A**- Idioblastos com mucilagem no tegumento externo com reação positiva ao AB (seta); **B**- Idioblastos com mucilagem no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O (seta); **C** e **D**- granulações protéicas no parênquima cotiledonar corados com CBB (seta); **E** e **F**- células do parênquima cotiledonar PAS positivas mostrando grãos de amido (cabeça de seta) e parede celular PAS positiva (seta maior). 88
- FIGURA 08 *T. grandiflorum* x *T. obovatum*. **A**- Idioblastos com mucilagem com reação positiva ao AB (sm); **B** e **C**- Idioblastos com mucilagem com reação metacromática ao AT-O (sm); **D**- Idioblasto com mucilagem no tegumento externo mostrando reação positiva ao AT-O (sm); **E**- células PAS positivas no parênquima cotiledonar mostrando grãos de amido (seta preta), parede celular (seta branca) e idioblastos com conteúdo lipídico (*); **F**- células do parênquima cotiledonar PAS positivas evidenciando grãos de amido (seta pequena) e parede celular (seta maior); **G**- células do parênquima cotiledonar positivas ao CBB, evidenciando corpos protéicos (seta). 89

- FIGURA 09 *T. subincanum* x *T. obovatum*. **A**- Idioblastos com mucilagem no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O (seta); **B**- região central do eixo embrionário com reação metacromática ao AT-O (*); **C**- Idioblastos com mucilagem no tegumento externo AB positivos (sm); **D**- região central do eixo embrionário AB positivo (*). **90**
- FIGURA 10 *T. subincanum* x *T. obovatum*. **A** e **B**- células do parênquima cotiledonar PAS positivas evidenciando parede celular (cabeça de seta) e grãos de amido (seta); **C** e **D**- células do parênquima cotiledonar mostrando reação positiva ao CBB (evidenciando algumas granulações protéicas e conteúdo celular) (seta). **91**
- FIGURA 11 *T. grandiflorum* x *T. subincanum*. **A** e **B**- Idioblastos com mucilagem no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O (sm); **C**- Idioblastos com mucilagem no tegumento externo com reação positiva ao AB (sm); **D**- detalhe dos Idioblastos com mucilagem agrupados no tegumento externo PAS positivas (sm). **92**
- FIGURA 12 *T. grandiflorum* x *T. subincanum*. **A**- células do parênquima cotiledonar (CBB positivas, com algumas granulações protéicas); **B** e **C**- células do parênquima cotiledonar (reação positiva ao PAS evidenciando parede celular e grãos de amido); **D**- detalhe dos idioblastos com mucilagem na região central do eixo embrionário (AT-O evidenciando forte reação metacromática). **93**

LISTA DE ABREVIATURAS

Azul de Alcian (Alcian Blue)-AB

Azul de Toluidina O (Toluidine Blue O)-AT-O

Coomasie Brilliant Blue (Azul Brilhante de Comassie)-CBB

Ácido Periódico de Schiff (Periodic Acid Schiff's)-PAS

Células esclerificadas (ce)

Compostos fenólicos (cf)

Citoplasma (ci)

Drusas (dr)

Epiderme externa (epe)

Epiderme interna (epi)

Feixes vasculares (fv)

Idioblastos (id)

Microscópio fotônico (MF)

Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Núcleo (N)

Nucléolo (Nu)

Parede celular (PC)

Parênquima cotiledonar (pcot)

Tricomas (tr)

Sacos de mucilagem (sm)

CRÉDITO DAS FIGURAS:

Figura 02-Giorgio C. Venturieri

Figura 03 A e C- Giorgini A. Venturieri

Figura 04-Giorgio C. Venturieri & Seidel Santos

Figura 05-Giorgio C. Venturieri

Figura 06-Giorgio C. Venturieri

Figura 07-Giorgio C. Venturieri

LISTA DE TABELAS		Pag.
Tabela 01	Estruturas anatômicas encontradas nas sementes maduras de <i>Theobroma</i> .	25
Tabela 02	Distribuição de substâncias de reserva em sementes	63
Tabela 03	Localização de substâncias de reserva em sementes de <i>Theobroma grandiflorum</i>	88
Tabela 04	Localização de substâncias de reserva em sementes de <i>Theobroma subincanum</i>	88
Tabela 05	Localização de substâncias de reserva em sementes de <i>Theobroma speciosum</i>	89
Tabela 06	Localização de substâncias de reserva em sementes de <i>Theobroma obovatum</i>	89
Tabela 07	Localização de substâncias de reserva em sementes de <i>T. grandiflorum</i> x <i>T. subincanum</i>	89
Tabela 08	Localização de substâncias de reserva em sementes de <i>T. grandiflorum</i> x <i>T. obovatum</i>	90
Tabela 09	Localização de substâncias de reserva em sementes de <i>T. subincanum</i> x <i>T. obovatum</i>	90

RESUMO:

O gênero *Theobroma* é bastante conhecido devido a espécie *Theobroma cacao* L., utilizada mundialmente na fabricação de chocolate. As espécies silvestres deste gênero são importantes por representarem um banco de genes que poderá vir a ser usado no melhoramento genético das espécies mais importantes economicamente, como o cacau (*T. cacao*) e o cupuaçu (*T. grandiflorum*). Diante da importância deste gênero para a região amazônica neste trabalho foram estudadas a anatomia e histoquímica de 4 das 22 espécies do gênero (*T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. speciosum* e *T. subincanum*) e de 3 de seus híbridos (*T. grandiflorum* x *T. obovatum*, *T. grandiflorum* x *T. subincanum* e *T. subincanum* x *T. obovatum*) desta forma contribuindo para o melhor conhecimento de espécies tropicais. Foram utilizadas técnicas usuais em anatomia e histoquímica para a identificação das principais estruturas e substâncias de reservas. Anatomicamente, podemos destacar os sacos de mucilagem no parênquima do tegumento externo, que contem grande quantidade de carboidratos e substâncias ácidas. As células do parênquima cotiledonar são ricas em carboidratos armazenadas na forma de grãos de amido. Uma camada de células, em paliçada, mostrou-se presente no tegumento interno de todas as espécies estudadas. Corpos protéicos foram identificados em células do parênquima cotiledonar. Os carboidratos de reserva foram identificados principalmente na formação da parede celular e como grãos de amido, geralmente arredondados de tamanhos e quantidade variáveis. O parênquima cotiledonar é o principal tecido de reserva. A anatomia do tegumento, quando comparada com a do cacau mostrou, que as espécies estudadas têm dificuldade de descorticação por estarem os cotilédones fortemente aderidos ao tegumento externo devido a forte compressão provocada pelo desenvolvimento dos cotilédones. No cacau existe um espaço natural entre a camada parenquimática do tegumento interno e a epiderme cotiledonar.

ABSTRACT:

The genus *Theobroma* is typically neotropical and is distributed in the tropical rain forest in the Western Hemisphere between lat. 18°N and 15°S. It is sufficiently known due to the species *Theobroma cacao* L., that is used world-wide in the manufacture of chocolate. The wild species of this genus are of extreme importance for representing a bank of genes, that could be used in the plantbreeding. In the Amazônia another important species is the *Theobroma grandiflorum*, that is employed in the manufacture of candies, juices and cosmetics, already reaching international markets. The aim of the present study was to investigate the anatomy and histochemical features of the seeds of *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma speciosum*, *Theobroma subincanum*, *Theobroma obovatum* and of 3 of its hybrids (*T. grandiflorum* x *T. obovatum*, *T. subincanum* x *T. obovatum*, *T. grandiflorum* x *T. subincanum*) of this form contributing for the best knowledge of tropical species, especially the Amazonian ones. Along with a structural investigation using histochemical methods, scanning electron microscopy and usual techniques in anatomy for the identification of the main structures and substances of reserves. Anatomically we can note mucilage sacs in outer integument, that will count to great amount of carbohydrate and acid substances. The cells of cotyledonary cells are rich in carbohydrate stored in the form of starch grains. A layer of palisade cells revealed present in the inner integument of all studied species. Protein bodies had been identified in cells of cotyledonary parenchyma, the carbohydrates of reserve had been identified mainly in the formation of the cellular wall and as supreme of starch. This grain generally is rounded off of changeable sizes and amount.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O GÊNERO THEOBROMA L.....	3
1.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ECOLOGIA.....	6
1.3. ESPÉCIES ESTUDADAS	8
<i>Theobroma grandiflorum (Willd. ex Spreng.) Schum.</i>	8
<i>Theobroma obovatum Klotzsch ex Bernoulli</i>	8
<i>Theobroma speciosum Willd.</i>	9
<i>Theobroma subincanum Mart.</i>	9
1.4. HÍBRIDOS ESTUDADOS	11
1.5. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO GÊNERO THEOBROMA L.	12
1.6. RECURSOS GENÉTICOS DAS ESPÉCIES AFINS AO CACAU.....	14
1.7. ESTRUTURA E IMPORTÂNCIA DAS SEMENTES.....	15
2. CAPÍTULO I.....	18
2.1. INTRODUÇÃO	19
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.2.1. <i>Material Botânico</i>	23
2.2.2. <i>Reparação Do Material Para Análise Em Microscopia De Fotônica</i>	23
2.2.4. <i>Preparação do material para análise em microscopia eletrônica de varredura (mev)</i>	23
2.3. RESULTADOS.....	24
2.4. DISCUSSÕES.....	30
2.4.1. <i>Anatomia Do Tegumento</i>	30
2.4.2. <i>Anatomia dos Cotilédones</i>	35
2.5. CONCLUSÕES.....	38
3. CAPÍTULO II.....	63
3.1. INTRODUÇÃO	64
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	68
3.2.1. <i>Histoquímica</i>	68
3.3. RESULTADOS.....	70
3.3.1. <i>Caracterização Histoquímica Das Sementes Maduras</i>	70
3.4. DISCUSSÃO.....	75
3.4.1. <i>Polissacarídeos Neutros</i>	75
3.4.2. <i>Polissacarídeos Ácidos</i>	76
3.4.3. <i>Proteínas</i>	77
3.5. CONCLUSÃO	80
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é considerada a maior floresta contínua tropical e detentora de um quarto da biodiversidade do planeta. Ocupa a segunda posição em termos de diversidade genética de espécies frutíferas tropicais no mundo e apesar disto ainda não apresenta uma posição de destaque no comércio internacional como acontece no sudeste asiático (CLEMENT *et al*, 1996). Este autor cita que apenas sete fruteiras nativas da Amazônia são consideradas domesticadas: *Rollinia mucosa* Baill (Annonaceae); *Bixa orellana* Linn (Bixaceae), *Poraqueiba paraensis* Ducke e *Poraqueiba sericea* (Sapotaceae); *Bactris gasipaes* Kunth (Arecaceae); *Paullinia cupana var. sorbilis* (Mart.) Ducke (Sapindaceae); *Pouteria caimito* Radlk (Sapotaceae); *Solanum sessiliflorum* Dun (Solanaceae). Outras 20 espécies seriam semi-domesticadas e 36 incipientemente domesticadas entre estas 2 do gênero *Theobroma* (*T. cacao* e *T. grandiflorum*), não resta dúvida que a falta de conhecimentos básicos sobre os princípios biológicos destas espécies contribuem para esta situação.

Na Amazônia o cultivo de plantas perenes começou com os nativos quando nas suas roças ao redor de suas malocas, cultivavam muitas plantas úteis como medicinais, condimentares, alimentícias e em especial frutíferas (DUCKE, 1946). Os indígenas da Amazônia, bem antes da descoberta da América já cultivavam muitas plantas tanto cosmopolitas quanto amazônicas. Entre estas últimas podemos citar duas importantes espécies do gênero *Theobroma*, tidas como culturas pré-colombianas, o cacau (*Theobroma cacao*) e o cacau-do-perú (*Theobroma bicolor*). Estas espécies assim como outras do gênero, sempre tiveram seu uso consagrado pelos povos amazônicos, no entanto apenas a espécie *T. cacao* é a mais difundida atualmente pois representa a matéria prima para a indústria chocolateira.

As sementes são fundamentais para o homem, não somente por representar o principal meio de propagação da maioria das angiospermas, mas por ser uma fonte importante de alimento (DUFFUS & SLAUGHTER, 1980).

As variações na estrutura das sementes das angiospermas e a consistência de certos caracteres em grupos afins permitem o seu uso na classificação das plantas. Os estudos da morfologia e anatomia, bem como os aspectos da germinação, maturação, dormência e de dispersão são também importantes para o melhor conhecimento das espécies (BELTRATI, 1994).

A literatura mostra que poucas referências existem sobre os aspectos da morfologia e anatomia de sementes de espécies tropicais e em especial de espécies amazônicas. Este trabalho teve como objetivos conhecer a estrutura anatômica e histoquímica das sementes de quatro espécies do gênero *Theobroma* e de três de seus híbridos mais promissores a fim de que se possa melhor conhecer a estrutura organizacional dos tecidos e conhecimento da biologia das espécies.

1.1. O GÊNERO THEOBROMA L.

A família Sterculiaceae Ventenat., tem cerca de 68 gêneros e 1.100 espécies com distribuição tropical ou subtropical e raramente em regiões temperadas. No Brasil, ocorrem 11 gêneros e cerca de 115 espécies (BARROSO, 1978).

SCHUMANN (1886), relacionou 8 gêneros desta família para o Brasil: *Sterculia* L., *Helicteres* L., *Ayenia* L., *Waltheria* L., *Melochia* Dill., *Byttneria* Loef., *Guazuma* Plum., e *Theobroma* L. Além destes, BARROSO (1978) acrescentaram os gêneros *Cola* Schott., *Brachychiton* Endl., *Herrania* Schum e *Abroma* L., passando de 8 para 12 gêneros ocorrentes no Brasil, dos quais quatro são exóticos (TARODA, 1980).

Os principais gêneros desta família do ponto de vista econômico são *Cola* e *Theobroma* (HEYWOOD, 1993).

O gênero *Theobroma* é tipicamente neotropical abrangendo cerca de 22 espécies, das quais 10 ocorrem na bacia amazônica (CUATRECASAS, 1964). Os maiores centros de diversidade da família Sterculiaceae estão nas regiões da Ásia, África, Américas do Sul e Central. Na América do Sul, a maioria das espécies ocorre na Amazônia, Colômbia, Peru, Venezuela e Guiana Francesa (TARODA, 1980, CUATRECASAS, 1964).

A primeira revisão sistemática para o gênero *Theobroma* L., foi realizada por CUATRECASAS (1964), onde o autor reconheceu 22 espécies. Seu trabalho foi baseado em coleções herborizadas e a análise seguiu o método clássico da morfologia comparativa, usando principalmente as características dos frutos e os caracteres vegetativos. A análise destas características resultou na divisão do gênero em seis secções: *Rhytidocarpus* com uma única espécie, *Theobroma bicolor*, secção *Oreanthes* com as espécies, *T. sylvestri*, *T. speciosum*, *T. velutinum*, *T. glaucum* e *T. bernoulli*; *Theobroma* com uma única espécie *T. cacao*; *Telmatocarpos* com as espécies, *T. glireri* e *T. microcarpum*; *Glossopetalum* com as espécies, *T. cirmolinae*, *T. stipulatum*, *T. simiarum*, *T. chocoense*, *T. angustifolium*, *T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. sinuosum*, *T. canumanense*, *T. subincanum*, *T. hylaeum* e *T. nemorale*; e a última secção, *Andropetalum*, com uma única espécie *T. mammosum*.

Baseando-se nos trabalho de SHUMANN (1895), CUATRECASAS (1964) apresentou de forma resumida as diferenças existentes entre *Theobroma* e os demais gêneros da família, em particular com *Herrania*, devido a similaridade dos frutos e a confusão que prevalecia desde o passado. Considerou *Herrania*, *Abroma*, *Guazuma* e *Byttneria* os gêneros mais próximos de *Theobroma* em função do número de cromossomos e da palinologia, a

qual forneceu subsídios valiosos para a determinação das afinidades de parentesco entre os taxon.

Outros trabalhos mais atuais utilizando técnicas de biologia molecular foram realizados afim de estabelecer as bases da filogenia do gênero, entre estes podemos citar : WHITLOCK & BAUM (1999) utilizou seqüência de DNA do gene de vinicilina extraído de proteínas de reserva em sementes; FIGUEIRA (1992); FIGUEIRA *et al* (1994) comprovaram a subdivisão de *Theobroma* em secções utilizando o gene do ribossomo (rDNA); SILVA (2000) estudou as relações genéticas de espécies brasileiras de *Theobroma* utilizando marcadores moleculares RAPD e dados bioquímicos.

As espécies de *Theobroma* são árvores que apresentam dimorfismo no caule e folhas; tronco emitindo ramificação simpodial com lançamentos adventícios ortotrópicos em disposição radial; ramos plagiotrópicos, monopodiais dorsiventrais. As folhas são simples, alternas, dísticas, coriáceas ou cartáceas com forma e tamanhos variáveis, lâmina ovada, oblonga, elíptico-oblonga ou lanceolada, simétrica ou assimétrica. obtusa ou arredondada; margem inteira, às vezes, a face superior geralmente glabra e lisa, a inferior densamente tomentosa; pêlos estrelados ferrugíneos em (*T. subincanum*) ou esbranquiçados em (*T. sylvestre*). Estas espécies apresentam sistema de nervação eucampódromo, nervura primária impressa na face superior, exceto em *T. sylvestre*, onde é bem evidente, nervuras secundárias alternas ou opostas, as vezes alternas e opostas na mesma folha. A inflorescência é cimosa, axilar nos ramos jovens, tronco e ramos, com algumas formando dicásio ramificado como em *Theobroma bicolor*, geralmente reduzida ou parcialmente a um monocásio do tipo circinado, de tamanhos variáveis, podendo apresentar de 1-9 râmulos, fasciculados. Flores arquiclamídeas, diclamídeas, actinomorfas. o fruto é uma drupa ou baga indeiscente com pericarpo lenhoso Os frutos podem ser elipsóides, globosos, ovóides, oblongos ou fusiformes, com as extremidades atenuadas, superfície lisa, sulcada, com cinco ou dez sulcos, rugosos ou verrucosos, após o amadurecimento os frutos podem cair ou permanecer na árvore. As sementes de *Theobroma* geralmente são envolvidas por uma camada de polpa comestível, designada por alguns autores como sarcotesta, variam em quantidade e teor de acidez e açucars. O número de sementes por fruto é variável entre 16-60, possuem a forma elipsóide, ovóide ou amigdalóide. A semente apresenta dois tegumentos (envoltórios seminais), dois cotilédones espessos e enrugados e um eixo embrionário bem desenvolvido (Figura 1). A epiderme cotiledonar apresenta geralmente tricomas glandulares, estipitados. As células cotiledonares apresentam um tecido celular rico em amido, gordura, aleurona,

tanino e alcalóide como a teobromina, quanto a cor, os cotilédones podem ser brancos, alguns são violáceos, avermelhados ou arroxeados. A germinação é epígea nas secções *Rhytidocarpus*, *Oreanthes* e *Theobroma* e nas secções *Telmatocarpus*, *Glossopetalum* e *Andropetalum* a germinação é hipógea (CUATRECASAS, 1964, CORNER, 1976; SILVA, 1998).

1.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ECOLOGIA

O gênero *Theobroma* L., é estritamente neotropical e está distribuído por todas as partes das florestas pluviais do hemisfério ocidental, entre as latitudes 18° norte e 15° sul (CUATRECASAS, 1964).

Segundo DUCKE (1953), a área geográfica espontânea para o gênero abrange a América tropical, do México até a Hiléia amazônica. O centro de origem está possivelmente no estado do Amazonas e partes adjacentes.

Segundo CUATRECASAS (1964) algumas espécies têm amplo alcance de distribuição como *T. subincanum*, que é difundida por toda as partes das bacias Amazônica-Orinoco.

O Brasil possui representantes de todas as secções que foram estabelecidas por CUATRECASAS (1964) com exceção de *Andropetalum*, que tem ocorrência apenas na Costa Rica, segundo o autor as espécies brasileiras ocorrem todas na Amazônia (*T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre*, *T. microcarpum*, *T. bicolor* e *T. cacao*).

Para o autor, a elevação dos Andes no Terciário, separou populações de *Theobroma*, anteriormente comuns, favorecendo a especiação pelo isolamento. Espécies vicariantes assim separadas são: *T. subincanum* (leste dos Andes) e *T. hylaeum* (oeste); *T. microcarpum* (leste) e *T. gileri* (oeste). Outro fator de isolamento foi a complexidade das montanhas da parte norte da Colômbia através da América Central, que favoreceu a especiação em partes do hemisfério onde o endemismo local ou regional está presente.

As informações referentes à dispersão natural das espécies de *Theobroma* são baseadas em levantamentos através de exemplares de coleções de herbário e relatos de expedições, mas para as espécies de uso pré-colombiano como *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. angustifolium* e *T. bicolor*, a dispersão parece ter sido influenciada pelo homem e não corresponde a distribuição original (CUATRECASAS, 1964; SMITH *et al*, 1992).

Segundo DUCKE (1953), as espécies de *Theobroma* que ocorrem espontaneamente, fazem parte da sub-mata, sendo que existe abundância em algumas espécies. Neste trabalho, chama de “cacaueiros” todas as espécies de *Theobroma*. Para o autor estas espécies ocorrem na mata pluvial das terras altas (“terra firme” na Amazônia Brasileira) assim também como nos chamados aluviões (“várzea”) que estão sujeitas as enchentes periódicas dos rios. Em florestas pode-se observar indivíduos isolados como *T. speciosum* ocupando a sombra da

copa de árvores maiores. (Observação pessoal feita na Floresta Nacional de Caxiuanã/Caxiuanã-Pará).

1.3. ESPÉCIES ESTUDADAS

THEOBROMA GRANDIFLORUM (WILLD. EX SPRENG.) SCHUM

Descrição:

Árvore da floresta tropical úmida, onde ocorre normalmente como um componente do extrato intermediário, no estado silvestre atinge 20 metros de altura. Em indivíduos cultivados o porte varia de 6 a 8 metros, com a copa em andares chegando a atingir 7 metros de diâmetro. O fruto desta espécie é uma baga drupácea com cerca de 12 a 25 cm de comprimento e de 10 a 12 cm de diâmetro, pesa em média 1.200g. A semente é obovóide, com superfície de coloração branco-amarelada, sendo envolvida por uma camada de polpa (parte comestível) de sabor ácido, cheiro característico e consistência fibrosa, em média 36 sementes por fruto, com aproximadamente 2,5 cm de largura e 0,9 cm de espessura, superpostas em cinco colunas em torno de um eixo central (Figura 3).

Nomes Populares:

O nome cupuaçu é originário da língua Tupi (kupu= que parece com o cacau + uasu = grande). Também é conhecido como cupú (estado do Pará até o Acre); pupu, pupuaçu (Maranhão até a Bahia); cacau cupuaçu (Bahia); cupuazur (Iquitos e Peru).

Distribuição e Ecologia:

As espécies silvestres foram observadas somente no estado do Pará no lado sul do Rio Amazonas, Tocantins, Xingú entre Vitória e Altamira. As árvores habitam a mata pluvial primária em terreno alto e acidentado. O cupuaçu é frequentemente cultivado por todo o estado do Pará e também na parte oriental do estado do Amazonas até Manaus. No Brasil, o seu cultivo tem sido expandido para o Nordeste brasileiro chegando até o litoral do estado de São Paulo.

THEOBROMA OBOVATUM KLOTZSCH EX BERNOULLI

Descrição:

Espécie que possui muita afinidade com *T. subincanum*, atinge até 10 m de altura, possui copa mais larga que as outras espécies, ramos delgados; as folhas são ovalado-elípticas ou ovalado-oblongas, mais ou menos estreitas e muito assimétricas, o fruto é

ovalado elipsóide, arredondado no ápice e estreito na base, com a coloração verde quando jovem, e verde amarelado quando maduro, com 5-7cm de comprimento e 3-4cm de largura. O pericarpo é delgado coriáceo com aspecto de casca granulosa (Figura 4).

Nomes populares:

A espécie *T. obovatum*, é conhecida vulgarmente como “cacau-cabeça-de-urubú”, “copu-ai”, “cupu-curúia”, “cupurana”, “cacau de macaco”, “urubú-acain” e “cabeça de umbu”.

Distribuição e Ecologia:

Esta espécie encontra-se frequentemente distribuída na sub-mata de várzea e de terra firme na metade ocidental da Amazônia. Os pontos mais orientais onde foi encontrado são: em Tefé (Rio Solimões); Rio Jaú, afluente do baixo Rio Negro; Rio Purús e baixo Acre e limite do Brasil com Peru e Colômbia.

THEOBROMA SPECIOSUM WILLD.

Descrição:

Árvore que pode alcançar 15 m de altura, frutos globoídes- elipsóide com cerca de 10 cm, com algumas depressões conspícuas; sementes elipsóide-oblonga com cerca de 24-26 mm, em número de 20 a 26 por fruto, recobertas por uma polpa de coloração clara e de sabor adocicado (Figura 5).

Nomes populares:

É conhecida vulgarmente como “cacaui”, “cacau”, “cacaarana”, “cacau da mata”, “cupurana”, “cacao azedo” (Brasil), “cacao sachá” (Peru), “chocolatillo” (Bolívia).

Distribuição e Ecologia:

Esta espécie habita as matas das terras altas da hiléia amazônica, dentro e fora dos limites do Brasil incluindo as Guianas. A leste, a espécie chega até a parte norte do Estado do Maranhão (Curupurú). As árvores da Amazônia são encontradas por toda a região, porém em parte alguma são freqüentes.

THEOBROMA SUBINCANUM MART.

Descrição:

Esta espécie foi descrita por Martius em 1830 em uma de suas excursões para o Brasil, ele observou e coletou espécies de *Theobroma* e relatou que mais espécies poderiam ser encontradas.

Árvore medindo entre 7-20 m de altura, tronco medindo cerca de 10-25cm de diâmetro; ritidoma marrom mais com lenticelas circulares, dispersas; casca quase lisa com 3mm de espessura. Folha simples alterna, dística, coriácea, curto-peciolada; pecíolo espesso, subcilíndrico, lâmina foliar com cerca de 15 a 40 cm de comprimento, oblonga ou elíptico-oblonga; ápice acuminado; base obtusa e margem inteira. O Fruto é uma drupa indeiscente, mesmo maduro não se desprende, secando na árvore, 7,3-11 cm de comprimento, 5,4-6,5 cm de largura, elipsóide-oblongo ou oboval; pericarpo coriáceo, rígido, 3-4 mm de espessura; epicarpo lenhoso 1-2mm de espessura, revestido de pêlos estrelados adpressos, marrons; sementes elipsóides-oblongas ou oval-elipsóide, 1,5-2cm de comprimento, 0,1-1,1 cm de largura; polpa doce, sem aroma, branca ou amarelada, comestível; pedúnculo do fruto 0,7-1,8 cm de comprimento, 0,5-1,1 cm de espessura (Figura 6).

Nomes populares:

No Brasil é conhecido como “Cupuí e Cupuaí”, na Colômbia, Venezuela e Peru é conhecido como Cacao-de-monte, Cacao-silvestre ou Cacaorana.

Distribuição e Ecologia:

Encontram-se registros da espécie nos estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima, Rondônia, Mato Grosso e Amapá. Ocorre também na Amazônia do Peru, Venezuela, Colômbia, Equador, Suriname e Guiana Francesa. A espécie é bastante encontrada na floresta tropical úmida, nas sombras, em terrenos baixos não inundáveis, em solo rico e úmido, em terrenos arenosos e ao longo de pequenos rios.

1.4. HÍBRIDOS ESTUDADOS

T. subincanum x T. obovatum

As flores deste híbrido apresentam características intermediárias à das espécies parentais. Pode ser identificado comparando-se sua flor, que se mais assemelha à de *T. obovatum*. Os frutos são semelhantes a *T. obovatum* quanto à forma, sendo um pouco mais alongados (Figura 7) estes quando não colhidos permanecem na árvore e secam.

T. grandiflorum x T. subincanum

Árvore grande, os frutos são um pouco maiores que os frutos de *T. subincanum*, seu aspecto geral assemelha-se ao *T. grandiflorum* no que se refere ao formato e coloração do pericarpo. Os frutos não se desprendem da árvore quando maduros, são mais parecido com os frutos de *T. grandiflorum*. Algumas folhas se destacam pelo comprimento e largura; em relação às outras espécies. As flores são semelhantes a *T. grandiflorum* na forma e na cor.

T. grandiflorum x T. obovatum

Árvore é muito semelhante ao *T. grandiflorum*, podendo ser identificada através das características de suas flores, que possuem características intermediárias entre os pais. Este híbrido tem produzido uma grande quantidade de frutos de tamanho que se aproximam ao de *T. obovatum*, o número de sementes parece ser intermediário. Uma característica importante é que este se apresenta resistente ao ataque de “vassoura de bruxa”.

1.5. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO GÊNERO THEOBROMA L.

As sementes de *Theobroma* são ricas em amido (15%), proteína (15%) e óleo (50%), por esta razão são consideradas um alimento substancial (CUATRECASAS, 1964). O mesmo autor ressalta a presença de um óleo volátil (essência de cacau) que confere um “flavor aromático”, além de possuir 1,5 à 3% de teobromina, um alcalóide estimulante do sistema nervoso central com propriedades semelhantes à cafeína.

A cafeína também está presente nas sementes de *Theobroma*, ambos alcalóides foram encontrados nas sementes e folhas de *T. bicolor*, *T. cacao*, *T. microcarpum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. sylvestre* (CUATRECASAS, 1964). Sendo que em *T. grandiflorum* não foi encontrado o alcalóide cafeína e sim o ácido 1,3, 7, 9- tetrametilúrico, sugerido como um precursor da cafeína (BAWMANN & WANNER, 1980).

Todas as espécies amazônicas do gênero *Theobroma* (podemos citar: *T. cacao*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. grandiflorum*, *T. bicolor*) produzem frutos comestíveis de cujas sementes pode-se produzir chocolate (CUATRECASAS, 1964; VENTURIERI, 1994).

As sementes de *T. cacao*, são geralmente pigmentadas por tanino (vermelho a roxo), com pequenas quantidades de ácido málico e tartárico. Outras espécies são usadas por comunidades tradicionais, como o cacau-do-peru (*T. bicolor*), encontrado no Rio Negro e em povoações na parte Oeste do Solimões. O cacau-de-mico (*T. angustifolium*) na Costa Rica e no México, tem suas sementes cultivadas e misturadas ao cacau verdadeiro na fabricação do chocolate (SMITH *et al.*, 1992).

A importância deste gênero para a região amazônica deve-se principalmente ao cacau (*T. cacao* L), que já tem seu valor comercial reconhecido (indústria de chocolate e cosméticos) e o cupuaçu (*T. grandiflorum* (Willd ex Spreng.) Schum.). O cupuaçu é considerada a fruteira mais promissora da Amazônia, pelo seu sabor exótico e que atualmente vem conquistando o mercado de outras regiões do Brasil e do exterior. O elevado preço de mercado impulsionou uma frenética expansão do seu plantio em escala comercial com um excedente de produção de amêndoas expressivo. Somente a Cooperativa Agrícola de Tomé-Açú - CAMTA, no ano 1998, produziu naquela safra 400 t de amêndoas secas. Considerando ser aquela cooperativa a maior do estado, agregando cerca de 10% da produção de cupuaçu do estado do Pará, estimou-se que cerca de 4.000 toneladas de amêndoas secas foram produzidas naquele estado VENTURIERI (1999).

As sementes de cupuaçu podem ser utilizadas na fabricação de chocolate muito semelhante ao feito com sementes de cacau (*T. cacao*) e com a vantagem de não possuir teobromina, um alcalóide estimulante, que pelos valores atuais para a dieta humana, tem tido o seu uso desaconselhado (VENTURIERI, 1993). A utilização do cupuaçu como matéria prima para o chocolate e derivados, seria uma ótima alternativa, uma vez que devido aos altos preços alcançados pelo cacau e seus derivados, tem aumentado a procura por produtos que possam substituir a manteiga do cacau na fabricação de chocolate. Embora a legislação brasileira, assim como da maioria dos países desenvolvidos, proíba a adição de outras gorduras estranhas ao chocolate, (ex: coco, algodão, palma e soja) esta tem sido praticada por força de mercado, pressionado pelo alto preço atual da gordura de cacau.

1.6. RECURSOS GENÉTICOS DAS ESPÉCIES AFINS AO CACAU.

A conservação dos recursos genéticos das espécies amazônicas do gênero *Theobroma*, é de extrema importância uma vez que consiste no reservatório de genes para a espécie *T. cacao*. A preservação de germoplasma pode ser feita através de repositórios ativos de germoplasma, em coleções *ex situ* e/ou *in situ*, que quando apropriadamente manejados podem preservar o potencial evolutivo das espécies (DEBOUCK, 1993 *apud* VENTURIERI, 1998). As sementes de *Theobroma* assim como a maioria das sementes de espécies tropicais são recalcitrantes tornando assim a conservação *in situ* a melhor alternativa.

Atualmente os dois principais bancos ativos de germoplasma de espécies afins ao cacau são a coleção “George Basil Bartley”, pertencente a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira- CEPLAC no município de Ananindeua - PA e a coleção “George Addison O’Neill” pertencente a Embrapa Amazônia Oriental- CPATU, na cidade de Belém - Pará.

A possibilidade de produção de híbridos interespecíficos entre o cacau (*Theobroma cacao* L.) e suas espécies afins nos programas de melhoramento faz crescer os estudos com espécies do gênero principalmente visando a produção de material comercial resistente à vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo (*Crinipellis pernicioso*), principal responsável pelo declínio da lavoura cacaueira, e com alto teor de gordura.

1.7. ESTRUTURA E IMPORTÂNCIA DAS SEMENTES

Anatomia ou morfologia interna dos órgãos vegetais é uma fonte clássica de dados usados na sistemática e classificação de plantas, estas informações anatômicas são extremamente úteis na definição de relações filogenéticas (STUESSY, 1991).

O termo semente é geralmente usado para designar o conjunto formado por um esporófito jovem, o embrião (em algum estágio de desenvolvimento), um tecido de reserva alimentar, o endosperma (algumas vezes o perisperma ou parte do próprio embrião) e um envoltório protetor (BELTRATI, 1994).

A maioria dos botânicos concorda que o evento mais significativo na conquista do meio terrestre pelas plantas vasculares foi o aparecimento da semente (BELTRATI, 1994). Além de ser a unidade reprodutiva das espermatófitas e servir de elo entre as gerações sucessivas, outra importante função esta relacionada com a dispersão e sobrevivência no frio e na seca ou outras condições adversas (BOESEWINKEL & BOUMAN, 1984).

A semente é o principal meio de propagação da maioria das espécies de Fanerógamas, é resultado de uma série de eventos biológicos que começa com a floração e termina com a germinação. Em sentido amplo é toda estrutura que serve para produzir um vegetal e constituída de tegumentos, quantidade variável de endosperma (ou nenhum) e embrião, constituído por um eixo que apresenta em um extremo a radícula e no outro a plúmula (primórdios foliares). Na ausência do endosperma, o tecido de reserva está no próprio embrião (ESAU, 1974).

O aparecimento das sementes teve enorme impacto sobre os outros organismos, permitindo que houvesse co-evolução com vários grupos de insetos polinizadores, aves, mamíferos e insetos predadores que passaram a incorporar as sementes em seu hábito alimentar. A espécie humana provavelmente deve ter sido a última a estabelecer uma íntima relação com as plantas seminíferas, em uma fase crucial de sua evolução cultural, quando iniciou a prática da agricultura (BELTRATI, 1994).

Além do significado biológico das sementes no ciclo de vida das plantas, elas são extremamente importantes na cadeia alimentar do homem e dos demais animais, dentre as diversas partes da planta, as sementes são as mais valiosas para o homem. As sementes, através das reservas armazenadas no endosperma ou nos cotilédones, constituem o mais importante tipo de alimento devido principalmente ao seu alto valor alimentício. Cerca de

90% de todas as sementes cultivadas são cereais, principalmente arroz, trigo e milho (BELTRATI, 1994).

Segundo CORNER (1976), as estruturas das sementes podem ser muito úteis no estabelecimento de relações filogenéticas entre taxas, no entanto é essencial que a delimitação do número de envoltórios estejam bem estabelecidos.

As estruturas morfológicas de um embrião maduro, assim como a posição que ocupa na semente diferem entre os grupos de plantas e podem ser utilizadas com segurança para a identificação de famílias, gêneros e até espécies (FERREIRA *et al*, 2001).

O tegumento da semente é um dos principais condicionantes da germinação, do vigor e da longevidade das sementes. A compreensão de suas estruturas e propriedades pode contribuir para explicar, antecipar ou alterar o comportamento das sementes sob determinadas condições ambientais. Grande parte das características dos tegumentos estão associados com os problemas apresentados pelas sementes. Assim por exemplo, susceptibilidade a danos mecânicos está associada ao seu teor de lignina, enquanto que longevidade e potencial de deterioração no campo têm sido relacionados ao grau de permeabilidade dos tegumentos (FERREIRA *et al*, 2001).

Muitas funções são atribuídas ao tegumento das sementes: um dos principais condicionantes da germinação, do vigor e de longevidade; atua na proteção contra a dessecação; danos físicos e biológicos; atua como tecido de reserva temporário e participa das trocas gasosas (WERKER, 1997; SOUZA & MARCOS-FILHO, 2001). Sendo assim fica claro que a compreensão da estrutura anatômica do tegumento das sementes pode contribuir para a elucidação de problemas de ordem taxonômica e agrônômica.

Há uma imensa diversidade no aspecto externo e na estrutura das sementes. Tais diferenças são, em grande parte relacionadas as estratégias de dispersão e de germinação, podendo envolver o tamanho e a posição do embrião e do endosperma, a estrutura, a textura e a cor do tegumento da semente, bem como a forma e as dimensões da semente como um todo (BELTRATI, 1994).

TIFFNEY (1984), ao tratar em seu trabalho sobre a evidência e hipóteses sobre a ascensão das angiospermas, considera muito importante a semente, e relaciona o seu tamanho com a “síndrome de dispersão”. Para o autor frutos e sementes são a maior fonte de informações no registro fóssil das angiospermas particularmente desde o terciário (TIFFNEY, 1977). O mesmo autor fala do sistema de proteção desenvolvido pelas sementes, através da lignificação de suas paredes, predispondo o órgão a proteção. As técnicas de

microscopia fotônica e eletrônica (MEV e MET) são ferramentas bastante usadas em estudos de morfologia. Pesquisas recentes mostram que o uso de MEV, pode fornecer características estáveis, de grande significância para a sistemática e evolução, especialmente naquelas sementes que são relativamente pequenas que mostram poucos caracteres através de métodos tradicionais de investigação.

CORNER (1976) publicou um extenso tratado contendo muitos dados novos e originais sobre sementes de dicotiledôneas, dedicando-se á memória de Netolitzky. Neste seu trabalho, Corner afirma que Netolitzky esteve próximo de descobrir que a estrutura da semente poderia ser a base da classificação natural das plantas floríferas e que os seus passaram despercebidos aos grandes expoentes da classificação.

Segundo NETOLITZKY (1924) toda família de dicotiledônea tem um tipo característico de semente, o que foi também confirmado por (CORNER,1976) sendo de extrema importância o conhecimento desta diversidade de formas. Trabalhos referentes a morfologia e anatomia de espécies amazônicas não são muito freqüentes, com relação ao gênero *Theobroma*, CUATRECASAS (1964), fez considerações sobre o aspecto morfológico das sementes, classificando-as como sementes de cotilédone espesso, corrugado-plicado, embrião reto, radícula cilíndrica, inferior; germinação epígea ou hipógea. OLIVEIRA & AKISSUE (1998) descrevem a estrutura anatômica de *T. cacao*, como forma de contribuição aos estudos farmacognósticos. LENCI (2002) realizou uma análise histológica e citoquímica dos tecidos de reserva de *T. cacao*, *T. microcarpum* e *T. obovatum*.

2. CAPÍTULO I

ASPECTOS ESTRUTURAIS E ANATÔMICOS DE SEMENTES DO GÊNERO *THEOBROMA* L. (STERCULIACEAE).

RESUMO-(Aspectos estruturais e anatômicos de sementes do gênero *Theobroma* L. - Sterculiaceae). *T. grandiflorum*, *T. speciosum*, *T. subincanum* e *T. obovatum* são espécies silvestres afins ao cacau (*T. cacao* L.), de grande interesse para o seu melhoramento genético. As informações sobre a estrutura das sementes de espécies amazônicas são relativamente escassas. Neste trabalho são apresentados estudos anatômicos de tais espécies e de três de seus híbridos mais promissores. Foram utilizadas técnicas usuais de anatomia vegetal e microscopia (Fotônica e Eletrônica). As espécies estudadas são semelhantes quanto à estrutura do tegumento e no padrão das células do parênquima cotiledonar. Anatomicamente, distinguem-se pela disposição dos estratos celulares dos envoltórios seminais. Foi determinada a presença de sacos de mucilagem no tegumento externo de todas as espécies e no parênquima cotiledonar de *T. speciosum*. A presença de uma camada de células em paliçada no tegumento interno a diferenciam de outras espécies da família.

PALAVRAS CHAVES: idioblastos, sacos de mucilagem, tricomas glandulares.

2.1. INTRODUÇÃO

Vários autores apontam a falta de conhecimento das estruturas das sementes de espécies florestais, principalmente tropicais. Tratando-se de espécies amazônicas estas informações tornam-se ainda mais limitadas. CRESTANA & BELTRATI (1988), ressaltam que muitos dos princípios biológicos e informações sobre sementes são relativos a espécies de florestas temperadas e não servem para os trópicos. Dessa forma cresce a necessidade de realizar estudos de morfologia e anatomia para melhor se conhecer a biologia destas espécies.

As principais contribuições para o conhecimento atual da estrutura do tegumento das sementes das angiospermas se devem aos trabalhos de NETOLITZKY (1926) e CORNER (1976).

O desenvolvimento dos tegumentos das sementes tem início no momento em que o óvulo é fecundado mas a forma como este desenvolvimento ocorre fornece um conjunto de características da espécie importantes na caracterização da estrutura da semente madura (CORNER, 1976; BELTRATI, 1994). Estes autores, ressaltam a importância e significância taxonômica e ecológica destas características nas dicotiledôneas, no entanto sugerem estudos do óvulo e de ontogenia, pois estruturas aparentemente idênticas podem ter origens ontogênicas diversas.

A denominação “testa” tem sido utilizada para designar o envoltório da semente como um todo, embora na classificação de CORNER (1976), seja referido para o tegumento externo.

Embora alguns trabalhos, utilizando técnicas de biologia molecular, tenham sido realizados a fim de tentar estabelecer a biosistemática do gênero *Theobroma* (WHITLOCK & BAUM, 1999; FIGUEIRA, 1992; FIGUEIRA *et al*, 1994; SILVA, 2000); as contribuições sobre os aspectos estruturais das sementes deste gênero, a partir dos trabalhos de anatomia e morfologia, continuam sendo de importância na sistemática de Sterculiaceae e do gênero *Theobroma*.

CORNER (1976) menciona que na família Sterculiaceae, as sementes são pequenas a largas, a testa geralmente com menos camadas que o tégmem, ambos com várias camadas de células, endotesta e endotégmen com ou sem cristais, óvulos mais ou menos eretos ou transversais.

O primeiro trabalho que abordou a morfo-anatomia de uma espécie do gênero *Theobroma* foi realizado por CUATRECASAS (1964) onde ele descreveu a espécie *Theobroma cacao* L. Posteriormente CORNER (1976) fez uma abordagem mais completa, descrevendo características anatômicas desde o desenvolvimento do óvulo, e fazendo também inferências para outros gêneros da família Sterculiaceae.

BARROSO (1999) e CORNER (1976) descreveram como características gerais para as sementes de *Theobroma*, a presença de dois tegumentos (testa e tégmen), um embrião axial com formato elipsóide, cotilédones espessos, densos e dobrados em torno do eixo hipocótilo-radícula.

CUATRECASAS (1964), descreveu as sementes de *Theobroma* da seguinte forma: uma testa geralmente espessa e subcoriácea, com uma epiderme externa coberta por uma cutícula espessa, uma camada espessa de células poliédricas e mucilaginosas e uma camada reduzida de células esclerificadas. O mesmo autor cita que o tegumento interno é uma fina membrana de várias camadas de células achatadas e paredes finas. Quanto ao embrião o autor se refere como largo, formado por dois cotilédones corrugados e um eixo radicular desenvolvido. O endosperma na semente madura tem a forma de uma fina película, contendo células com cristais de oxalato de cálcio. Os cotilédones possuem uma epiderme com tricomas glandulares e um tecido de reserva rico em amido, aleurona e substâncias alcaloidais.

CORNER (1976) citou as seguintes características para *T. cacao*: As sementes possuem de 15 a 30 mm de comprimento, com coloração marrom avermelhada a marrom escuro. Testa maciça com uma epiderme externa não especializada com paredes levemente espessadas, uma hipoderme externa constituída de células alongadas radialmente, algumas se transformando em sacos de mucilagem. Tégmen muito mais fino que a testa. O endosperma é reduzido a uma única camada de células ao redor do embrião. A coloração do embrião varia entre os tons chocolate a violeta. Os cotilédones são espessos, dobrados e com superfície pilosa. O autor ressalta que as informações sobre anatomia das sementes de *T. cacao* ainda são insatisfatórias.

Atualmente a espécie *T. cacao* tem sua descrição anatômica inserida na farmacopéia brasileira devido sua importância farmacológica e industrial bastante conhecida. A descrição macro e microscópica da semente de *T. cacao* também, podem ser encontradas em AKISSUE & OLIVEIRA (1991). Neste trabalho os autores realizaram uma descrição

anatômica, delineando os estratos celulares e estruturas que formam a semente. Assim a estrutura da semente madura pode ser definida da seguinte forma:

1-Um invólucro externo composto de uma fileira de células tabulares, recobertas por uma cutícula espessa; 2-Uma camada intermediária bem desenvolvida, formada por várias fileiras de células poliédricas, irregulares, alongadas tangencialmente, e contendo na parte externa grande sacos mucilaginosos, formados pela fusão de algumas células. Na parte interna desta camada encontram-se longos feixes fibrovasculares; 3-Uma camada mais ou menos contínua de células com paredes espessas e esclerificadas, em formato de “U”; 4-Uma camada de tecido parenquimático formada de células muito achatadas tangencialmente; 5-A epiderme cotiledonar geralmente ornamentada e o parênquima cotiledonar (Figura 1).

CUNHA *et al*, (1997) observou mudanças estruturais que ocorreram em sementes de *T. grandiflorum*, quando submetidas ao processo de fermentação. Este autor observou, através do uso dos corantes Azul de Toluidina e Xylidine Ponceau, uma redução na espessura da camada parenquimática do tegumento.

DANGOU *et al* (2002) analisaram as características histológicas e bioquímicas de *T. cacao*, durante as fases de desenvolvimento da semente. Estes autores observaram que, durante o desenvolvimento da semente o endosperma é degenerado.

LENCI (2002) realizou uma descrição anatômica e citoquímica de *T. obovatum*, *T. cacao* e *T. microcarpum* dos cotilédones definindo-os como formados pelas seguintes estruturas: epiderme; mesofilo, onde se encontram as células parenquimáticas de reserva; idioblastos com polifenóis, e os feixes vasculares. Segundo a autora, as células do parênquima cotiledonar de *T. cacao* e *T. obovatum* não apresentam um formato, predominante, nota-se também a presença dos espaços intercelulares e idioblastos com polifenóis no mesofilo.

Alguns trabalhos realizados com sementes de *T. grandiflorum* tratam de sua utilização para a indústria chocolateira, viabilidade para a germinação e transformações físicas e químicas, (GATO, 1992; ARAGÃO, 1992; VASCONCELOS, 1999). Nestes trabalhos, a maioria das considerações é relacionada aos cotilédones, onde geralmente ocorrem as transformações bioquímicas no processo de fermentação, etapa comumente provocada para a formação do “flavor” durante a fabricação do chocolate. As informações sobre a estrutura dos tegumentos nas sementes de *Theobroma* costumam ser ignoradas por serem os cotilédones sempre referidos como o único tecido de reserva e a parte aproveitada

industrialmente. No entanto, a retirada dos tegumentos durante o processamento industrial tem sido um empecilho, para algumas espécies do gênero como cupuaçu (*T. grandiflorum*).

Devido à importância econômica e ecológica deste gênero para a região amazônica, e a falta de informações existentes que definissem o aspecto estrutural das sementes de *Theobroma*, abrangendo as espécies não cultivadas e os híbridos, foi realizado um estudo sobre a estrutura anatômica com o objetivo de fornecer contribuições para estudos de taxonomia, ecologia, análise de sementes, melhoramento genético e aplicações tecnológicas.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. MATERIAL BOTÂNICO

O material foi oriundo da coleção “Addison O’Neill” (Figura 2), pertencente a Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA (1° 53’S 48° 46’W). Os estudos foram realizados no laboratório de anatomia vegetal do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) e no laboratório de anatomia vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2.2.2. REPARAÇÃO DO MATERIAL PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA DE FOTÔNICA

As amostras foram fixadas em FAA 50, sob condições de vácuo em um dessecador, por 24 h e desidratadas em série etanólica (JOHANSEN, 1940). Após a desidratação o material foi infiltrado e incluído em parafina histológica (SASS, 1951) e logo seccionado com micrótomo rotativo (Reichert Jung modelo 1130), com aproximadamente 10 µm de espessura, corados em Safranina e Fast Green (SASS, 1951), sendo posteriormente montados em Bálsamo do Canadá, segundo técnicas usuais em anatomia vegetal (KRAUS & ARDUIN, 1997). Os registros fotográficos foram executados com um fotomicroscópio LEICA MPS 30, no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.2.4. PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Segmentos de 0,2 cm x 0,2 cm de diferentes partes das sementes, foram fixados em solução Glutaraldeído 2,5% em Tampão Fosfato 0,1 M (pH 7,2) por 24 horas a 4°C (RUZIN, 1999). Este material foi lavado três vezes na mesma solução tampão e em seguida desidratado em série etanólica progressiva e posteriormente através da substituição do etanol por CO₂ líquido (*critical drying point*) (BOZZOLA & RUSSEL, 1992) e posteriormente metalizados com ouro. As imagens foram obtidas no Laboratório Institucional de Microscopia Eletrônica de Varredura do Museu Paraense Emílio Goeldi, utilizando-se um microscópio eletrônico LEO modelo 1450 VP.

2.3. RESULTADOS

2.3.1-Anatomia da semente

2.3.1.1-*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum.

Pode-se distinguir três regiões distintas: o tegumento (envoltório seminal), os cotilédones e o eixo hipocótilo-radícula. O eixo hipocótilo-radícula é bem desenvolvido, cilíndrico e alongado, posicionado na região basal da semente, fortemente unido aos dois cotilédones plicados que ocupam quase todo o espaço no interior das sementes. Apresenta apenas resquícios de endosperma, caracterizando-se como semente não-endospérmica.

A superfície do tegumento é irregular, com a presença de fibras e material remanescente da camada de polpa que envolve a semente (Figura 08 A). O tegumento é revestido por uma epiderme, que em vista frontal, possui células alongadas periclinalmente, revestida por uma cutícula espessa e tricomas simples, cilíndricos e alongados (Figura 08 B e C). No parênquima pode-se observar um estrato de células que em secção paradérmica apresentam-se irregularmente alongadas, intercaladas por grandes sacos de mucilagem, notadamente na parte interna, e podem apresentarem-se agrupados ou isolados (Figura 08 D, E e F), podendo-se também observar a presença de feixes vasculares e cristais em forma de drusa ainda no parênquima sub-epidérmico (Figura 09 A).

A característica distintiva do tegumento interno é uma camada paliádica conspícua, formada por células esclerificadas originada da epiderme externa, do tegumento interno (Figura 09 A e B). O tecido parenquimático apresenta-se compactado e formado por poucas camadas. A epiderme interna é formada por células irregulares e alongadas de coloração marrom com conteúdo fenólico. Esta se apresenta justaposta a epiderme cotiledonar.

Os cotilédones são revestidos por uma epiderme formada de células com formato irregular a arredondado. A epiderme cotiledonar apresenta dois tipos de tricomas glandulares pluricelulares, que são formados por 6 a 9 células, apresentando uma haste longa ou curta (Figura 10 B, C e D). Em vista frontal a região cotiledonar é constituída por um parênquima formado por células poliédricas com uma grande concentração de grãos de amido no citoplasma, com núcleos bem evidenciados. As células são regulares, arredondadas e com paredes não lignificadas. Nota-se também a presença de feixes vasculares e vários idioblastos com conteúdo fenólico (Figura 10 A).

Na região do eixo hipocótilo-radícula, as células parenquimáticas apresentam uma leve diferenciação. São células heterodimensionais, com grande quantidade de compostos fenólicos. Na região central do eixo, nota-se a presença de células com conteúdo ácido (Figura 11).

2.3.1.2-Theobroma obovatum *Klotzsch ex Bernoulli*

A estrutura anatômica da semente madura é muito semelhante à descrita para *T. grandiflorum*.

O tegumento externo possui uma epiderme composta por uma camada de células de formato tabular e com paredes espessadas com a cutícula também espessa e lignificada e um parênquima sub-epidérmico, formado por aproximadamente 10 camadas de células, bastante irregulares, com a presença de sacos de mucilagem, que podem ser grandes ou de tamanho reduzido, encontrando-se agrupados ou isolados (Figura 12 A, B e C). O eixo embrionário na semente madura mostra-se bastante desenvolvido, na região central nota-se a presença de estruturas com conteúdo ácido como ocorre em *T. grandiflorum* (Figura 12 E e F).

O tegumento interno é menor em relação ao tegumento externo. É formado por uma camada contínua de células parenquimáticas, delimitada por uma faixa de células lignificadas e esclerificadas, alongada anticlinalmente, com lúmen evidente, lembrando o formato de uma ampulheta que se desenvolve a partir das células da epiderme externa (Figura 13 A). Feixes vasculares são encontrados na parte inferior deste parênquima sub-epidérmico (Figura 12 G), o qual é limitado por uma epiderme interna, constituída por células simples e alongadas no sentido periclinal e com paredes não lignificadas, com a presença de muitos cristais prismáticos e drusas (Figura 13 B e C).

Os cotilédones são delimitados por uma epiderme constituída de células isodiamétricas, com grande quantidade de mucilagem nos espaços intercelulares. A presença de tricomas pluricelulares é observada ao longo de toda a epiderme cotiledonar, podendo-se distinguir dois tipos característicos: pluricelulares esféricos e pluricelulares alongados (Figura 13 E e F). As células epidérmicas apresentam paredes celulósicas e citoplasma impregnado por tanino, e as periclinais externas e anticlinais mostrando espessamento lamelar.

2.3.1.3-Theobroma speciosum Willd.

O tegumento externo é formado por uma epiderme constituída de células heterodimensionais alongadas periclinalmente (Figura 14 A). No parênquima do tegumento externo são observados cristais em forma de drusa (Figura 14 C). Os sacos de mucilagem presentes no tegumento externo ocorrem com menor freqüência e em menor tamanho (Figura 14 A, B e C). O tegumento interno, assim como nas espécies *T. grandiflorum* e *T. obovatum*, é constituído por uma camada de células paliçádicas, bastante esclerificadas, que se origina a partir da epiderme externa do tegumento interno, o restante é formado por células parenquimáticas com formato irregular que se apresentam compactadas e algumas bastante degeneradas (Figura 14 D, E e F).

Os cotilédones são revestidos por uma epiderme, formada de células irregulares. O parênquima cotiledonar é formado por células com parede celular bem delimitada, heterodimensionais de formato arredondado e com citoplasma denso. Pode-se observar, somente nesta espécie, a presença de idioblastos que apresentam uma estrutura semelhante aos sacos de mucilagem do parênquima do tegumento externo, ocorrendo em grande quantidade, tamanhos variados e composição histoquímica semelhante aos sacos de mucilagem no tegumento externo (Figura 15 A, B e C). Assim como ocorre nas espécies *T. grandiflorum* e *T. obovatum*, nota-se a presença de tricomas pluricelulares na epiderme cotiledonar e em algumas extensões desta epiderme pode-se observar alguns estômatos isolados (Figura 15 D e E).

2.3.1.4-*Theobroma subincanum* Mart.

De uma maneira geral a morfologia externa da semente segue o mesmo padrão das outras espécies seguindo a estrutura demonstrada na (Figura 01), onde se distingue uma camada externa (polpa), os tegumentos e o embrião.

A superfície do tegumento externo, quando analisada em vista frontal, mostra-se bastante ondulada (Figura 16 A). É revestida por uma epiderme constituída de células arredondadas com paredes lignificadas. O parênquima do tegumento externo, apresenta células irregulares, alongadas periclinalmente diferenciando-se em sacos de mucilagem (Figura 16 B e C), estas estruturas também, são encontradas na parte inferior desta camada parenquimática. Entre as células do parênquima também observamos alguns cristais em drusas.

O tegumento interno possui menos camadas de células em relação ao tegumento externo. Possui como característica marcante uma camada de células bastante esclerificadas

e lignificadas, que também foi observado nas outras espécies em estudo. Esta camada desenvolve-se a partir da epiderme externa do tegumento interno, que além desta camada de células esclerificadas, apresenta uma camada parenquimática bastante compactada e uma epiderme interna, com células regulares, mais ou menos arredondadas, que possui sua superfície rica em cristais (Figura 16 E e F)

O endosperma apresenta-se bastante reduzido, este penetra nas anfractuosidades dos cotilédones, onde assume a forma de massa triangular que à medida que penetra, vai diminuindo de espessura e termina formando uma membrana muito delgada.

Os cotilédones são delimitados por uma epiderme, com células arredondadas com conteúdo citoplasmático aparentemente de natureza fenólica (Figura 17 A e B). Apresenta tricomas pluricelulares, esféricos e alongados (Figura 17 C e D), nos espaços intercotiledonares, entre duas epidermes, podemos observar a presença de drusas (Figura 17 B). As células do parênquima cotiledonar são de formato regular, arredondadas, ricas em conteúdo fenólico e com citoplasma denso (Figura 17 A).

Os Híbridos

2.3.1.5-T. obovatum x T. subincanum

O tegumento externo é constituído por uma epiderme externa formada por células aproximadamente isodiamétricas. Abaixo da epiderme encontra-se uma camada de células parenquimáticas, com a presença de feixes vasculares. Assim como ocorre nas outras espécies descritas podemos observar a presença de sacos de mucilagem no tegumento externo, estes ocorrem no tecido parenquimático (Figura 18 A, B e C).

O tegumento interno é delimitado por uma camada de células de formato cubóides, com paredes bastante espessas, esclerificadas e lignificadas (Figura 18 A e D). Esta camada de células em paliçada é seguida de uma camada reduzida de células parenquimáticas que separa a epiderme interna do tegumento interno da epiderme cotiledonar e o parênquima cotiledonar. O parênquima cotiledonar por sua vez é constituído por células heterodimensionais com parede celular não lignificada, estas células apresentam-se ricas em conteúdo lipídico e amido (Figura 18 C) e com núcleos bem evidenciados (Figura 19 B), podemos observar também a presença de feixes vasculares (Figura 19 C). Na região entre as epidermes cotiledonares observa-se a presença de drusas (Figura 19 C) e também de conteúdo mucilaginoso. A epiderme cotiledonar apresenta tricomas glandulares que podem apresentar uma haste longa ou podem ser esféricos (Figura 19 D). O eixo hipocótilo-radícula

apresenta-se desenvolvido. Na região central, foi possível observar em MEV a presença de estruturas de reservas envolvidas por uma membrana, estes apresentam um aspecto globoso (Figura 19 A).

2.3.1.6-*T. grandiflorum* x *T. subincanum*

Tegumento externo constituído de uma epiderme externa formada por células tabulares, alongadas periclinamente e tricomas simples filiformes (Figura 20 A e B). Abaixo da epiderme observamos um extrato de células parenquimáticas irregulares, contendo uma grande quantidade sacos de mucilagem em diferentes fases de desenvolvimento (Figura 20 C). Nota-se também a presença de feixes vasculares (Figura 20 E).

O tegumento interno é demarcado por uma faixa de células ligeiramente alongadas no eixo anticlinal, com paredes lignificadas e esclerificadas, definindo um contorno em formato de “U” (Figura 20 D). Este tegumento também apresenta uma fina camada parenquimática contendo drusas e por uma epiderme interna provida de uma cutícula espessa (Figura 21 A e B). Como observado em *T. speciosum* e *T. subincanum*. O parênquima cotiledonar possui células arredondadas, ricas em amido, e com algumas granulações de natureza fenólica. Podemos observar que, entre as anfractuosidades dos cotilédones, existem restos de endosperma que assume uma forma triangular (Figura 20 F).

A epiderme cotiledonar destaca-se pelo intenso conteúdo fenólico, e apresenta tricomas glandulares septados, alongados e esféricos (Figura 21 C e D).

2.3.1.7-*T. grandiflorum* x *T. obovatum*

O tegumento externo é composto por uma epiderme não especializada, provida de cutícula espessa. Destaca-se ainda a presença de tricomas unicelulares simples. Abaixo segue um estrato de células parenquimáticas onde se nota a presença de sacos de mucilagem e feixes vasculares (Figura 22 A e B). O tegumento interno é delimitado por uma camada de células cubóides, com paredes espessas e lignificadas, definindo um contorno em formato de “U” (Figura 22 E). O mesofilo parenquimático é destacadamente mais espesso do que o observado nas outras espécies analisadas, e formado por células de formato arredondado (Figura 20 C e D).

A epiderme cotiledonar é formada por células arredondadas com presença de conteúdo fenólico no citoplasma. Podemos observar nesta espécie dois tipos de tricomas pluricelulares: estelares com “braços” alongados e cilíndricos (Figura 23 A e B). O

parênquima cotiledonar é muito semelhante ao encontrado nas outras espécies de *Theobroma*, suas células apresentam formato arredondado e várias inclusões no citoplasma, conferindo-lhe um aspecto denso, apresenta também grande quantidade de idioblastos com conteúdo fenólico. As paredes celulares destas células são delgadas e não lignificadas, formadas basicamente por celulose (Figura 23 C).

Um quadro sinóptico das estruturas anatômicas encontradas entre as espécies estudadas estão na tabela 01.

Tabela 1 - Estruturas anatômicas encontradas nas sementes maduras de *Theobroma*.

ESTRUTURAS					
ESPÉCIE	SM	CP	TS	TG	ID
<i>T. grandiflorum</i>	+	+	+	+	-
<i>T. speciosum</i>	+	+	-	+	+
<i>T. subincanum</i>	+	+	-	+	-
<i>T. obovatum</i>	+	+	-	+	-
<i>T. obo x T. sub</i>	+	+	-	+	-
<i>T. grand x T. obov</i>	+	+	-	+	-
<i>T. grand x T. sub</i>	+	+	-	+	-

SM- Sacos de mucilagem; CP- Camada de paliçada; TS- Tricomas simples; TG- Tricomas glandulares; ID- Idioblastos no parênquima cotiledonar.

+ Presente

- Ausente

2.4. DISCUSSÕES

2.4.1. ANATOMIA DO TEGUMENTO

O tegumento das espécies de *Theobroma*, é formado por camadas distintas de células parenquimáticas e células esclerificadas. Em cada tegumento existem características anatômicas que merecem destaque, pois são peculiares de algumas espécies e outras são comuns ao gênero.

O conhecimento da estrutura dos tegumentos como ferramenta de importância na taxonomia, foi revista por NETOLITZKY (1926); CORNER (1976); BOESEWINKEL & BOUMAN (1984). CORNER (1976) propôs que a classificação de ordem e superordem poderiam ser baseada nas características da testa, como uma característica peculiar e intrínseca das angiospermas.

CORNER (1976), considera *Theobroma* uma exceção dentro da família Sterculiaceae, pois, pode-se notar que a testa ou tegumento externo constitui a maior parte dos envoltórios seminiais, sendo que nos outros gêneros da família o tegumento interno constitui a maior parte dos envoltórios seminiais. Em *T. grandiflorum*, devemos observar que a epiderme que reveste o tegumento externo apresenta tricomas simples filiformes, uma característica que a diferencia das outras espécies em estudo. A presença de tricomas na epiderme externa da testa é considerada por WERKER (1997) como uma ocorrência pouco comum. Segundo a autora estas estruturas são características de algumas famílias como Malvaceae, Asclepiadaceae, Saliaceae enquanto em outras famílias eles são ausentes ou aparecem esporadicamente, e que diferentes tipos de tricomas, tais como projeções da epiderme ou somente papilas, podem ser encontrados dentro de um mesmo taxon. Quanto a função dos tricomas em sementes, WERKER (1997), cita que em muitas espécies, os tricomas desempenham algum papel na dispersão, aumentando a superfície de contato da testa, se estes tricomas são mucilaginosos, podem ser relacionados com a mixospermia e hidrocoria. Uma outra função foi levantada por BHATTACHARYA & SAHA (1991) *apud* WERKER (1997), seria a de retenção de água pelos tricomas. A presença de tricomas na epiderme externa, não foi observada no tegumento das outras espécies em estudo.

O tegumento também é provido de longos feixes vasculares, estes estão presentes em todas as espécies estudadas. Segundo WERKER (1997) a principal função do suprimento vascular é o transporte de minerais e

água, necessários para o desenvolvimento do óvulo e a síntese e acumulação de materiais de reserva. Quando a semente atinge a maturidade o fluxo de água pelos feixes vasculares é reduzido.

As variações na estrutura da testa das sementes dependem, de um lado, de características específicas do óvulo no que se refere ao número e espessura dos tegumentos e arranjo do tecido vascular, e do outro das modificações sofridas pelos tegumentos durante o desenvolvimento da semente e maturação (ESAU, 1974). Os óvulos de *Theobroma* são anátropos e bitegmentados. Deve-se observar que o potencial ontogênico dos óvulos bitegmentados é geralmente maior que o dos óvulos unitegmentados, sendo assim as sementes unitegmentadas têm envoltório mais simples, com o número de camadas de células parenquimáticas e esclerificadas reduzidas (BELTRATI, 1994).

O desenvolvimento da parede do óvulo para a formação dos tegumentos, pode se dar por divisão celular periclinal ou anticlinal ou por crescimento celular, onde temos o crescimento por alongamento radial (camada paliádica de células prismáticas com facetas hexagonais) ou por alongamento tangencial. Na divisão celular periclinal, temos o aumento no número de camadas de células, o que foi denominado por CORNER (1976) como método multiplicativo, enquanto que na divisão celular anticlinal, ocorre o aumento no número de células em cada camada, este sendo chamado de método não multiplicativo. CORNER (1976); BELTRATI (1994) citam que ambos os métodos de crescimento podem ocorrer conjuntamente, como naqueles óvulos que se transformam em sementes grandes como as de *Theobroma*, ou pode haver predominância de um deles. O método multiplicativo produz envoltórios seminiais maciços e complexos como os encontrados nas famílias Myristicaceae, Annonaceae, Clusiaceae, Fabaceae e Bombacaceae. Já o método não multiplicativo, os tegumentos são bem mais simples, geralmente são sementes pequenas, onde as células apenas crescem e se diferenciam, como ocorre nas famílias Caryophyllaceae, Papaveraceae, Gesneriaceae e Scrophulariaceae.

Nas espécies estudadas a forma como os tegumentos se apresentam na semente madura, nos leva a pensar em um crescimento através do método multiplicativo, pois o tegumento externo, possui várias camadas de células parenquimáticas, e algumas células diferenciadas como os sacos de mucilagem presentes no parênquima. Especial atenção deve ser dada para estas estruturas, pois são encontradas em todas as espécies estudadas, sendo mais freqüente em algumas como *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, onde temos sacos de mucilagem de vários tamanhos, agrupados ou isolados, já em *T. speciosum* e *T. obovatum*, estas estruturas estão presentes, mas em pouca quantidade. CORNER (1976) registra a

presença de sacos de mucilagem no tegumento externo de *T. cacao*, no entanto na literatura, eram inexistentes informações sobre estas estruturas em outras espécies do gênero.

As sementes com tegumentos multiplicativos, são características de famílias primitivas, são geralmente sementes grandes. Para o gênero *Theobroma*, CORNER (1976) sugere um super crescimento com mínima diferenciação de tecidos, este autor cita que o desenvolvimento do zigoto é suprimido no quinto dia após a polinização. No caso das famílias onde ocorre as sementes denominadas supercrescidas “Overgrown seeds” as camadas celulares dos envoltórios, multiplicam-se sem que haja diferenciação dos caracteres típicos da família nos tegumentos (CORNER, 1976; BELTRATI, 1994). Estes autores relatam que no final do desenvolvimento, se os tegumentos da semente não forem amassados pelo crescimento do endosperma e do embrião, permanecem como um envoltório de paredes finas em torno da semente. O crescimento pelo método multiplicativo é tido como uma característica primitiva dentro da escala de evolução. Segundo BELTRATI (1994) a evolução tem levado a uma perda do caráter multiplicativo, no entanto também, pode levar a um excesso de multiplicação como ocorre nas sementes chamadas supercrescidas.

Em uma semente madura, pode-se encontrar um embrião, quantidade variável de endosperma ou sua ausência e o tegumento (ESAU, 1974). É possível observar que na maioria das sementes, a grande parte dos tegumentos são degenerados e possivelmente absorvidos por outros tecidos em desenvolvimento (FANH, 1990) a exemplo do que foi observado por DANGOU *et al* (2000) em *T. cacao*, onde demonstrou que o endosperma foi todo reabsorvido durante o desenvolvimento, CORNER (1976) também, observou que nas sementes de *T. cacao*, o endosperma é bastante reduzido, fato também constatado neste trabalho onde o endosperma encontra-se ausente, quando presente este tecido é constituído de uma fina camada de células.

Em algumas famílias as características estruturais são mais uniformes como o que ocorre em Leguminosae, que possui uma exotesta típica com uma linha lúcida bem visível (CORNER, 1976; WERKER, 1997). Embora a estrutura do tegumento seja determinada geneticamente, esta pode ser modificada por outros fatores, como tipo de fruto, densidade de sementes por fruto e fatores externo (WERKER, 1997)

Nas espécies estudadas o tegumento interno, apesar de possuir um número menor de camadas de células parenquimáticas quando comparado com o tegumento externo, tem participação fundamental na estruturação do tegumento na semente madura. É no tegumento interno que se encontra a principal camada mecânica, que consiste em uma camada em

paliçada, bastante lignificada, a partir da epiderme externa do tegumento interno. A presença de uma camada paliçádica no tegumento das sementes foi revista por CORNER (1976) onde o autor faz uma classificação, de acordo com a localização da camada mecânica principal. Segundo este autor, para as sementes de dicotiledôneas que apresentam testa característica são chamadas sementes testais e as que possuem o tégmen característico, são denominados sementes tégmicas. O autor citado acima destacou na ordem Malvales a presença de uma paliçada exotégmica, com células apresentando alongamento radial e lúmen obliterado. Isto ocorre com todas as espécies analisadas, onde se nota a ocorrência desta camada de células bastante lignificadas, no tegumento interno, originada a partir da epiderme externa. Seguindo a classificação de CORNER (1976), estas sementes se enquadram como sementes exotégmicas (camada mecânica principal originada a partir da epiderme externa do tegumento interno).

Há evidências de que a estrutura do tegumento interno na semente madura, foi comprimido durante o desenvolvimento do embrião, que em *Theobroma* é bastante desenvolvido e ocupa grande parte da semente. Por esta razão grande parte das camadas parenquimáticas encontram-se compactadas, sendo a camada em paliçada o único estrato celular que pode ser visualizado de forma íntegra.

Durante o desenvolvimento da semente o tegumento participa na transferência de material de reserva. A acumulação temporária de material de reserva é necessária para o desenvolvimento de várias partes da semente em diferentes períodos. O amido é mais comumente encontrado nos tecidos de reserva temporário, muito raramente encontram-se reservas no tegumento da semente madura, algumas vezes encontra-se proteínas, remanescentes que não foram usadas como reservas temporárias ou estão como reservas para a germinação do embrião (WERKER, 1997).

Quanto a função do tegumento, podemos citar que na semente em desenvolvimento, o tegumento atua como rota para transporte e conversão de aminoácidos e açúcares do pericarpo para o saco embrionário, assim como para o próprio desenvolvimento do tegumento (TURNER, 1975; THORNE, 1985; MURRAY, 1979 a, 1987, 1988 *apud* WERKER, 1997).

WERKER (1997), cita que o tegumento durante o processo de desenvolvimento da semente acumula material de reserva, servindo como tecido temporário de reserva, também atua na troca gasosa, além de servir como proteção contra a dissecação e injúria mecânica.

Nas sementes desenvolvidas, age na proteção do embrião maduro contra a dissecação e danos físicos e biológicos. Em algumas espécies onde a semente é a unidade de dispersão, o tegumento algumas vezes desenvolve algumas estruturas especializadas como sarcotesta, arilo e asas (WERKER, 1997).

O tegumento atua como regulador da entrada de água, em algumas espécies mantém a dormência prevenindo a absorção de água ou trocas gasosas. Em alguns casos serve como um tecido de reserva para a germinação (WERKER, 1997).

FANH (1990) atribui o melhor desenvolvimento do tegumento externo a adaptação para a proteção mecânica ou perda de umidade, enquanto o tegumento interno não é especializado.

No presente trabalho algumas das características gerais citadas por CORNER (1976) podem ser encontradas nas espécies *T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. speciosum*, *T. subincanum* e nos três híbridos. As sementes destas espécies podem ser reconhecidas pela presença no tegumento externo, de células no parenquimáticas que se diferenciaram e segundo o autor acima citado deram origem às estruturas conhecidas como saco de mucilagem. Em todo o material analisado estas estruturas estiveram presentes, apenas a quantidade e tamanho era variável entre as espécies analisadas.

A presença de mucilagem e células mucilaginosas foi retratada por (FANH, 1990; CORNER, 1976; CUTTER, 1998; BOSEWINKEL & BOUMAN, 1988). De uma forma geral, os autores fazem relações desta substância com a adaptação e dispersão das sementes. Foi observado em todo o material estudado a presença de mucilagem nos espaços intercotiledonares e como conteúdo das estruturas encontradas no parênquima do tegumento externo chamado de sacos de mucilagem. A denominação sacos de mucilagem foi empregada por CUATRECASAS (1964) e posteriormente por CORNER (1976) para designar as células do parênquima do tegumento externo de *T. cacao* que se diferenciavam e tinham seu volume aumentado e passavam a produzir mucilagem, vale lembrar que o autor não faz menção em sua obra sobre testes histoquímicos utilizados para identificar a natureza desta substância.

Segundo METCALF & SHALK (1983) a presença de canais mucilaginosos nas angiospermas, é considerada como um caráter diagnóstico importante para a taxonomia, ROTH (1971) também cita a presença de canais de mucilagem no pericarpo de *T. cacao*. No presente trabalho podemos observar que a existência destas estruturas é um fato comum à todas as espécies e inclusive nos híbridos, a diferença ocorre na quantidade destas estruturas

ou se estão agrupadas ou isoladas. A presença de mucilagem dentro de sacos, é considerada por WERKER (1997), como sendo de ocorrência rara, no entanto de acordo com as características observadas no presente estudo, podemos atribuir como sendo peculiar do gênero.

2.4.2. ANATOMIA DOS COTILÉDONES

Nas sementes de *Theobroma*, a parte mais desenvolvida é o cotilédone com a maioria das substâncias de reserva armazenadas no parênquima cotiledonar. É um fato bem conhecido na literatura que, em sementes não endospermicas ou naquelas em que o endosperma é bastante reduzido, como foi observado em *Theobroma*, os cotilédones podem desempenhar uma dupla função de armazenamento e síntese, como ocorre com as sementes de espécies do gênero *Phaseolus*, *Cornus* e *Pisum* (KOSLOWSKY, 1972).

Segundo CORNER (1976) o embrião em *Theobroma* possui coloração marrom achocolatado ou violeta; cotilédones espessos e dobrados com superfície puberular, tricomas simples, cilíndricos, obtusos proximamente septados. As células da epiderme cotiledonar, obedeceram um padrão semelhante para todas as espécies estudadas, são células irregulares mais ou menos arredondadas com um citoplasma denso, e aparentemente com intensa atividade metabólica. As células da epiderme são impregnadas por material fenólico. No mesofilo dos cotilédones uma característica marcante é a presença de idioblastos com polifenóis. Estas estruturas são encontradas dentro de células vacuolizadas. Durante a fermentação do cacau no processo de fabricação do chocolate, estes componentes participam na formação do “flavour”. Atualmente existe um grande interesse nos polifenóis de cacau, devido a sua atividade antioxidante e seus possíveis benefícios para a saúde (BRITO *et al*, 2002). Segundo a literatura estas substâncias estão geralmente localizadas dentro de vacúolos, associadas a alcalóides formando complexos. Em *T. cacao*, os polifenóis estão associados a presença de teobromina e cafeína (JAENICKE, 1973 *apud* LENCI, 2002).

A epiderme cotiledonar possui tricomas glandulares, multicelulares, presentes em todas as espécies analisadas. Em algumas espécies como em *T. grandiflorum*, existe uma quantidade muito grande de tricomas em estágios iniciais de desenvolvimento e totalmente desenvolvidos. Tricoma do tipo estelar foi encontrado no híbrido *T. grandiflorum* x *T. obovatum*, que também apresenta tricoma glandular como em *T. obovatum*.

PAOLI (1995) cita que os tricomas e seu possível papel na planta como defesa têm sido alvo de estudos dos sistematas, evolucionistas e ecologistas. Segundo a autora para os taxonomistas, os tricomas apresentam um valor diagnóstico, porque certos tipos de tricomas são mais comuns em um gênero do que em outro. Os tricomas encontrados nas espécies estudadas, possuem a mesma morfologia dos tricomas encontrados nas estruturas vegetativas de *T. cacao* e *T. grandiflorum* (CUATRECASAS, 1964).

Segundo FANH (1990) os tricomas glandulares estão diretamente relacionados com a secreção de várias substâncias, como soluções salinas, soluções açucaradas (néctar), terpenos e polissacarídeos.

De acordo com CORNER (1976) tricomas não ocorrem em sementes ariladas ou sarcotestais. Neste estudo não foram observados tricomas na testa das sementes, com exceção de *T. grandiflorum* que possui longos tricomas filiformes na epiderme externa do tegumento externo.

Os tricomas são mais bem evidenciados na epiderme cotiledonar e são muito semelhantes aos descritos por NAKAYAMA *et al* (1996) quando analisou folhas adultas de *T. cacao*. Estes autores citam a ocorrência de dois tipos de tricomas glandulares, muito semelhantes aos encontrados na epiderme cotiledonar das espécies analisadas.

Com a utilização de MEV foi possível a visualização de tricomas simples filiformes na superfície do tegumento externo de *T. grandiflorum*. Aparentemente estes tricomas estão relacionados com a presença de material mucilaginoso na superfície, somente nesta espécie verificamos este tipo de tricoma. Os tricomas da epiderme cotiledonar apresentam morfologia distinta e talvez possuam funções diferenciadas.

A separação entre os tegumentos e os cotilédones em *T. grandiflorum* durante a fabricação do chocolate significa um entrave, pois os tegumentos permanecem aderidos aos cotilédones, comparando com *T. cacao*, espécie de fácil descorticamento. Podemos fazer algumas inferências com base nos aspectos anatômicos: A própria estrutura dos cotilédones na semente de *T. cacao*, permite que haja um espaço, entre a epiderme interna do tegumento interno e a epiderme cotiledonar. Em *T. grandiflorum*, assim como em *T. subincanum* e *T. speciosum*, isto não ocorre, não se observa a presença deste espaço, devido os cotilédones ocuparem grande parte da semente, especialmente em *T. grandiflorum*. Com o aumento da pressão exercida pela expansão dos cotilédones sobre o tegumento interno, ocorre um achatamento das células parenquimáticas do tegumento interno em decorrência da existência

de uma camada mecânica no tegumento interno, que em *T. grandiflorum* é notadamente mais desenvolvida. Esta camada possui paredes bastante espessas e lignificadas.

2.5. CONCLUSÕES

- O tegumento externo das espécies estudadas pode ser bem caracterizado pela presença dos sacos de mucilagem nos primeiros estratos de células que compõem as várias camadas parenquimáticas. Estas estruturas se diferenciam e tornam-se muito maiores que as demais células parenquimáticas. A presença dos sacos de mucilagem é uma característica comum em *T. grandiflorum*, *T. speciosum*, *T. subincanum*, *T. obovatum* e nos três híbridos.
- A presença dos sacos de mucilagem, no tegumento externo pode estar relacionado com a impermeabilidade que este tecido confere a entrada de água no embrião, tendo em vista que a retirada dos tegumentos acelera a germinação.
- Podemos também pensar em um tecido de reserva extra-embriônico, seria interessante fazer o acompanhamento da germinação, para observar se estas reservas contidas nos sacos de mucilagem são utilizadas durante o processo.
- O eixo embrionário, na maioria das espécies estudadas, possui estruturas que funcionam como uma bolsa armazenadora de polissacarídeos ácidos, estas estruturas são semelhantes aos sacos de mucilagem do tegumento externo, pela proximidade é evidente que este conteúdo seja usado no processo de germinação.
- Como o tecido endospermático nas sementes maduras é quase ausente, as células do parênquima cotiledonar assumem a síntese e acumulação de substâncias de reservas.
- As células do parênquima cotiledonar apresentam citoplasma denso e demonstram uma atividade intensa. Mesmo após a fixação, os núcleos mostraram-se bastante evidentes.
- Em todas as espécies analisadas o tegumento interno é caracterizado pela presença de uma camada paliçádica bastante esclerificada. Esta camada mecânica é originada na epiderme externa do tegumento interno, sendo assim todas as espécies e híbridos possuem sementes exotégmicas de acordo com a classificação de CORNER (1976).
- As características anatômicas de *Theobroma speciosum* permitem separá-la das demais espécies, pois é a única que possui idioblastos no parênquima cotiledonar com estrutura química semelhante aos sacos de mucilagem do tegumento externo.

- *Theobroma grandiflorum* possui tricomas na epiderme externa da testa. Esta característica não foi encontrada nas outras espécies, estes tricomas estão associados diretamente com a presença de mucilagem na superfície do tegumento.
- Tricomas glandulares em diferentes estágios de desenvolvimento são freqüentes na epiderme cotiledonar. São tricomas multicelulares que apresentam intensa atividade metabólica e podem estar associados com a síntese de substâncias. Estes tricomas são muito semelhantes aos encontrados em órgãos vegetativos de espécies deste gênero.

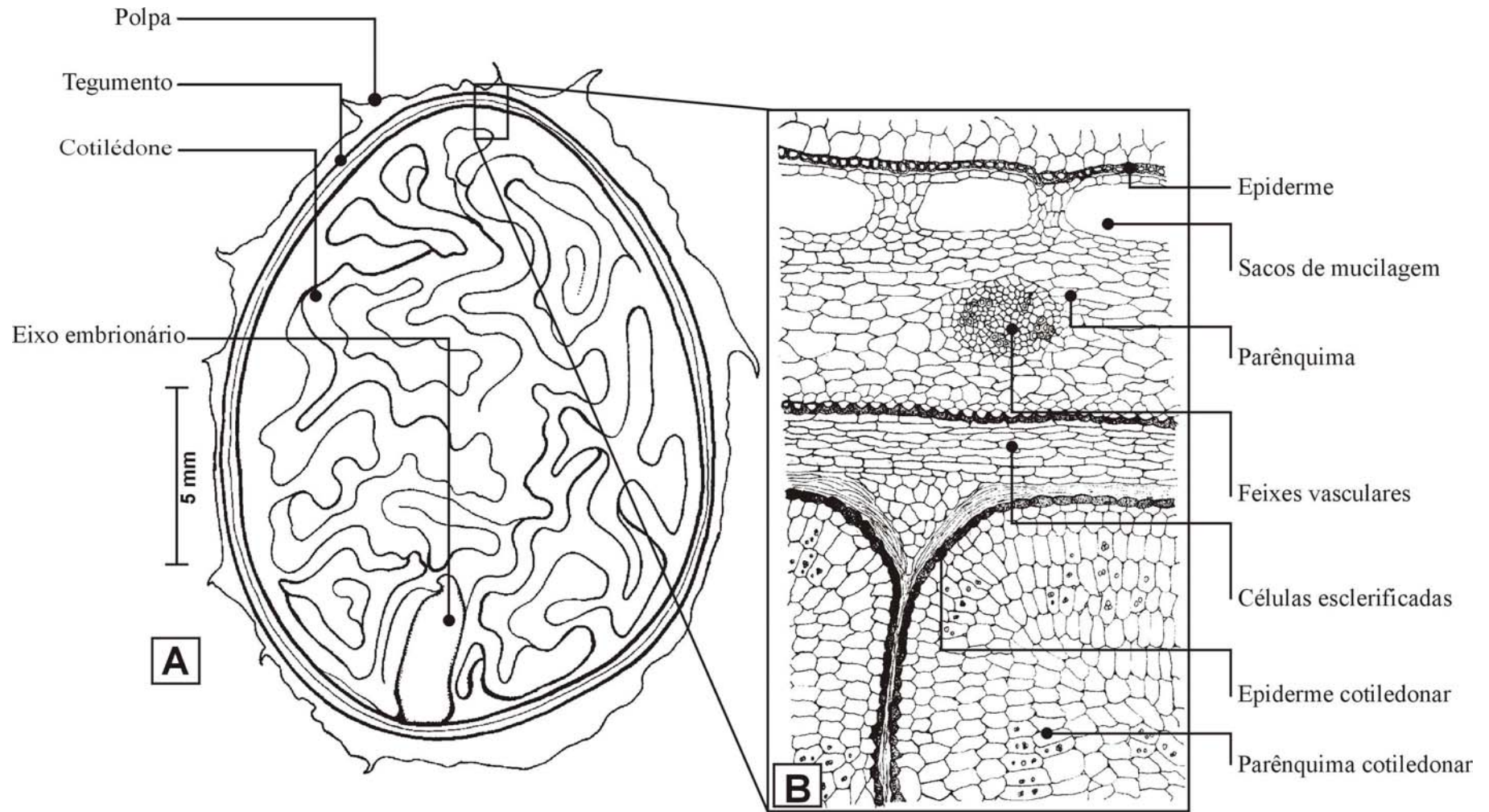


Figura 01-Estrutura anatômica da semente madura de *Theobroma cacao* L. A-semente em corte longitudinal; B- detalhe da semente em corte longitudinal. (Adaptado de AKISUE & OLIVEIRA, 1991).



Figura 02 - Coleção "Addison O'Neill" - Embrapa Amazônia Oriental / Belém - PA

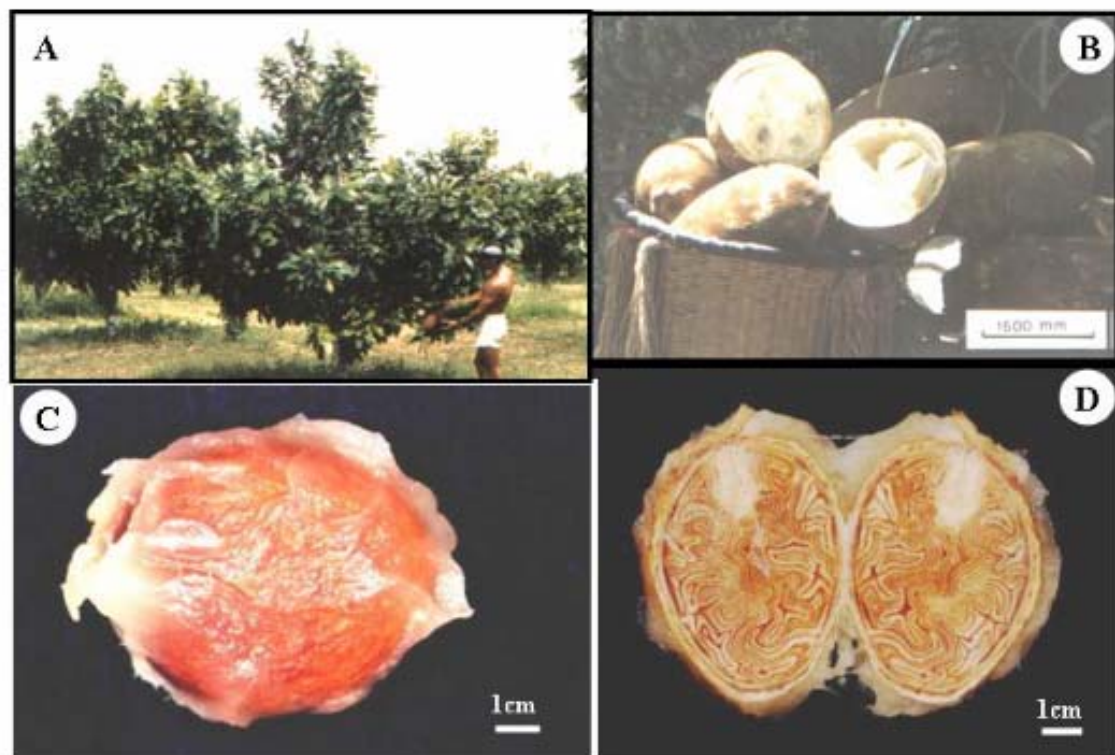


Figura 03- *T. grandiflorum*. A-planta cultivada; B-aspecto geral do fruto; C-aspecto externo da semente; D-semente em corte longitudinal.

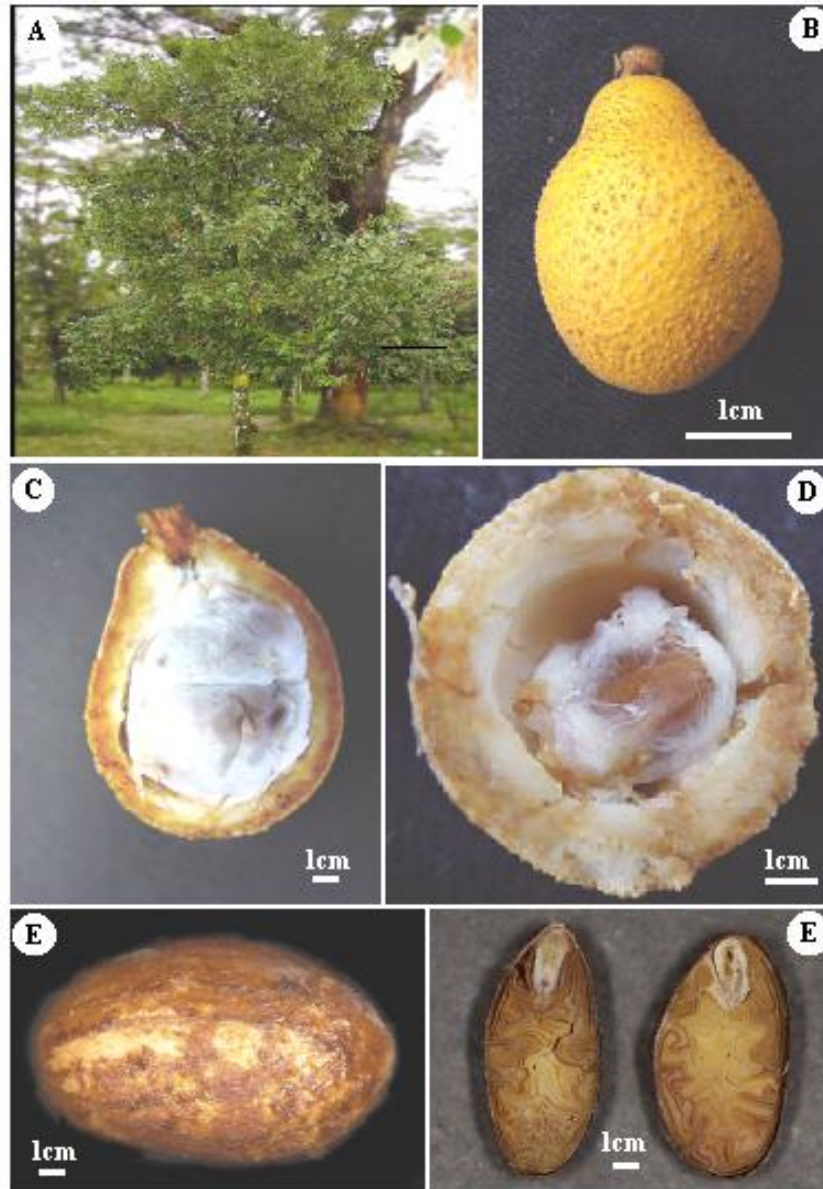


Figura 04- *T. obovatum*. **A**-aspecto da árvore; **B**-detalhe do fruto; **C**-fruto (corte longitudinal); **D**-fruto (corte transversal); **E**-aspecto externo de uma semente; **F**-semente (corte longitudinal)

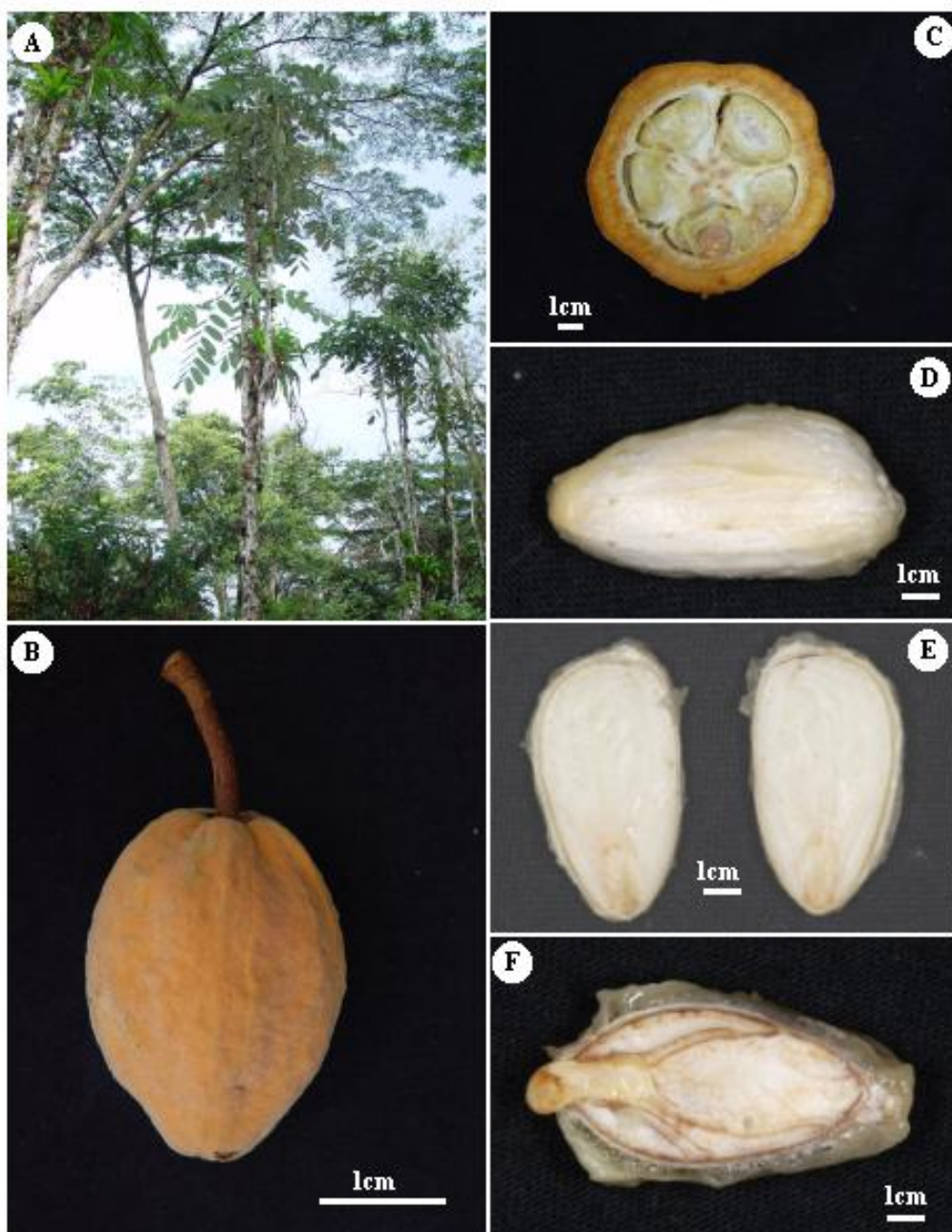


Figura 05- *T. speciosum*; **A-** aspecto geral da árvore; **B-** fruto (aspecto geral), **C-** fruto (corte transversal); **D-** semente (aspecto externo); **E e F-** semente em corte longitudinal (detalhe do embrião).

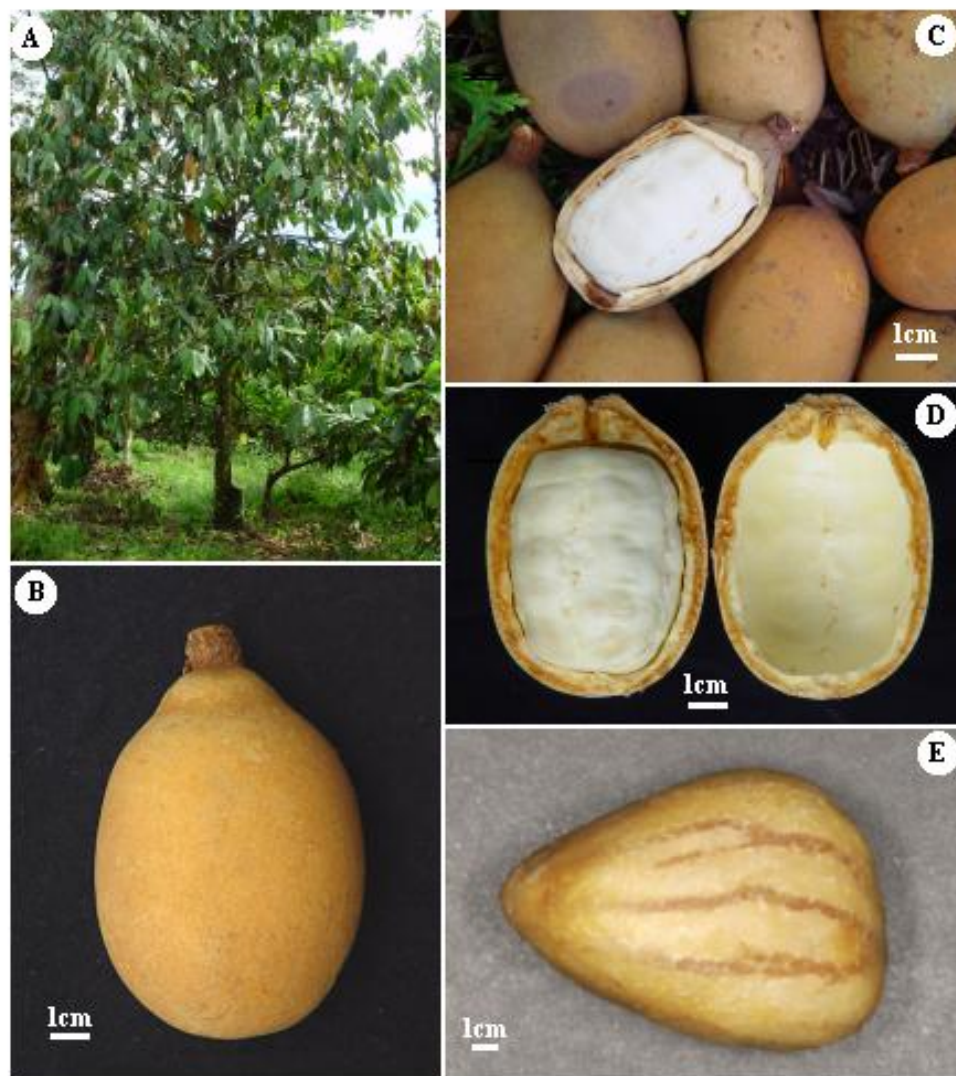


Figura 06- *T. subincanum*. **A**-aspecto geral da árvore; **B, C, D**-detalhe do fruto (observar polpa de coloração branca); **E**-aspecto externo da semente.

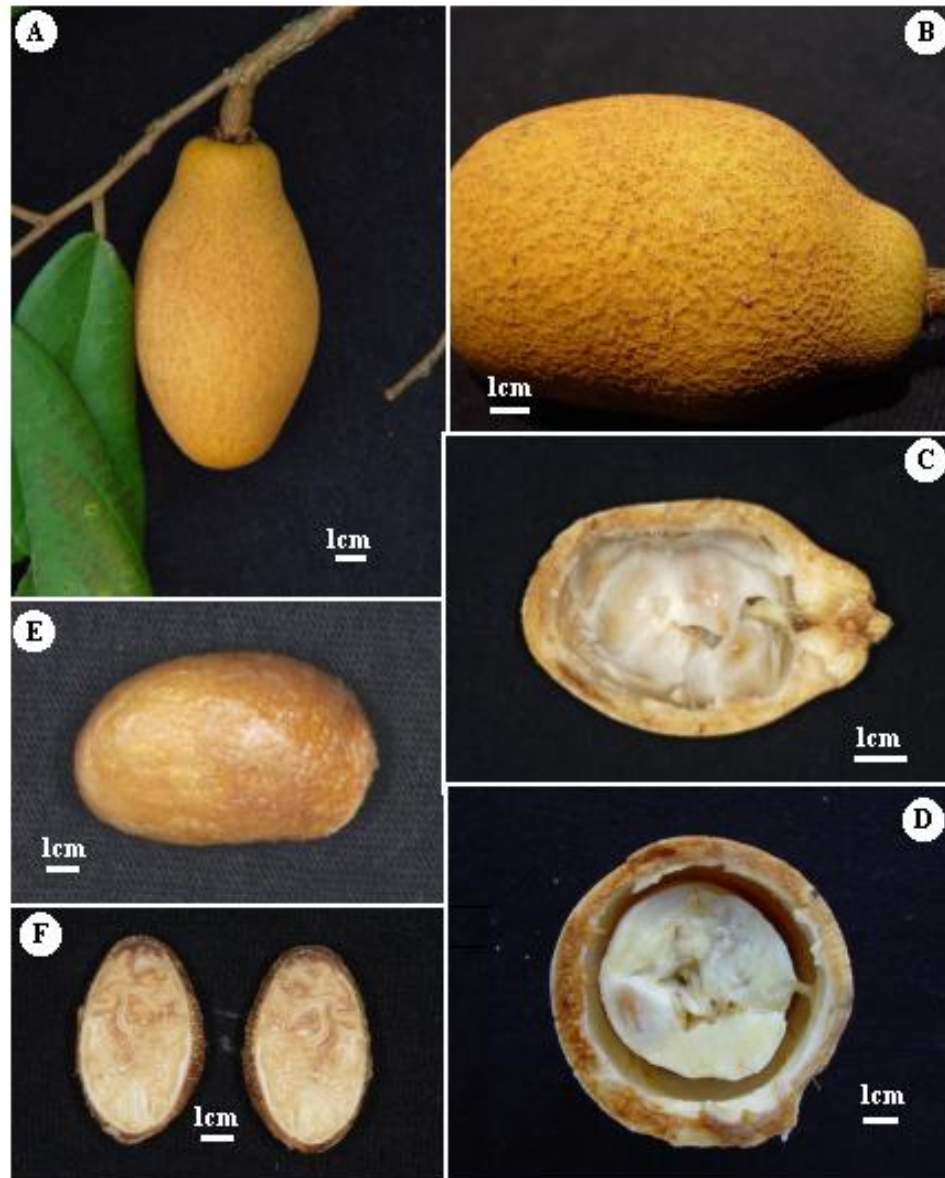


Figura 07- *T. obovatum* x *T. subincanum*. A e B-aspecto geral do fruto, C-Fruto em corte longitudinal; D-fruto em corte transversal; E-aspecto geral da semente; F-semente em corte longitudinal

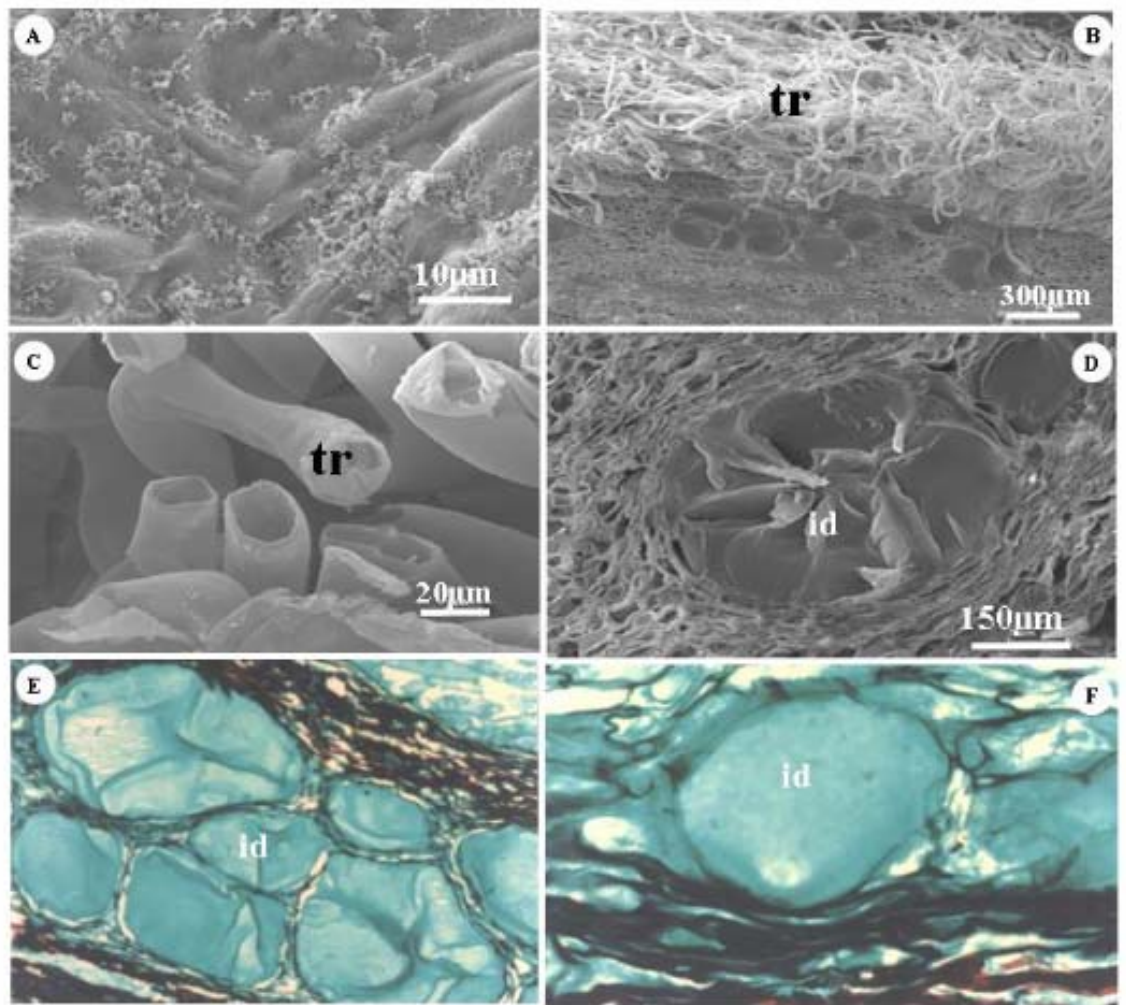


Figura 08- *T. grandiflorum*. **A**-superfície do tegumento externo (MEV); **B**-tricomas (tr) na epiderme externa MEV; **C**-detalhe dos tricomas (tr) na epiderme externa do tegumento externo (MEV); **D**-idioblastos em secção transversal (MEV); **E**-idioblastos agrupados no tegumento externo (100x) , **F**-detalhe do idioblasto no parênquima do tegumento externo (400x).

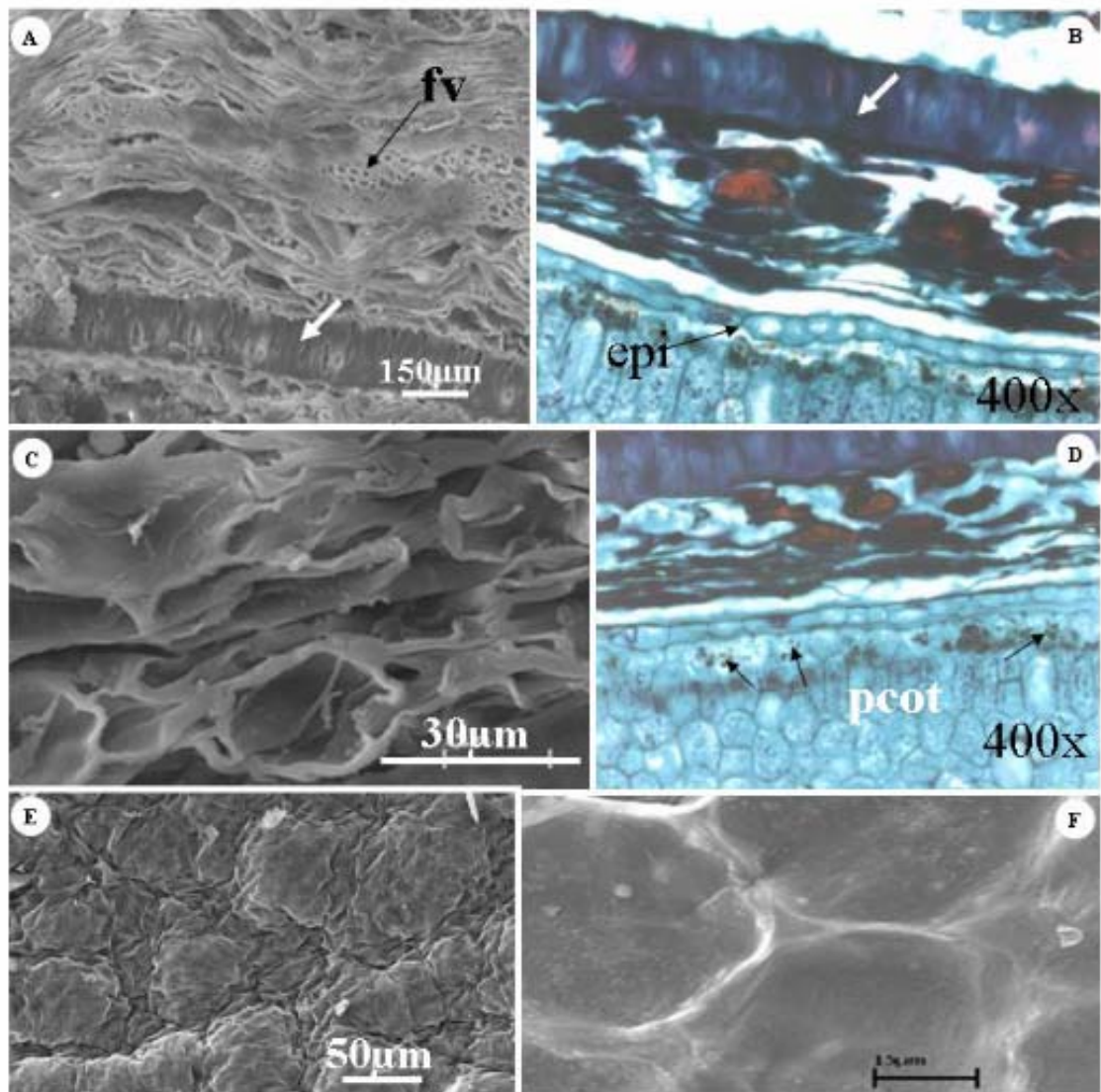


Figura 09- *T. grandiflorum*. **A**-corte transversal do tegumento evidenciando os feixes vasculares (fv) e a camada de células esclerificadas em paliçada (seta), **B**-camada de células esclerificadas (seta) e epiderme interna do tegumento interno (epi) (400x) ; **C**-células parenquimáticas do tegumento externo (MEV); **D**-parênquima cotiledonar mostrando células com compostos fenólicos (seta) (400x); **E**-superfície da epiderme interna do tegumento interno; **F**-células do parênquima cotiledonar (MEV).

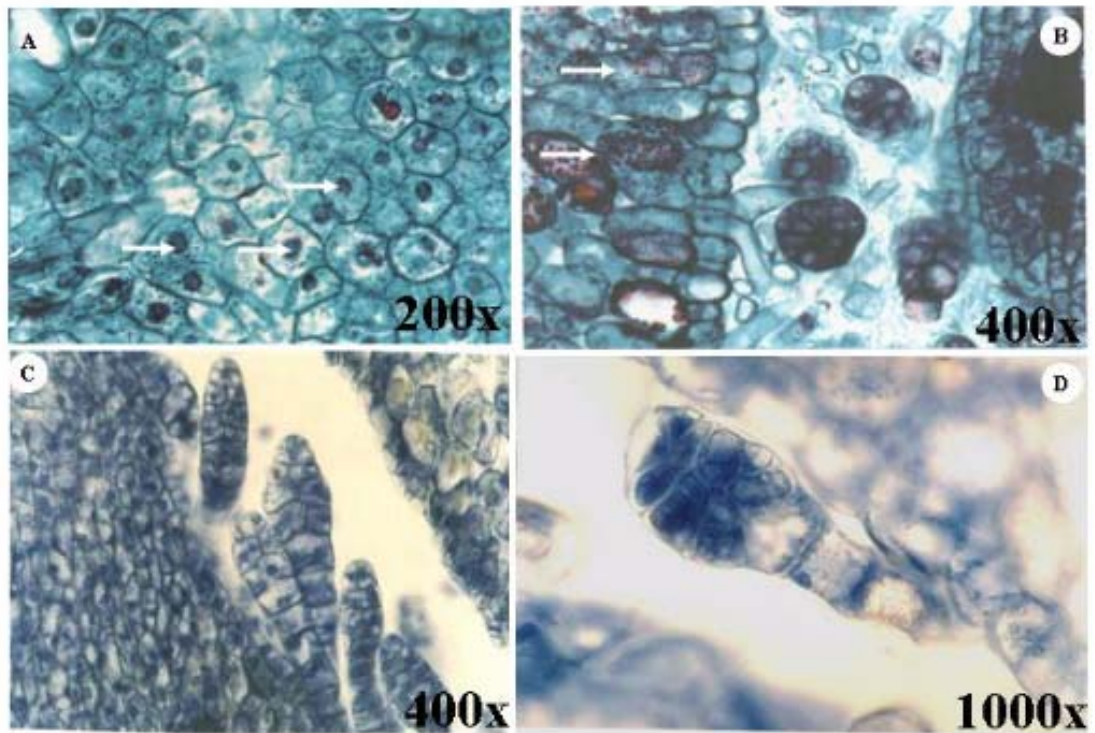


Figura 10- *T. grandiflorum*. **A**-Células do parênquima cotiledonar em vista frontal coradas com Safranina e Fast Green (seta) com núcleos bem evidenciados (200x); **B**-idioblastos com conteúdo fenólico (seta) (400x); **C**-tricomas glandulares na epiderme cotiledonar (400x); **D**-tricoma glandular com formação de pedicelo (1000x).

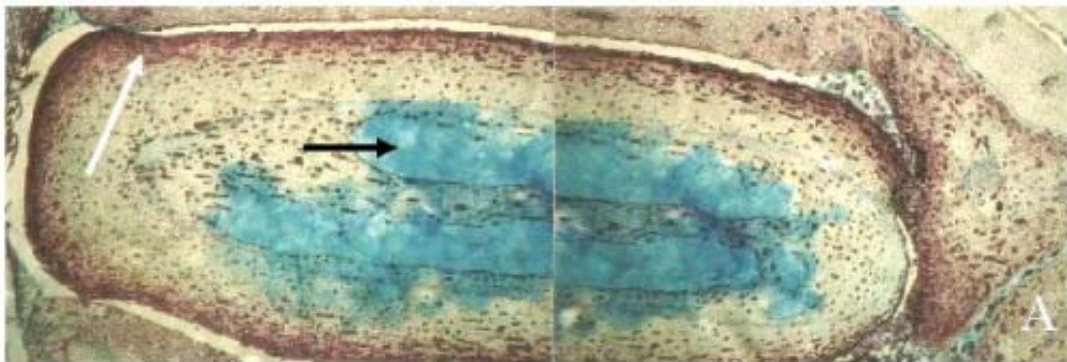


Figura 11- *T. grandiflorum*. A- secção longitudinal do eixo hipocótilo-radícula em corte longitudinal (células com conteúdo fenólico) (seta branca), células com conteúdo ácido (seta preta) (400x).

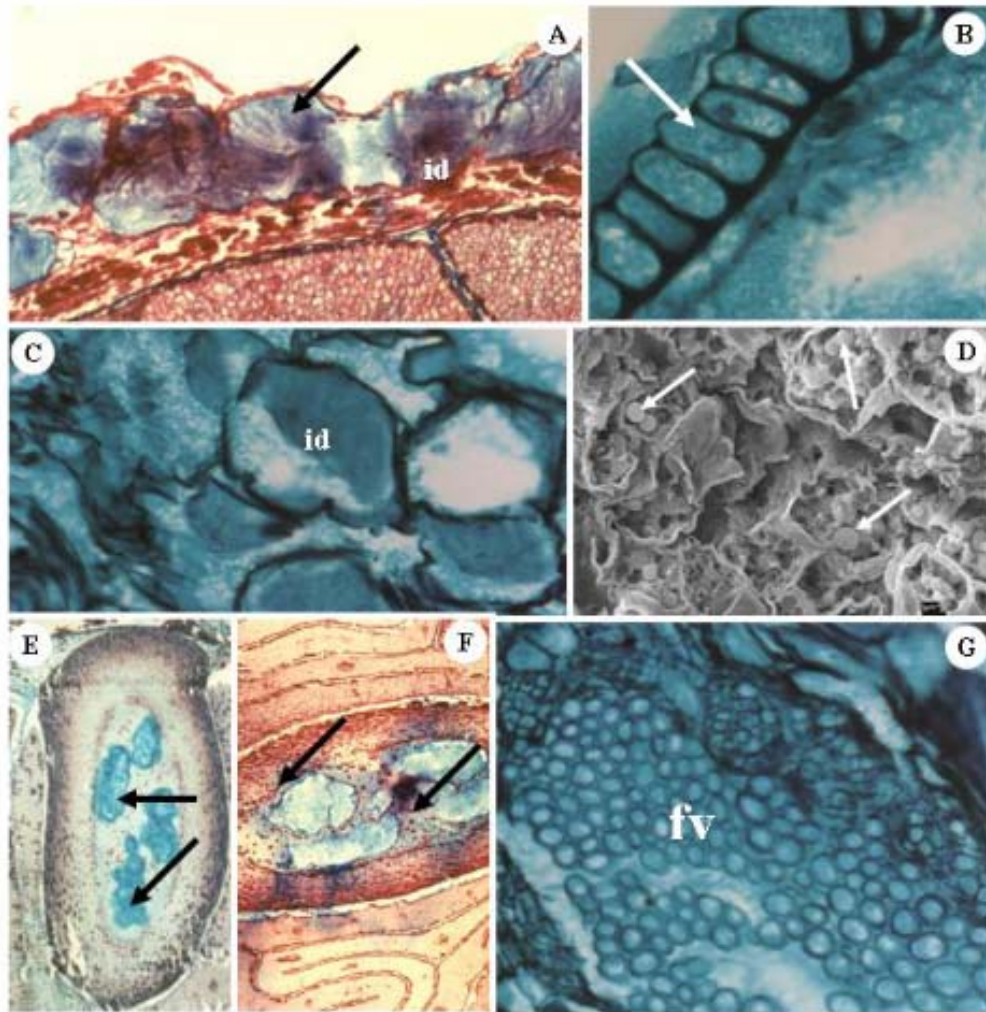


Figura 12- *T. obovatum*. **A**-idioblastos no tegumento externo (seta) (200x); **B**-detalhe da epiderme externa do tegumento externo (seta) (400x); **C**-idioblastos no tegumento externo (400x); **D**-parênquima cotiledonar, grãos de amido (seta) MEV; **E** e **F**-eixo hipocótilo-radícula. Observar células com conteúdo ácido (seta) (200x); **G**-detalhe dos feixes vasculares (fv) no tegumento externo (400x).

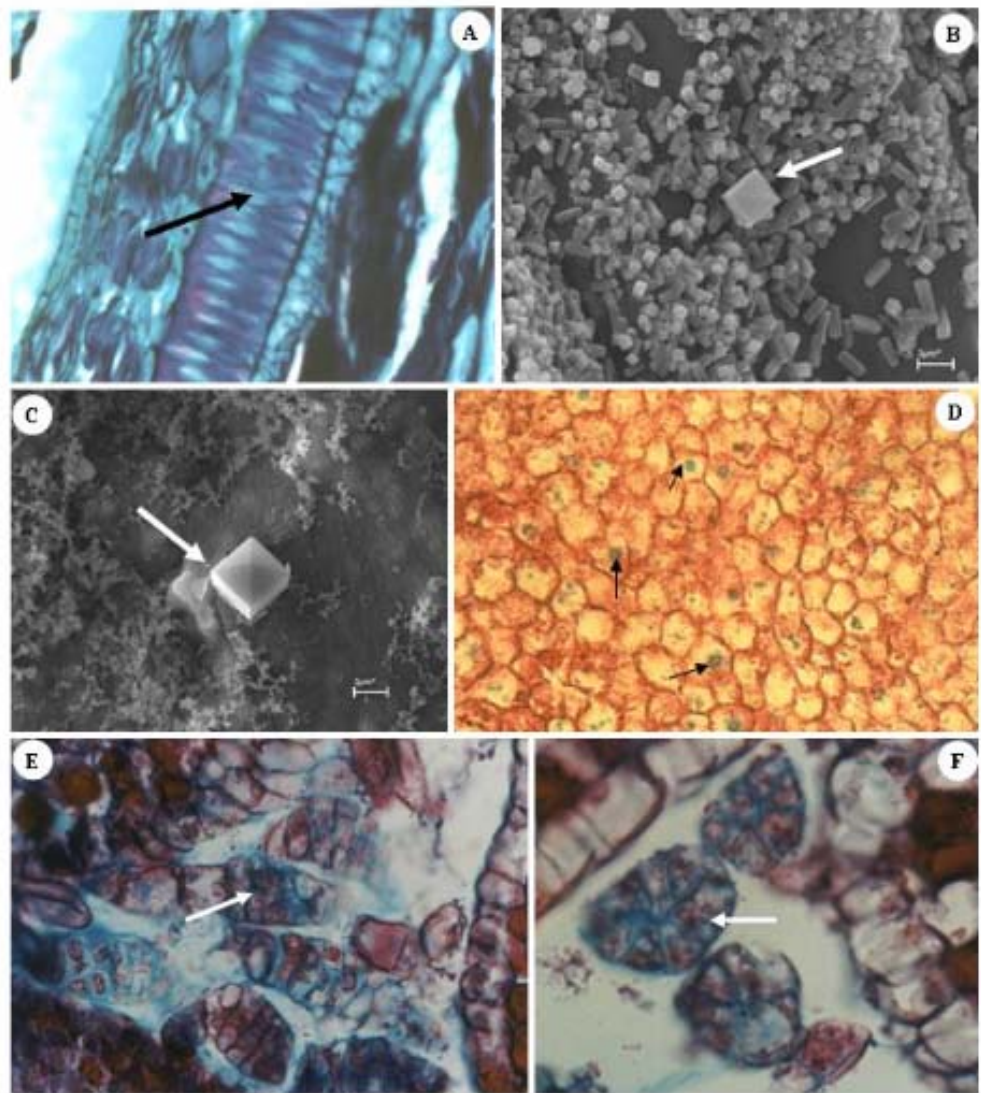


Figura 13- *T. obovatum*. **A**-camada de células esclerificadas (seta) (200x); **B e C**- cristais de oxalato de cálcio (seta) na superfície da epiderme interna do tegumento externo (MEV); **D**-células do parênquima cotiledonar (seta) evidenciando os núcleos e conteúdo fenólico (100x); **E**-tricomas glandulares (seta) na epiderme cotiledonar (400x); **F**-detalhe dos tricomas glandulares em seção transversal (seta) (400x).

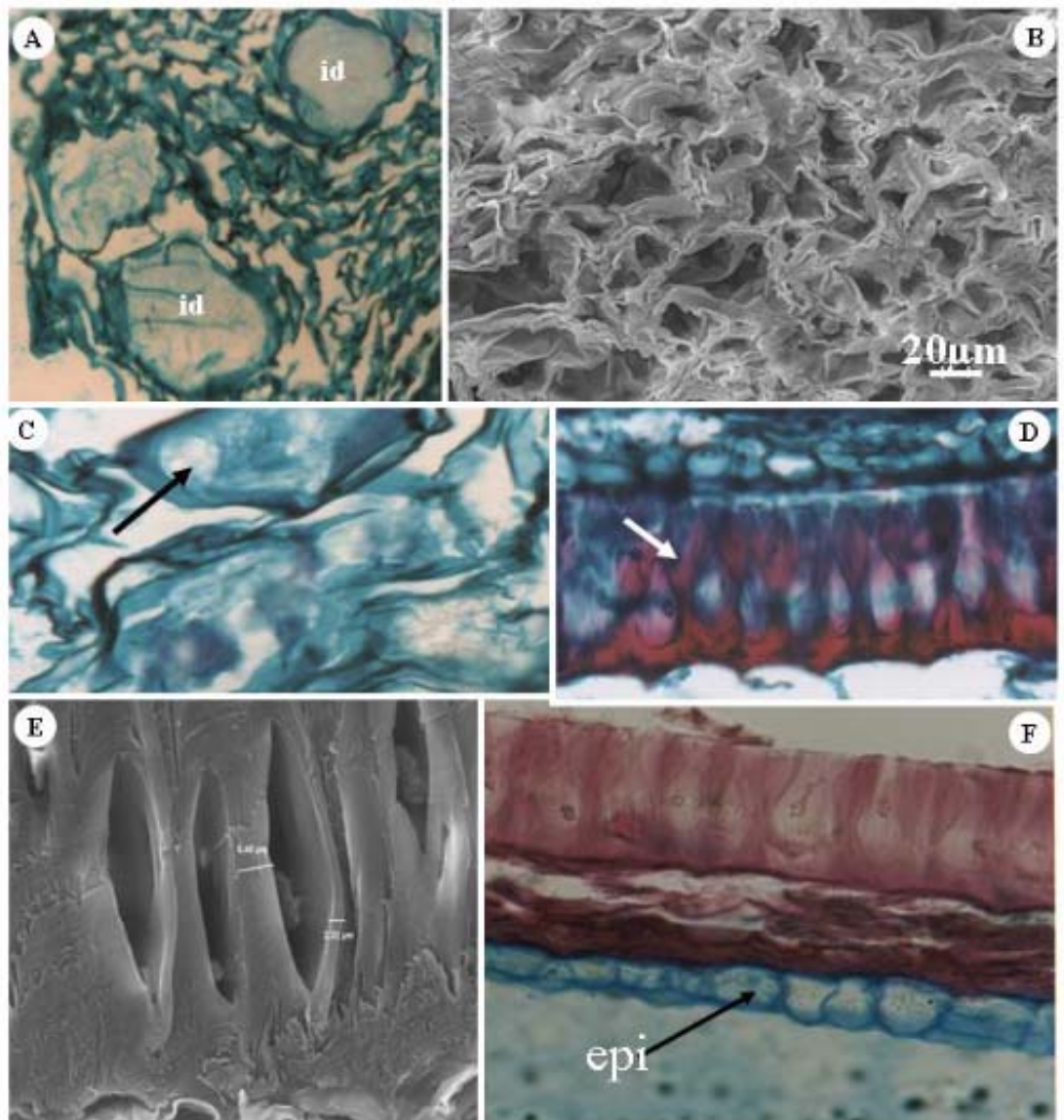


Figura 14- *T. speciosum*. **A**-sacos de mucilagem no tegumento externo (sm) (400x), **B**-parênquima do tegumento externo (MEV); **C**-detalhe das drusas nas células parenquimáticas (seta) (400x); **D**-camada de células esclerificadas (seta) (400x); **E**-camada de células esclerificadas (MEV); **F**-detalhe da epiderme interna do tegumento interno (epi) (400x).

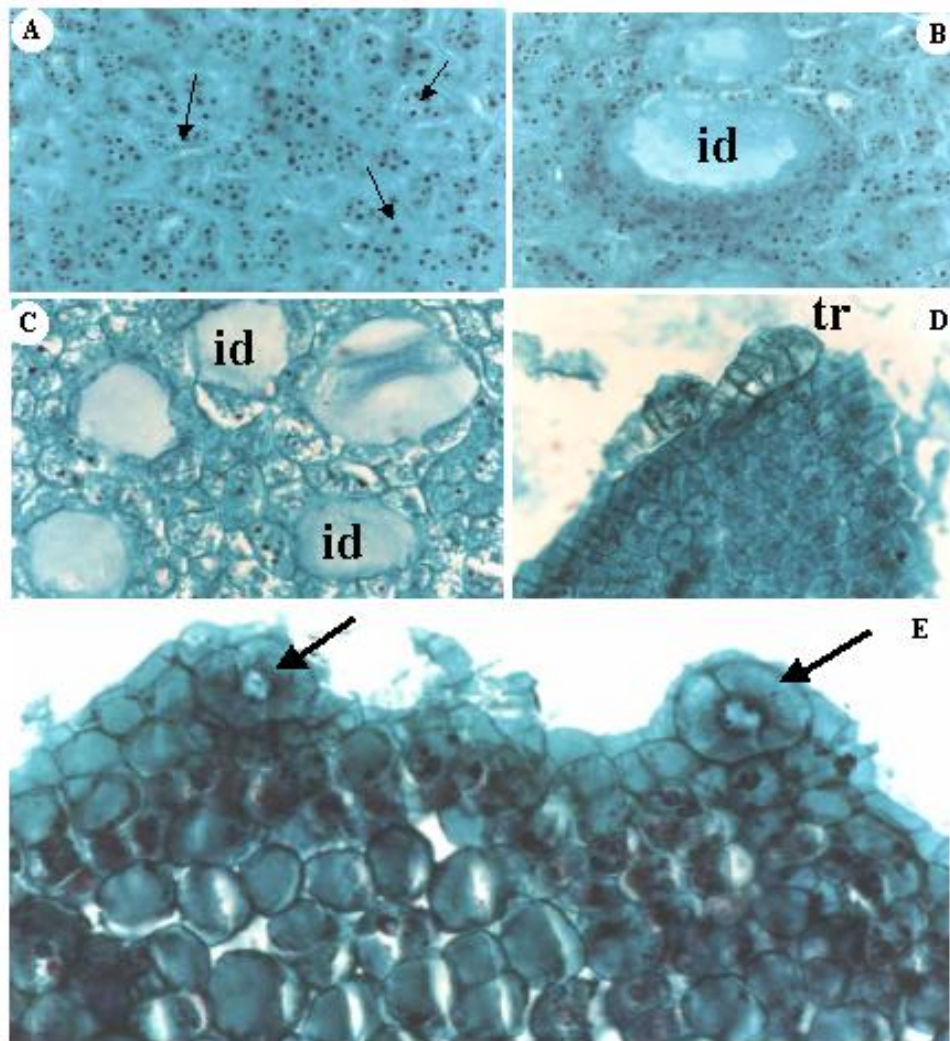


Figura 15- *T. speciosum*. **A**-células do parênquima cotiledonar com compostos fenólicos (seta) (400x); **B**-idioblastos (id) no parênquima cotiledonar com substâncias ácidas (400x); **C**-idioblastos (id) agrupados no parênquima cotiledonar (400x); **D**-tricomas (tr) glandulares com haste longa na epiderme cotiledonar (400x); **E**-estômatos (seta) na epiderme cotiledonar (400x).

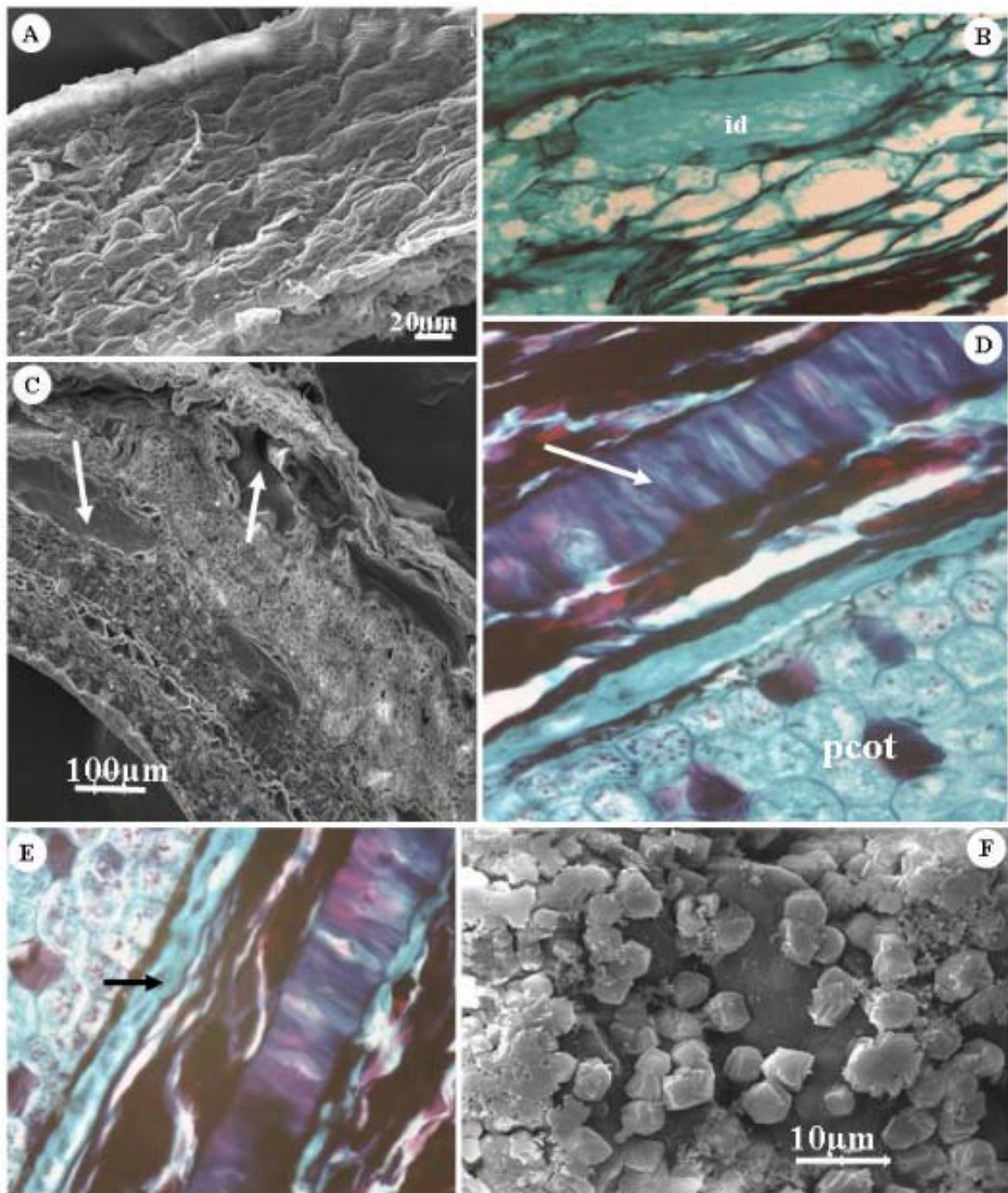


Figura 16- *T. subincanum*. **A**-superfície da epiderme externa do tegumento externo MEV; **B**- saco de mucilagem (sm) no parênquima do tegumento externo (200x); **C**-sacos de mucilagem (seta) MEV; **D**-camada de células esclerificadas (seta) e parênquima cotiledonar (pcot) 400x; **E**- epiderme interna do tegumento interno (seta) (400x); **F**-cristais na epiderme interna do tegumento interno (MEV).

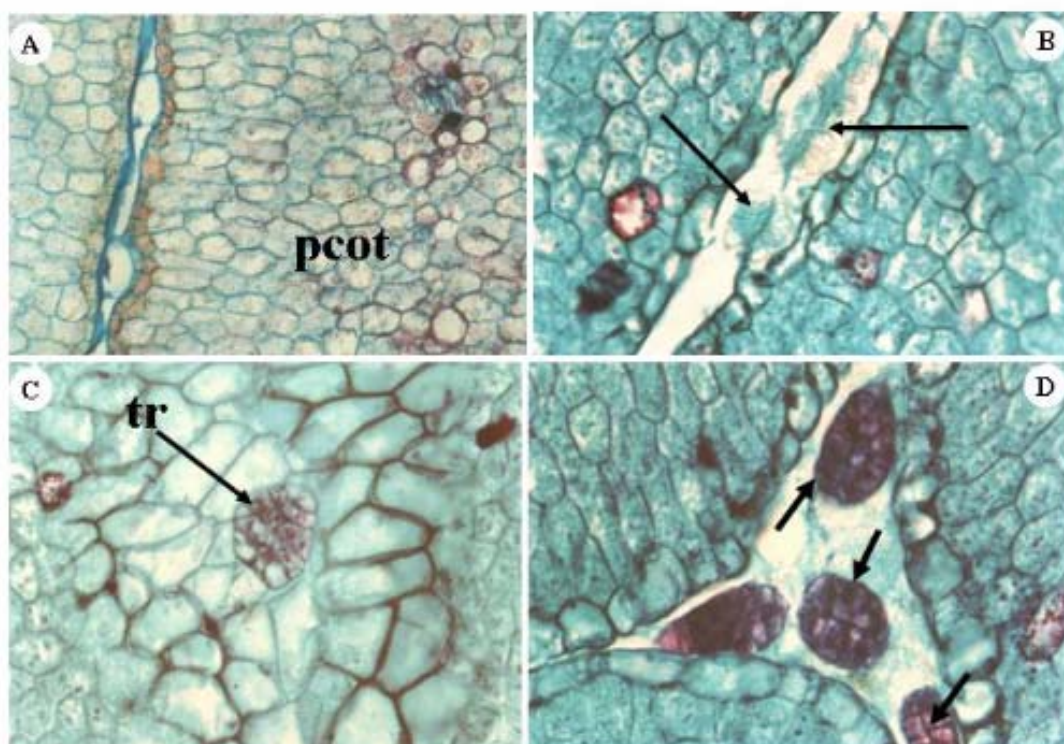


Figura 17- *T. subincanum*. **A-**parênquima cotiledonar (200x); **B-**drusas na epiderme cotiledonar (seta preta) (200x); **C-** tricomas (tr) glandulares na epiderme cotiledonar (400x); **D-**tricomas (tr) glandulares com formação de haste (seta) (400x).

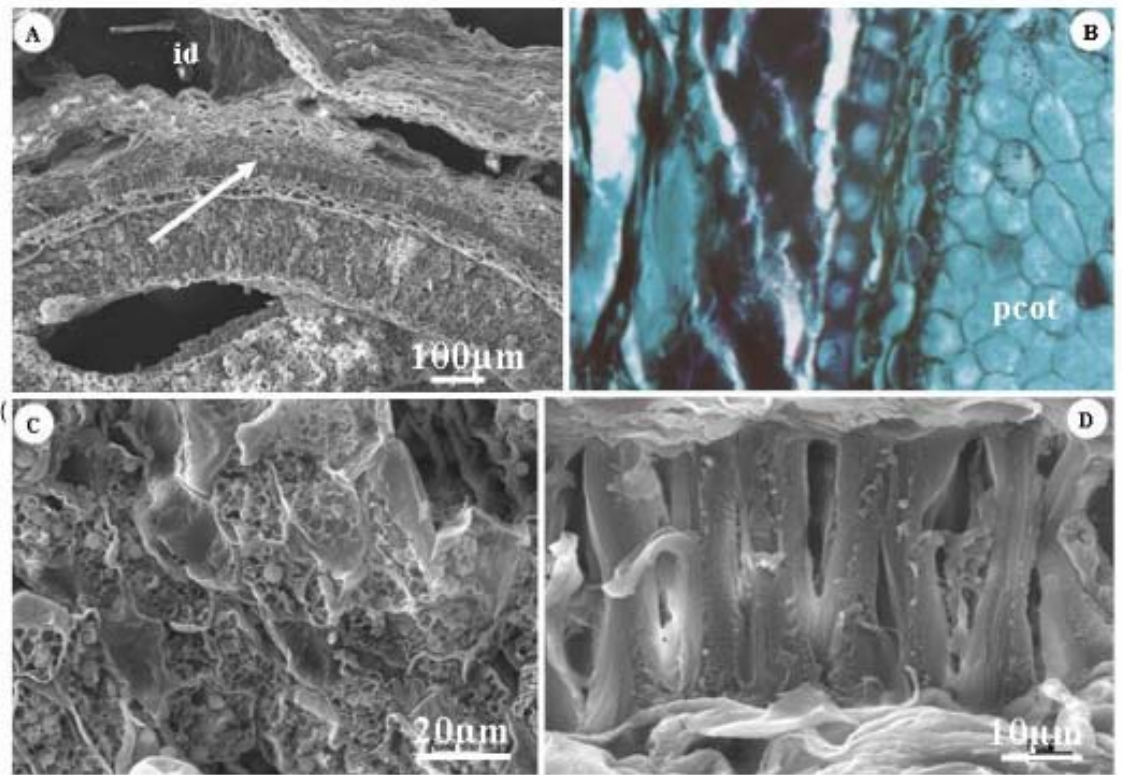


Figura 18- *T. obovatum* x *T. subincanum* **A-**idioblastos de mucilagem em MEV (id), camada de células esclerificadas (seta) MEV; **B-**células do parênquima cotiledonar (pcot) (200x); **C-**células do parênquima cotiledonar evidenciando grãos de amido em MEV; **D-**camada de células esclerificadas MEV.

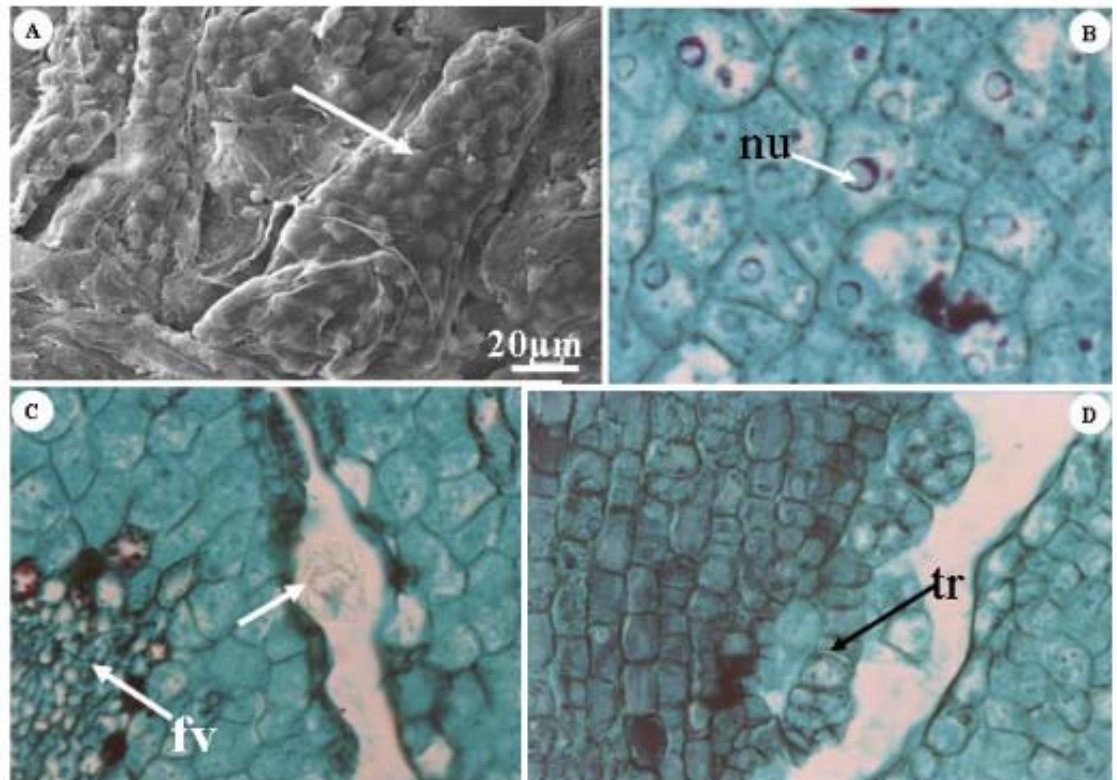


Figura 19 - *T. obovatum* x *T. subincanum*. **A**-estruturas de reserva encontradas no eixo hipocótilo-radícula (seta) MEV; **B**-células do parênquima cotiledonar com núcleos evidentes (seta) (400x); **C**-drusas entre a epiderme cotiledonar (seta menor) e feixes vasculares (fv) (400x); **D**-trichomas glandulares na epiderme cotiledonar (tr) (400x).

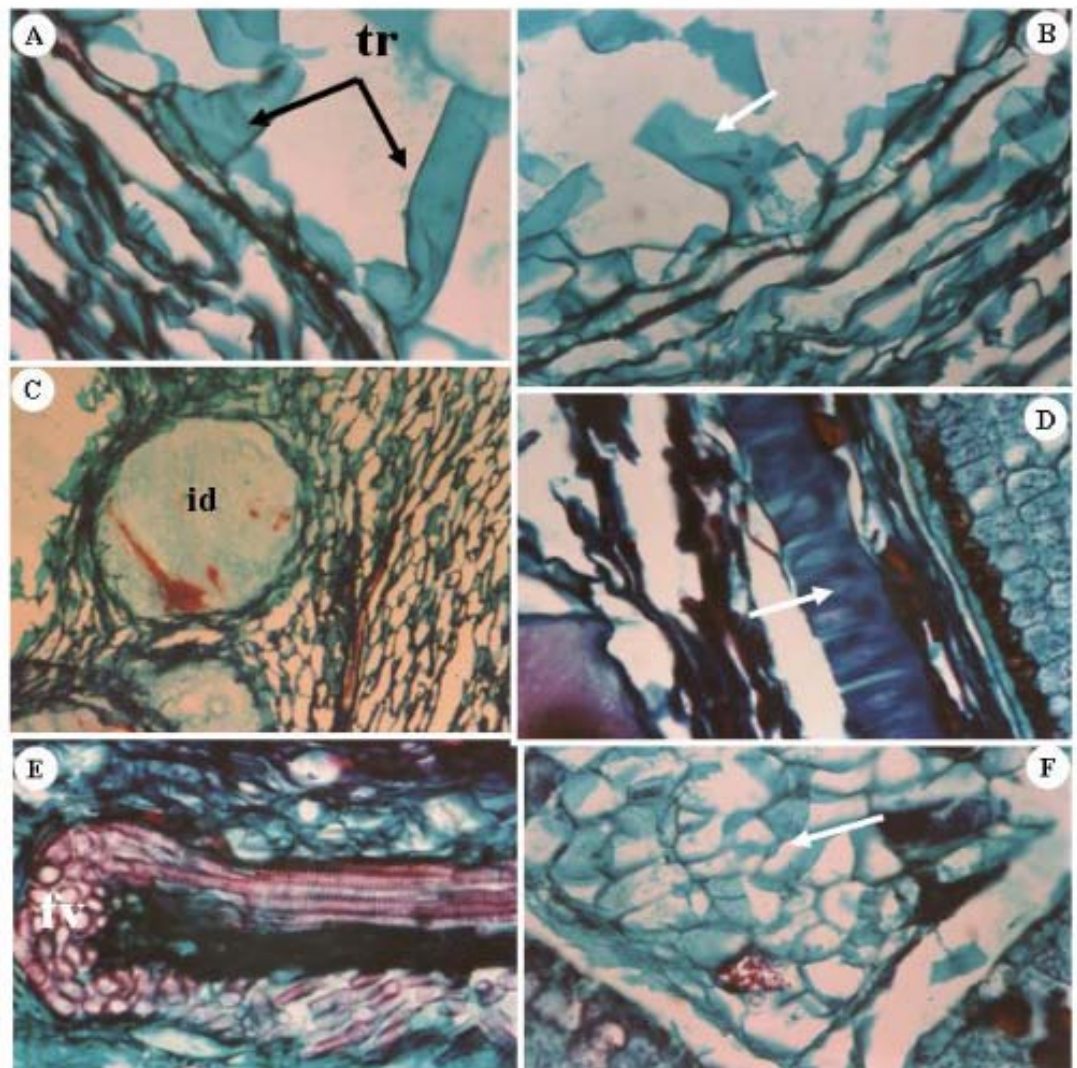


Figura 20- *T. grandiflorum* x *T. subincanum* **A-**tricoma (tr) na epiderme externa (400x); **B-** detalhe do tricoma na epiderme externa (seta) (400x); **C-**idioblastos no tegumento externo (100x); **D-**células esclerificadas (seta) (400x); **E-** feixes vasculares em secção longitudinal (fv) no parênquima (400x); **F-**resto de endosperma entre os cotilédones (seta) (400x).

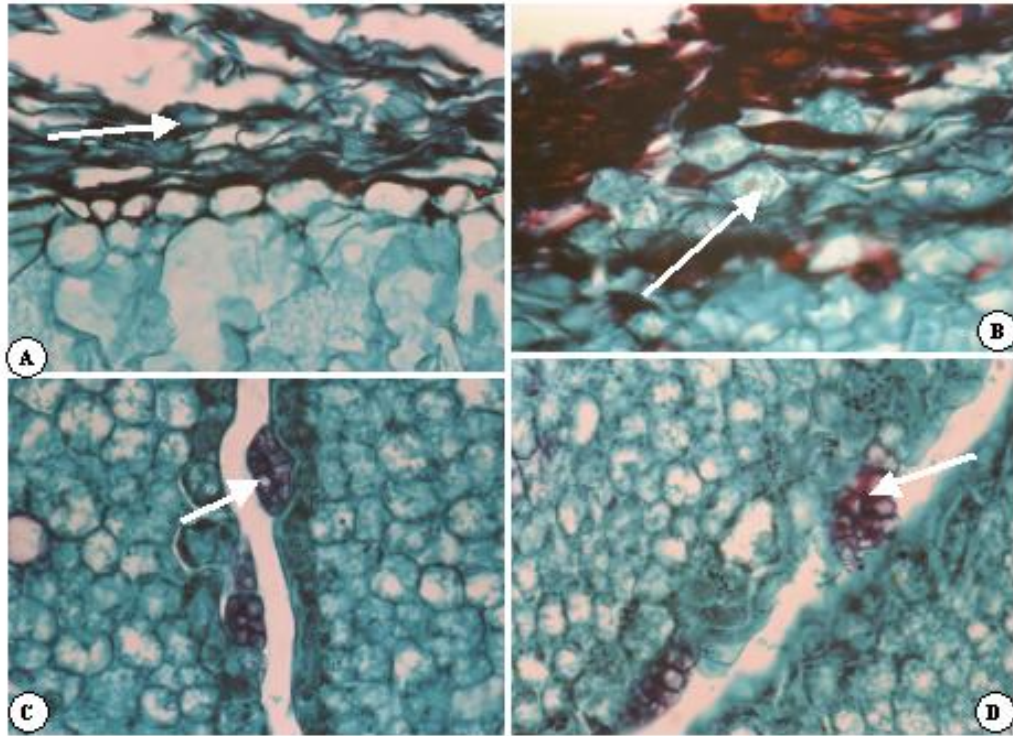


Figura 21- *T. grandiflorum* x *T. subincanum*. **A-** células do parênquima sub-epidérmico (seta) (100x); **B-** drusas no parênquima (seta) (400x); **C-** tricomas glandulares no epideme do parênquima cotiledonar (seta) (400x); **D-** tricomas glandulares na epideme cotiledonar com formação de haste longa (seta) (400x).

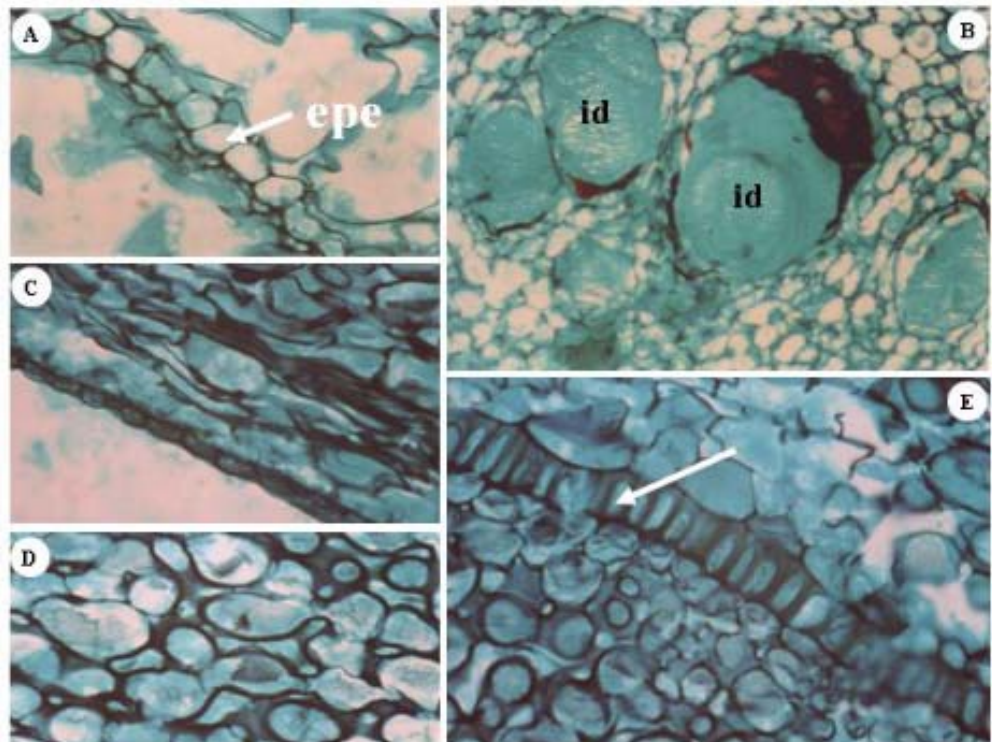


Figura 22– *T. grandiflorum* x *T. obovatum*. **A**-epiderme externa do tegumento externo (epe) (400x); **B**-idioblastos no tegumento (200x); **C** e **D**-detalhe das células do parênquima (400x); **E**-camada de células esclerificadas em paliçada (seta) (400x).

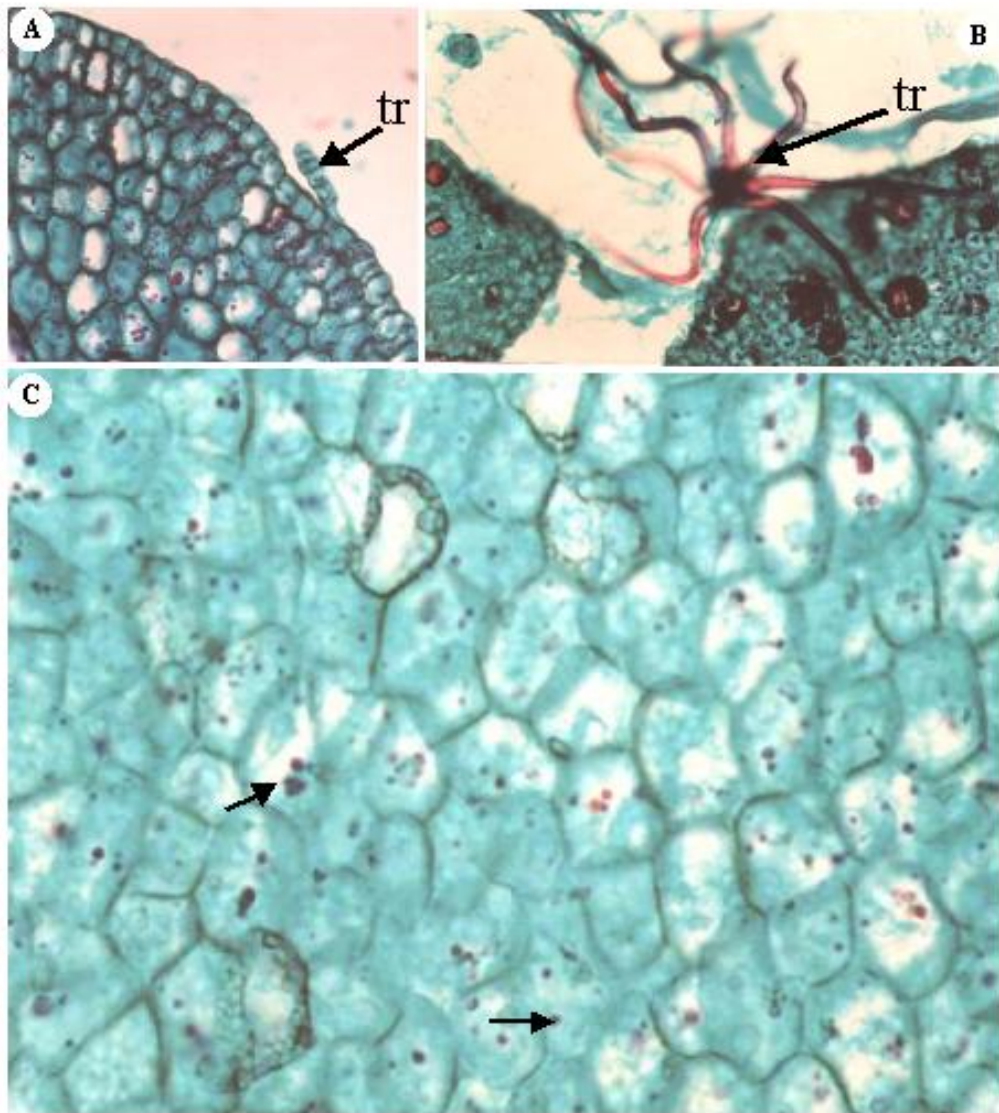


Figura 23- *T. grandiflorum* x *T. obovatum* **A-**tricoma glandular (tr) na epiderme cotiledonar (400x); **B-** tricoma (tr) estrelado na epiderme cotiledonar (200x); **C-** células do parênquima cotiledonar (seta), observar conteúdo fenólico (400x).

3. CAPÍTULO II

HISTOQUÍMICA DE SEMENTES DO GÊNERO *THEOBROMA* L. (STERCULIACEAE).

RESUMO-(Histoquímica de sementes do gênero *Theobroma* L. - Sterculiaceae). As substâncias de reserva em sementes são de grande importância, por representarem a principal fonte de energia para a germinação e o estabelecimento das plântulas além de outras aplicações tecnológicas na agroindústria. Neste trabalho, foram utilizadas técnicas de histoquímica para determinar a localização de proteínas totais e polissacarídeos. Os resultados da análise *in situ* do material de reserva mostram que os polissacarídeos ácidos são encontrados no tecido parenquimático do tegumento externo, em estruturas definidas como sacos de mucilagem. Nas regiões dos espaços intercotiledonares, observou-se, a presença de substâncias ácidas. Em *T. speciosum*, os polissacarídeos ácidos podem ser evidenciados entre as células do parênquima cotiledonar, além do tegumento externo. Os polissacarídeos neutros são sintetizados, principalmente, na forma de grãos de amido, no citoplasma das células do parênquima cotiledonar.

PALAVRAS CHAVES: idioblastos, parênquima cotiledonar, polissacarídeos, proteínas.

3.1. INTRODUÇÃO

Materiais de reserva podem ser acumulados em praticamente todos os tecidos da semente, podendo ser temporários ou permanecer até a germinação (WERKER, 1997). A autora mencionou que reservas similares, como proteínas e corpos lipídicos, podem ser diferentes na sua composição em diferentes partes da semente e que estas substâncias acumuladas na semente são características de cada taxon. Grãos de amido diferem principalmente na sua estrutura; corpos protéicos podem variar tanto na estrutura como na composição química e corpos lipídicos variam principalmente na composição química.

A distribuição destas substâncias é bastante variada. Dependendo da espécie podem ocorrer em diferentes tecidos, ou substâncias de diferentes naturezas podem ocorrer no mesmo tecido da planta. BEWLEY & BLACK (1994) citam que maior parte das reservas ocorrem dentro do embrião, geralmente os cotilédones, embora na castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) elas ocorram dentro do eixo hipocótilo/radícula. A ocorrência destas substâncias nos tecidos das sementes é ilustrada na tabela abaixo:

Tabela 2- Distribuição de substâncias de reserva em sementes:

<i>CULTURA</i>	<i>PRINCIPAL SUBSTÂNCIA DE RESERVA</i>	<i>TECIDO</i>
cevada	carboidratos	endosperma
milho	carboidratos	endosperma
castanha do Brasil	proteína	eixo hipocótilo/radícula
centeio	carboidratos	endosperma
cajú	proteína	cotilédones
feijão	carboidratos	cotilédones
pinho	carboidratos	megagametófito
soja	proteínas/carboidratos	cotilédones

Fonte: BEWLEY & BLACK (1994); LOTT (1984)

Métodos histoquímicos têm sido desenvolvidos para análises qualitativa e quantitativa de muitos componentes celulares, incluindo as proteínas, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e uma série de componentes iônicos presentes em soluções celulares (GAHAN, 1984).

Estes métodos, quando associados com várias técnicas de imagens microscópicas, podem ser utilizados na identificação e localização de muitas substâncias importantes nos tecidos de animais e plantas (GAHAN, 1984).

Em sementes endospermicas, o endosperma é referido como uma importante fonte de nutrientes para o embrião durante a germinação. Reservas de proteínas, carboidratos e lipídeos começam a ser formadas após o período inicial do crescimento mitótico. Proteínas são seqüestradas em corpos protéicos, carboidratos na forma de grãos de amido ou na composição da parede celular e lipídeos em corpos lipídicos ou oleaginosos (BEWLEY & BLACK, 1994).

OGUNNOYELA & ESAN (1984) observaram que lipídeos, carboidratos e proteínas representam as três principais classes de nutrientes orgânicos, substancialmente, retirados dos cotilédones durante a germinação.

Os estudos referentes à constituição química das sementes têm sido bastante destacados devido a importância que desempenham na alimentação humana. Cerca de 70% do que é consumido mundialmente, é originado diretamente de sementes (BOESEWINKEL & BOUMAN, 1984). Por esta razão a maioria das informações existentes na literatura é sobre espécies utilizadas na agricultura (arroz, trigo e soja) e pouco se sabe sobre espécies selvagens. No entanto, a busca por novas espécies de importância econômica tem aumentado o interesse pela composição química dos elementos de reservas presentes nas sementes, em especial de espécies não cultivadas (BEWLEY & BLACK, 1994).

BEWLEY & BLACK (1994) citam que, além dos constituintes químicos normais encontrados em todos os tecidos vegetais, as sementes possuem quantidades extras de reservas armazenadas como fonte de alimento para manter o crescimento das plântulas e destaca como principais os carboidratos e proteínas.

Carboidratos como material de reserva podem ser encontrados no embrião, principalmente nas células dos cotilédones e no endosperma ou perisperma, junto com outros tipos de reservas (WERKER, 1997). Segundo (BEWLEY & BLACK, 1994), o amido é o carboidrato de reserva mais comumente encontrado nas sementes. O amido é freqüentemente encontrado nos tegumentos das sementes. Em certos estágios do seu desenvolvimento é consumido e desaparece, embora algumas vezes pequenas quantidades remanescentes possam ser encontradas (WERKER, 1997).

As proteínas de reserva são diferentes das proteínas que atuam na constituição celular, pois são metabolicamente inativas (MAYER & POLJAKOFF- MAYBER, 1989). Em

sementes secas, as proteínas podem aparecer sob a forma de discretos corpos protéicos ou grãos de aleurona, limitados por uma membrana. Podem ser localizados no embrião ou no endosperma e na maioria das espécies são encontradas em ambos. Os corpos protéicos podem servir como material de reserva temporária nos estágios iniciais do desenvolvimento da semente, estas estruturas podem ser diferentes estruturalmente e quimicamente podendo ocorrer dentro da mesma célula ou em tecidos diferentes da semente (WERKER, 1997).

Segundo WERKER (1997), os principais materiais de reserva na semente madura são os corpos protéicos; os corpos lipídicos ou oleossomos (substâncias lipofílicas) e carboidratos na forma de amido ou como constituintes da parede celular. BEWLEY & BLACK (1994) afirmam que as reservas alimentares encontram-se depositadas dentro do embrião, geralmente, nos cotilédones, embora na Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) estas reservas ocorram dentro da radícula/hipocótilo ou dentro de tecidos extra-embriônicos. O autor cita que diferentes reservas podem ser armazenadas em diferentes tecidos. O endosperma pode ser uma fonte exclusiva de carboidratos, enquanto cotilédones contêm proteínas e lipídeos.

As reservas de carboidratos, lipídeos e proteínas presentes nas sementes são utilizadas pelo embrião como fonte de energia e substrato para estruturas celulares. A utilização de amido ou de açúcares solúveis, dependendo da espécie, é variável, podendo ocorrer durante a germinação ou no estágio de plântulas (BEWLEY & BLACK, 1994).

Com relação às espécies de *Theobroma*, LENCI (2002), através de técnicas de citoquímica utilizando corantes específicos, localizou nos cotilédones destas espécies a presença de grupos radicais sulfatados e carboxilados, polissacarídeos neutros, material protéico e reservas lipídicas. Segundo a autora, através de análises químicas das sementes, ficou evidenciado que existem diferenças na composição do principal composto de reserva. Em *T. microcarpum*, os principais compostos são os carboidratos, enquanto que em *T. cacao* e *T. obovatum* os lipídeos são os principais.

CUNHA *et al* (1997), estudaram as alterações que ocorreram na estrutura celular das amêndoas de *Theobroma grandiflorum* durante o processo fermentativo. Este autor cita que o Azul de Toluidina e o Xilidine Ponceau, evidenciaram uma redução na camada parenquimática durante este processo. O autor ainda cita que a principal substância de reserva nos cotilédones de *T. grandiflorum* possa ser lipídeos e que o material estudado também apresentou abundância de proteínas.

Pesquisas histoquímicas têm demonstrado a importância destas substâncias no metabolismo das sementes, principalmente, durante a formação, desenvolvimento e estabelecimento das plântulas. Embora o gênero *Theobroma* tenha sido alvo de estudos de morfologia clássica e técnicas de biologia molecular que serviram de subsídios para a definição de sua taxonomia, dados referentes aos aspectos histoquímicos com esta finalidade ainda são muito restritos. Devido à importância econômica de algumas espécies deste gênero trabalhos foram desenvolvidos com *Theobroma cacao* que é a espécie atualmente mais explorada e conhecida. Suas sementes apresentam de 15 a 20% de proteína em peso seco, e cerca de 50% de gordura (BIEHL *et al*, 1982; SPENCER & HODGE, 1992 *apud* SILVA, 2000). Estes dados foram obtidos a partir de análise química, no entanto, nada consta sobre estudos a respeito das características histoquímicas das sementes.

FIGUEIRÊDO *et al* (2001) utilizando métodos bioquímicos e fisiológicos determinaram a quantidade de amido, açúcares totais e redutores em cotilédones, raízes e folhas de plântulas de *T. grandiflorum*. LENCI (2002) caracterizou histoquimicamente e anatomicamente os cotilédones de *T. cacao*, *T. microcarpum* e *T. obovatum*.

De uma maneira geral os dados existentes na literatura ainda são recentes e limitados no que se refere a trabalhos de histoquímica aplicados a sementes tropicais. Sabendo da importância destas informações na elaboração de processos tecnológicos e para o melhor conhecimento da biologia destas espécies, este trabalho teve como objetivo, caracterizar histoquimicamente as principais substâncias de reserva nas sementes maduras do gênero *Theobroma* por meio de utilização de técnicas de histoquímica vegetal.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. HISTOQUÍMICA

Foram utilizados frutos maduros, provenientes da Coleção de *Theobroma* “Addison O’Neill” e do Banco ativo de germoplasma de cupuaçuzeiro ambos pertencentes à Embrapa Amazônia Oriental, na cidade de Belém no Estado do Pará. Para a análise histoquímica o material foi fixado em uma solução de Glutaraldeído 2,5% em Tampão Fosfato 0,1 M (pH 7,2) por 24 horas a 4°C (RUZIN, 1999). O material foi lavado três vezes na mesma solução tampão, em seguida, desidratado em série alcoólica-etílica e posteriormente incluído em parafina histológica. Este material foi seccionado em cortes transversais e longitudinais na espessura de 8µm a 12µm. A desparafinização foi efetuada usando uma bateria de xilol-etanol e submetidas aos seguintes testes histoquímicos:

A-AZUL DE TOLUIDINA (AT-O): Este corante foi usado para identificar polissacarídeos ácidos, através da reação de metacromasia. As lâminas contendo os cortes foram tratadas com uma solução aquosa de AT-O 0,5% acidificada com HCl 1N para pH 3,0 por 5 minutos, lavadas em água destilada, desidratadas em uma série etílica, seguida de um banho em xilol e montadas com Bálsamo do Canadá. (GORDON & McCANDLESS, 1973; McCULLY, 1970).

B-AZUL DE ALCIAN (AB): Esta solução foi usado para detecção de polissacarídeos ácidos. Os cortes foram corados por 24 horas em solução aquosa de AB 8 GX a 1%, ajustado com HCl 1N-pH 0,5 (PEARSE, 1985), em seguida foram desidratadas em álcool-xilol e montadas com Bálsamo do Canadá.

C-ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS): Usado para identificar polissacarídeos neutros. Os cortes foram oxidados com solução aquosa de ácido periódico a 1% durante 10 minutos, lavados em água corrente e corados com o Reativo de Schiff por 20 minutos. Foram então lavados em água corrente, desidratados em álcool-xilol e montados com bálsamo do Canadá. Como controle negativo o mesmo material foi corado sem a passagem pela oxidação com o ácido periódico (GAHAN, 1984).

D-AZUL BRILHANTE DE COMASSIE (CBB): O CCB (Azul brilhante de Comassie 250 R) é proposto como corante quantitativo para proteínas totais em células vegetais (GAHAN, 1984). As lâminas contendo os cortes foram coradas por 24 horas em CBB 0,02% diluídas em solução etanólica acidificada de Clarke, posteriormente, lavadas na mesma solução, seguida de passagem em água destilada, desidratadas em álcool-xilol e montadas com Bálsamo do Canadá (GAHAN, 1984).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. CARACTERIZAÇÃO HISTOQUÍMICA DAS SEMENTES MADURAS

Os testes histoquímicos para proteínas totais, polissacarídeos ácidos e neutros demonstraram uma grande variação entre espécies e diferentes tecidos. Abaixo temos as reações descritas para cada espécie, de acordo com a análise citoquímica utilizada.

Theobroma grandiflorum.

Para a localização de carboidratos neutros, foi utilizado o PAS. Através dos resultados podemos afirmar que os carboidratos encontram-se principalmente na forma de grãos de amido, nas células do parênquima cotiledonar e como constituintes da parede celular, indicando a presença de celulose (Figura 1 A e B).

Quando submetida a reação de CBB, as células do parênquima cotiledonar reagiram positivamente. As células desta região evidenciaram núcleos grandes e parietais, sendo algumas células binucleadas (Figura 1 C). Os tricomas reagiram positivamente ao teste com CBB, permitindo visualizar a delimitação celular destas estruturas. As células que constituem os tegumentos não reagiram para este teste.

A região do eixo embrionário, mostrou-se positiva ao CBB, com as células evidenciando granulações protéicas no citoplasma (Figura 1 D). As células da epiderme cotiledonar, também, reagiram positivamente ao CBB, entretanto, não foi observada presença de corpos protéicos. As proteínas encontram-se principalmente na forma de granulações dispersas no citoplasma, com agregados protéicos no núcleo. Também ficou evidenciado a presença de idioblastos com corpos lipídicos (Figura 1 C e D).

Esta espécie, quando submetida ao AT-O, apresentou forte reação metacromática na região do tegumento externo, onde estão localizados os sacos de mucilagem, evidenciando que o conteúdo existente nestas estruturas, é um polissacarídeo ácido, provavelmente mucopolissacarídeo (Figura 2 A). A presença de polissacarídeos ácidos na região dos sacos foi confirmada através da reação positiva ao AB (Figura 2 B).

Em *T. grandiflorum*, a região central do eixo hipocótilo-radícula, mostrou-se fortemente metacromático ao AT-O mostrando a existência destas substâncias ácidas também nesta região, e não somente no tegumento externo (Figura 2 C). A mesma região reagiu positivamente ao AB, mostrando seu citoplasma fortemente positivo (Figura 2 D). A região

correspondente aos espaços intercotiledonares é preenchida por substâncias ácidas que reagiram ao AT-O e ao AB, indicando tratar-se provavelmente de mucilagem.

Podemos ressaltar que embora não tenham sido executadas análises para a localização de lipídeos, foi possível a sua localização em *T. grandiflorum*, em idioblastos nas células do parênquima cotiledonar (Figura 1 C e D).

Theobroma subincanum

Na análise para a detecção de polissacarídeos ácidos, os sacos de mucilagem no tegumento externo, mostraram forte reação de metacromasia ao AT-O. Esta espécie possui uma camada mucilagínosa localizada entre os cotilédones, quase adnata à epiderme cotiledonar (Figura 3 A). Tais observações foram confirmadas pelo teste feito com o AB (Figura 3B e C).

Esta espécie, ao ser submetida ao CBB, evidenciou grande quantidade de material protéico no citoplasma das células do parênquima cotiledonar (Figura 3 D). Na região cotiledonar mais externa (próximo ao tegumento externo), observou-se grande quantidade de granulações protéicas, preenchendo quase que totalmente o citoplasma destas células. Na porção mais interna, estas granulações mostram-se mais evidentes, maiores e com formato esférico, podendo-se observar alguns corpos protéicos (Figura 4 A e B). Assim Como em *T. grandiflorum* não foram observados materiais protéicos nos tecidos dos envoltórios seminais. Também foram observados idioblastos com corpos lipídicos no parênquima cotiledonar (Figura 4 A).

Na determinação de carboidratos neutros com a utilização do PAS, na região correspondente ao parênquima cotiledonar e ao nível de parede celular, foi evidenciado grande quantidade de grãos de amido (Figura 4 C e D).

Theobroma speciosum

Esta espécie quando tratada com o AB foi evidenciado reações positivas nos sacos de mucilagem do tegumento externo (Figura 5 A).

Na análise com o AT-O, foram registradas reações de metacromasia nos sacos de mucilagem do tegumento externo (Figura 5 B) desta forma corroborando com os resultados obtidos com o AB.

As células do parênquima cotiledonar, mostraram-se PAS positivas. A principal reserva de carboidratos ocorre na forma de grãos de amido, que nesta espécie (em especial),

mostrou-se elevada, com grãos muito grandes em relação às outras espécies estudadas. Também observou-se reações positivas na parede celular (Figura 6 A e B).

T. speciosum mostra uma peculiaridade em relação as outras espécies estudadas. A região do parênquima cotiledonar quando submetida ao AB mostra uma quantidade grande de idioblastos com reação positiva, demonstrando um conteúdo citoplasmático semelhante aos sacos de mucilagem (Figura 6 C e D). Esta mesma região reagiu metacromaticamente ao AT-O, mostrando tratar-se de substâncias ácidas (Figura 6 E).

Quando submetida ao CBB, o citoplasma das células do parênquima cotiledonar evidenciou granulações protéicas muito pequenas comparadas com as outras espécies estudadas. O citoplasma destas células é ocupado por uma grande quantidade de granulações de origem não protéica, que não foi identificado neste estudo (Figura 6 F). No tegumento desta espécie, também, não foi registrado a presença de corpos protéicos, ou outro tipo de estrutura da mesma natureza.

Theobroma obovatum

Com o teste do AB (Figura 7 A) e AT-O (Figura 7B), foram registradas reações positivas nos sacos de mucilagem do tegumento externo (Figura 7 A e B) e em algumas regiões nos espaços intercotiledonares.

As reações ao CBB, seguiram o mesmo padrão das espécies anteriores. As reservas protéicas são observadas na forma de granulações, restritas ao citoplasma das células do parênquima cotiledonar. Assim como nas outras espécies não foram observados corpos protéicos nos tecidos dos tegumentos (Figura 7 C e D).

Quando utilizado o PAS, os maiores indicativos de carboidratos neutros, ocorreram sob a forma de grãos de amido, restritos à região do parênquima cotiledonar e na parede celular destas células (Figura 7 E e F).

Os Híbridos

Theobroma grandiflorum* x *Theobroma obovatum

Quando submetidos ao AB (Figura 8 A) e AT-O (Figura 8 B e C) os sacos de mucilagem no tegumento externo mostraram seu citoplasma fortemente reativo.

No teste com o AT-O este híbrido evidenciou o conteúdo citoplasmático dos sacos de mucilagem com forte reação de metacromasia (Figura 8 B e C).

Os carboidratos neutros, evidenciados com o uso do PAS, ocorrem sob a forma de grãos de amido, principalmente no citoplasma das células do parênquima cotiledonar e como nas espécies anteriores, também em nível de parede celular (Figura 8 D e E).

A presença de proteínas e corpos protéicos investigada com o uso do CBB, mostrou que a região correspondente ao tegumento externo onde estão localizados os sacos de mucilagem, não houve reação positiva. As proteínas ficaram restritas à região do parênquima cotiledonar sob a forma de granulações dispersas no citoplasma (Figura 8 F). Estas podem ocorrer isoladas ou agrupadas. Nota-se uma distribuição desigual destas granulações entre as células estando em maior concentração na região mais externa do parênquima cotiledonar. As células da epiderme cotiledonar também mostraram-se fortemente positivas ao CBB.

Theobroma subincanum* x *Theobroma obovatum

Ao ser submetido ao AT-O, houve reação de metacromasia nos sacos de mucilagem do tegumento externo (Figura 9 A). A região central do eixo hipocótilo-radícula indica a presença de polissacarídeos ácidos, devido à intensa reação metacromática observada nesta região (Figura 9 B).

Com o AB as reações foram positivas nas mesmas estruturas ou seja, os sacos de mucilagem (Figura 9 C) e na região central do eixo hipocótilo-radícula (Figura 9 D).

A reação do PAS demonstra que a principal fonte de carboidratos, ocorre sob a forma de grãos de amido presentes no citoplasma das células do parênquima cotiledonar (Figura 10 A e B).

No híbrido *T. subincanum* x *T. obovatum*, as células do parênquima do tecido cotiledonar mostraram-se fortemente positivas ao CBB, apresentando uma distribuição desigual das granulações protéicas nas diferentes regiões do cotilédone. Algumas regiões mostram-se mais reativas que as outras. Nas regiões onde a reação foi mais fortemente positiva, nota-se a presença de estruturas protéicas mais arredondadas (Figura 10 C e D). Como nas espécies anteriores, não foram observadas estruturas protéicas na região dos tegumentos.

T. grandiflorum* x *T. subincanum

Os sacos de mucilagem existentes no tegumento externo e o eixo hipocótilo-radícula, mostraram reação metacromática, quando em contato com o AT-O respectivamente (Figura 11 A e B) e (Figura 12 D).

As estruturas citadas acima também tiveram reação positiva, quando submetidas ao AB (Figura 11 C).

No híbrido *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, quando analisadas com o CBB, mostra que as células dos envoltórios seminais coram-se levemente e somente no limite celular, sem mostrar uma reação positiva no citoplasma. A presença de proteínas totais é observada apenas no citoplasma das células do parênquima cotiledonar na forma de granulações (Figura 12 A), não sendo observadas formações de corpos protéicos. As células da epiderme cotiledonar mostram-se fortemente positivas. Os núcleos foram bem evidenciados, sendo que, em algumas células, estas granulações estão aderidas à parede celular.

Na reação para carboidratos neutros com a utilização do PAS, os sacos de mucilagem, reagiram positivamente, além dos polissacarídeos já evidenciados pelo AT-O e pelo AB (Figura 11 C). Apesar destas estruturas terem reagido positivamente, a maior ocorrência de carboidratos neutros é encontrada na forma de amido, no citoplasma das células do parênquima cotiledonar (Figura 12 B e C). Também se observou, nesta região a presença de idioblastos contendo corpos lipídicos (Figura 12 C).

3.4. DISCUSSÃO

A localização de polissacarídeos ácidos, polissacarídeos neutros e proteínas não segue um padrão nas espécies analisadas, embora, existam semelhanças na distribuição, na composição e na estrutura destes compostos.

Segundo WERKER (1997) na germinação, antes do embrião começar a fotossintetizar ou obter de outra maneira sua própria nutrição, é necessário uma fonte de nitrogênio proveniente das proteínas que se encontram usualmente na forma de corpos protéicos, e uma fonte de energia geralmente através dos carboidratos. Nas espécies estudadas, a utilização de técnicas de histoquímica permitiu uma visualização da distribuição de polissacarídeos e proteínas totais nos tecidos das sementes maduras de *Theobroma*. Como nas espécies estudadas o endosperma foi praticamente todo consumido durante o desenvolvimento da semente, as reservas passam a serem depositadas em outros tecidos, como o parênquima cotiledonar e no tegumento externo.

3.4.1. POLISSACARÍDEOS NEUTROS

A reação de PAS é utilizada para a identificação de polissacarídeos neutros, porque requer a presença de grupos 1,2-glicol geralmente presentes nas moléculas de celulose e amido que são oxidados para aldeídos pelo ação do ácido periódico (TRICK & PUESCHEL, 1990). Em todas as espécies analisadas pode-se observar grãos de amido nas células do parênquima cotiledonar. A reação do PAS deixa bem evidenciado que este carboidrato também está presente na composição da parede celular, pois em todas as espécies, a reação na parede é bastante acentuada. Embora possa parecer óbvio que as paredes celulares reajam ao PAS, devido a presença da celulose, devemos lembrar da existência de polissacarídeos de reserva de parede celular e que em algumas espécies podem constituir o principal carboidrato de reserva. De acordo com BUCKERIDGE & REID (1996), os polissacarídeos de reserva de parede celular encontrados em sementes, possuem também a função de reserva, pois são degradados após a germinação da semente e seus produtos utilizados como fonte de energia para o crescimento inicial das plântulas. Estes polissacarídeos podem também desempenhar funções secundárias entre as quais o controle da embebição e distribuição de água nos tecidos das sementes e expansão celular dos cotilédones. WERKER (1997) também cita que

em certas tribos de Leguminosae a parede celular, das células do endosperma quando bem desenvolvido ou dos cotilédones possuem carboidratos de reserva, enquanto em outras tribos somente o amido serve como material de reserva. Nas espécies estudadas as células parenquimáticas do tegumento não se mostraram reativas quando submetidas ao PAS, ficando esta reação restrita as células do parênquima cotiledonar. WERKER (1997) cita que o amido é encontrado em tegumentos nos estágios iniciais de desenvolvimento da semente, sendo posteriormente consumido e desaparece na semente madura ou permanece em pequenas quantidades.

O amido é depositado em organelas intracelulares, denominadas amiloplastos. Em geral, seus grãos são semicristalinos e exibem birrefringência em forma de cruz de malta quando submetidos à luz polarizada (BANKS & MUIR, 1980 *apud* AMARAL, 2001). O formato dos grãos pode variar desde formas mais esféricas até aquelas bastante elípticas. A forma do grão de amido, em grande parte é determinada pelo conteúdo de amilose, pois o grão de amido se torna mais esférico na medida em que ocorre um aumento do conteúdo de amilose, em relação ao de amilopectina (BEWLEY & BLACK, 1994). Nas espécies analisadas, a forma dos grãos segue um padrão esférico, com exceção em *T. speciosum*, onde os grão são relativamente maiores em relação as outras espécies analisadas, chegando a constituir praticamente quase todo o citoplasma. Além disso possuem uma morfologia diferenciada. A forma como eles se apresentam nos leva a pensar que trata-se de grãos compostos, que foram se agrupando. No centro destes grãos nota-se a presença de uma estrutura parecida com um cristal. Estas características permitem diferenciar esta espécie das outras que foram analisadas.

Segundo WERKER (1997), em algumas espécies como em *Phoenix dactylifera*, durante a maturação da semente, a parede celular das células perdem a capacidade de se tornarem PAS positivas, fato que se deve ao espessamento da parede na semente adulta. Neste trabalho as espécies responderam bem ao teste, demonstrando que o teste do PAS é eficaz na identificação de polissacarídeos neutros em sementes maduras de *Theobroma* e nos três híbridos analisados.

3.4.2. POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS

Mucilagens são encontradas nas sementes e frutos em um grande número de espécies. Segundo GRUBERT (1981) cerca de 80 famílias de dicotiledôneas possuem espécies cujas as

sementes contem mucilagem. Para WERKER (1997) a mucilagem nas sementes pode estar presente no tegumento e endosperma, e algumas vezes no embrião, geralmente em idioblastos. De acordo com a autora, a presença de mucilagem em ductos ou sacos é um fato raro. A mucilagem quando presente no tegumento difere entre as espécies principalmente na composição, localização e função. WERKER (1997) define mucilagem como heteropolissacarídeos de alto peso molecular com poder de absorção de água e formação de gel. Para WERKER (1997) esta atividade indica que as mucilagens contém consideráveis quantidades de ácido galacturônico não esterificado. As mucilagens também podem ser ácidas com ácidos urônicos ou neutros com ausência deles. As reações de metacromasia que foram observadas com a utilização de AT-O e AB, nos sacos de mucilagem e nos espaços intercotiledonares, indicam a presença de substâncias ácidas.

A metacromasia provocada pelo Azul de Toluidina funciona como um indicador de polissacarídeos ácidos (BOUZON, 1999). As propriedades citoquímicas das estruturas referidas, como sacos de mucilagem, reagiram, metacromaticamente, ao Azul de Toluidina e coraram-se com o Alcian Blue, indicando que esta região é rica em polissacarídeos sulfatados (PARKER & DIBOLL, 1966 *apud* BOUZON, 1999).

As espécies, quando foram submetidas ao AT-O, mostraram uma forte reação metacromática na região do tegumento externo, onde estão localizados os sacos de mucilagem. Estas mesmas estruturas evidenciaram uma reação positiva quando em contato com o Alcian Blue. Desta forma os resultados com o uso do Alcian Blue corroboram os resultados mostrados com AT-O.

As reações de parede celular com AT-O diferem quantitativamente e qualitativamente, segundo as diferentes frações ácidas dos polissacarídeos (SCOTT & DORLING, 1965 *apud* BOUZON, 1999). Em algumas espécies a parede celular mostrou-se levemente metacromática, possivelmente devido a presença de substâncias pécicas.

O Alcian Blue é bastante documentado na literatura de histoquímica animal com função de diferenciar polissacarídeos ácidos sulfatados e carboidratos (PEARSE, 1968 *apud* BOUZON, 1999). A sua aplicação na indicação de polissacarídeos ácidos, foi evidenciada nos sacos de mucilagem e na região central do eixo hipocótilo-radícula.

3.4.3. PROTEÍNAS

As proteínas podem ser localizadas nos tecidos ou células vegetais de duas formas: utilizando técnicas que demonstram o conjunto de todas as proteínas ou técnicas que coram aminoácidos específicos.

BOUZON (1999) afirma que as proteínas são os principais constituintes estruturais das organelas celulares e estão presentes no citoplasma, como moléculas envolvidas em diversas rotas metabólicas.

As células do parênquima cotiledonar das espécies estudadas evidenciaram muitas granulações protéicas no citoplasma das células, no entanto, não foram encontrados corpos protéicos que são comuns em sementes, como referidos por LOTT (1981) e observado por ALEMANO *et al* (1997) em embriões zigóticos de *T. cacao*.

AMARAL *et al* (2001) realizaram um estudo citoquímico de algumas espécies de *Theobroma*, onde identificaram proteínas e outros constituintes celulares.

As proteínas nas sementes servem como suprimento de nitrogênio necessário para o estabelecimento das plântulas. Estas reservas, usualmente, são encontradas na forma de corpos protéicos, geralmente, chamados de grãos de aleurona (BOESEWINKEL & BOUMAN, 1984). Podem ser classificados em um ou mais de três tipos comuns em relação à sua estrutura. Corpos contendo somente proteínas amorfas, corpos com cristais globóides embebidos em proteínas amorfas e corpos com ambos os cristais globóides e proteínas cristalóides embebidas em proteínas amorfas (LOTT, 1981).

Depósitos de proteínas, mesmo livres no citoplasma ou envolvidos por uma membrana, têm sido registrados em muitos tecidos de plantas (LOTT, 1981). O estudo do armazenamento de depósitos de proteína vegetal relacionadas a corpos protéicos em sementes tem sido de grande interesse para muitas angiospermas e gimnospermas, pois são responsáveis por fornecerem compostos nitrogenados e minerais para o estabelecimento das plântulas (LOTT, 1981).

Em muitas dicotiledôneas, o volume de armazenamento das proteínas em sementes está contido nos cotilédones. Corpos protéicos diferem em sua complexidade estrutural. Algumas diferenças estruturais podem ser encontradas dentro de uma célula ou dentro de diferentes regiões das sementes (LOTT, 1981). Nas espécies estudadas, podemos observar que a distribuição destas granulações protéicas é bastante diferenciada entre as espécies. Umhas possuem bastante granulações de tamanho reduzido, enquanto outras possuem poucas granulações, mas com o formato e tamanho de um corpo protéico.

Os compostos fenólicos atuam durante o processo de fermentação do cacao. Estes compostos encontram-se dentro das células do cotilédone, localizados no interior de vacúolos. Eles são necessários para a formação do “flavor” e atualmente existe um grande interesse nos polifénóis do cacao devido sua atividade antioxidante e possíveis benefícios a saúde (BRITO *et al*, 2002). Compostos fenólicos, estão presentes nas sementes de *Theobroma* dentro de idioblastos que possuem um vacúolo bem evidenciado. A literatura relaciona estes compostos com a ação anti-herbivoria e fungistática, além disso estes compostos participam na formação de complexos de alto peso molecular com os alcalóides teobromina e cafeína, além de entrarem na composição do tegumento externo (ZOBEL, 1996).

3.5. CONCLUSÃO

- Através de técnicas histoquímicas utilizadas foi possível identificar carboidratos e proteínas nas células do tegumento externo e do parênquima cotiledonar.
- A maior concentração de polissacarídeos ácidos foi encontrada nos sacos de mucilagem presentes no tegumento externo, constituindo um sítio de reserva extra-embrionários. Mucilagem também reveste os espaços intercotiledonares, onde assume uma forma filamentosa. A utilização de AT-O e AB, foram eficazes para indicação destas substâncias também no eixo hipocótilo-radícula.
- Polissacarídeos neutros foram observados em grande quantidade nas células do parênquima cotiledonar. A distribuição e quantidade, são diferentes entre as espécies.
- Polissacarídeos são sintetizados nas células parenquimáticas, onde também são armazenados, além disso participam na formação da parede celular.
- *T. speciosum*, pode ser diferenciada através da morfologia dos grãos de amido e dos idioblastos com conteúdo ácido, presentes no parênquima cotiledonar.
- Todas as espécies estudadas, são marcadas pela presença de idioblastos com conteúdo fenólico no parênquima cotiledonar. Estes geralmente estão localizados dentro de vacúolos e possivelmente estão associados à presença de alcalóides.
- As proteínas foram evidenciadas na forma de granulações dispersas no citoplasma e na forma de corpos protéicos. Estas estruturas são restritas as células do parênquima cotiledonar.
- Em *T. grandiflorum* os sacos de mucilagem possuem uma composição mista, indicando a presença de polissacarídeos ácidos e neutros.
- Proteínas de reserva não foram encontradas em células do tegumento.

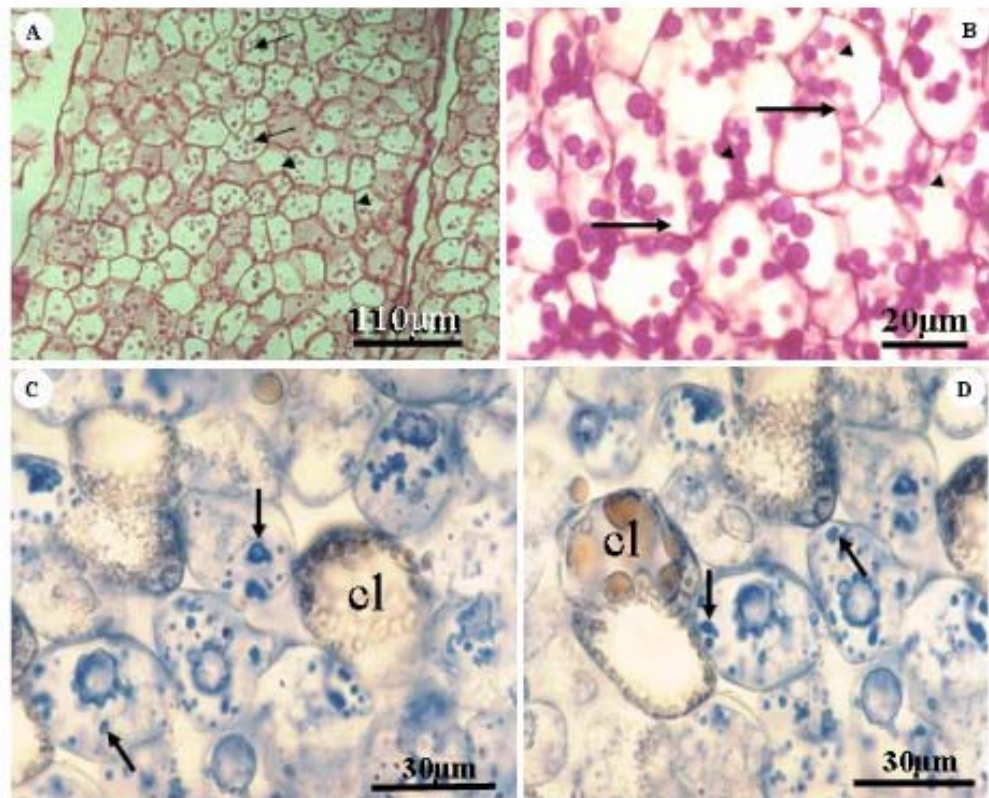


Figura 01- *T. grandiflorum*. A e B- células do parênquima cotiledonar PAS positivas (destacando grãos de amido (seta); C-corpos protéicos (seta) em células do parênquima cotiledonar, idioblastos com corpos lipídicos (cl); D-células do parênquima cotiledonar CBB positivas evidenciando corpos protéicos (seta) e corpos lipídicos (cl).

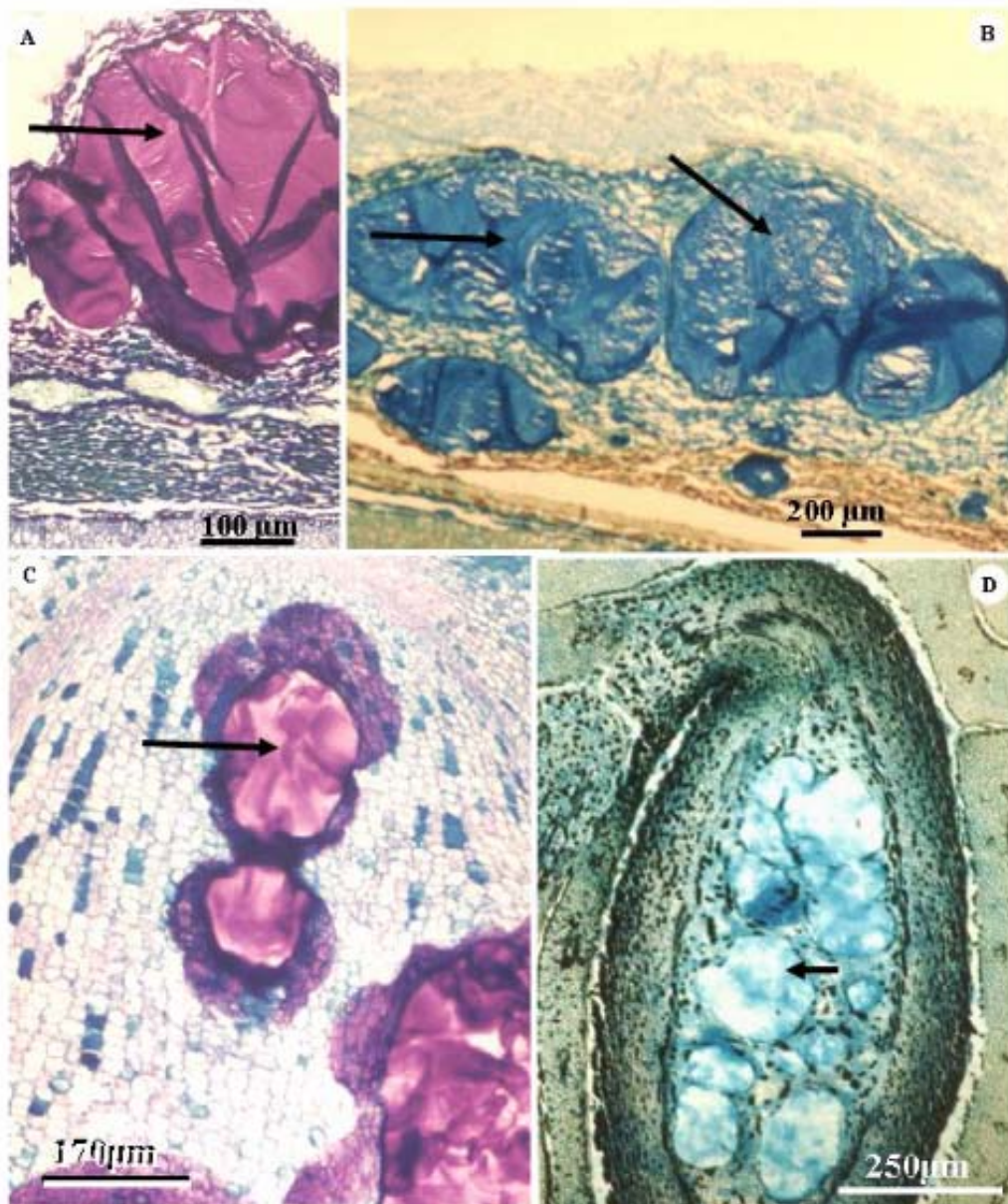


Figura 02-*T. grandiflorum*. **A**-idioblastos no tegumento externo evidenciando reação metacromática ao AT-O; **B**- Idioblastos com mucilagem (seta) com reação positiva ao AB; **C**- idioblastos (seta) no eixo hipocótilo radícula com reação metacromática ao AT-O; **D**-idioblastos (seta) no eixo hipocótilo-radícula com reação positiva ao AB.

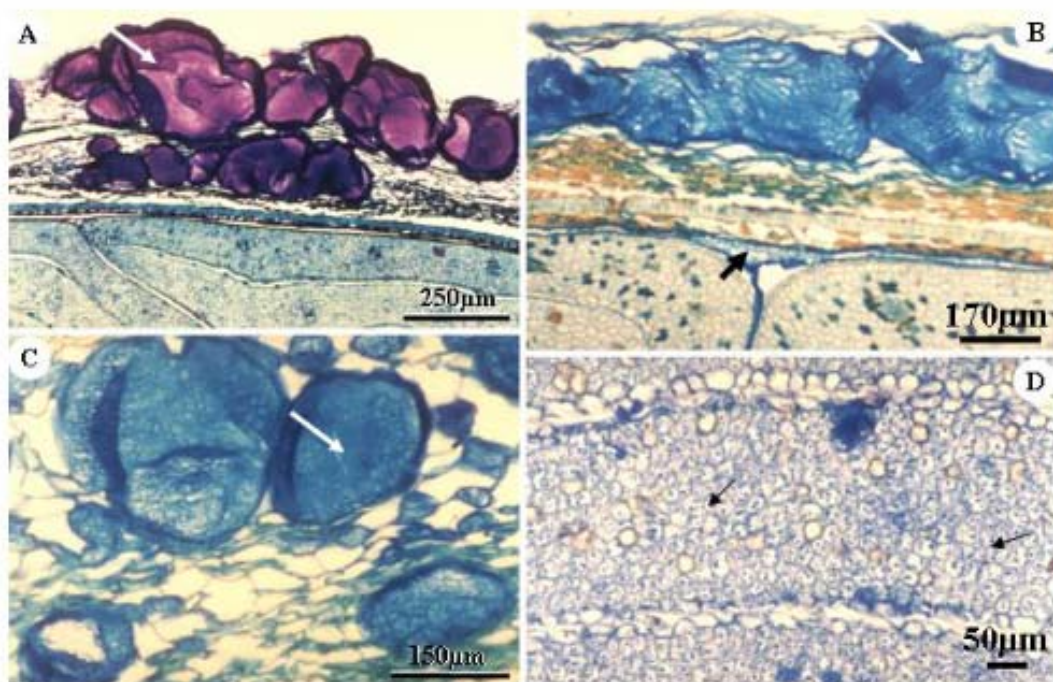


Figura 03- *T. subincanum*. A-idioblastos no tegumento externo (seta) com reação metacromática ao AT-O; B e C-idioblastos no tegumento externo e a região entre os cotilédones (seta) mostrando reação positiva ao AB; D-células do parênquima cotiledonar (seta) CBB positivas com pequenas granulações protéicas.

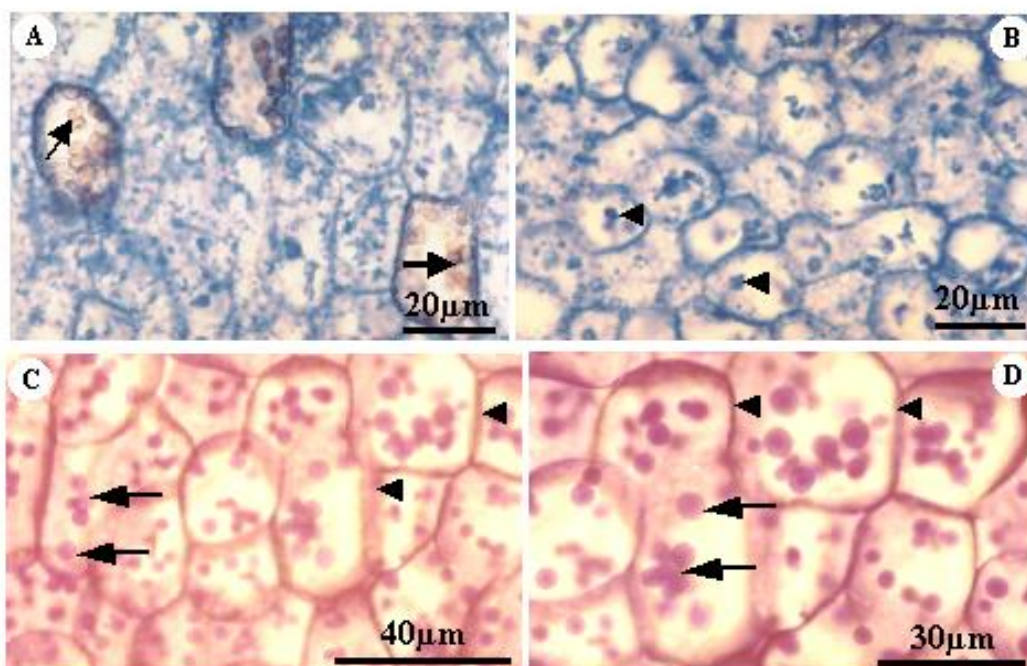


Figura 04- *T. subterraneum*. **A**-células do parênquima cotiledonar com citoplasma positivo ao CBB e com idioblastos com corpos lipídicos (seta); **B**-células do parênquima cotiledonar evidenciando corpos protéicos (cabeça de seta); **C** e **D**-células do parênquima cotiledonar PAS positivas com reação na parede celular (cabeça de seta) e grãos de amido no citoplasma (seta).

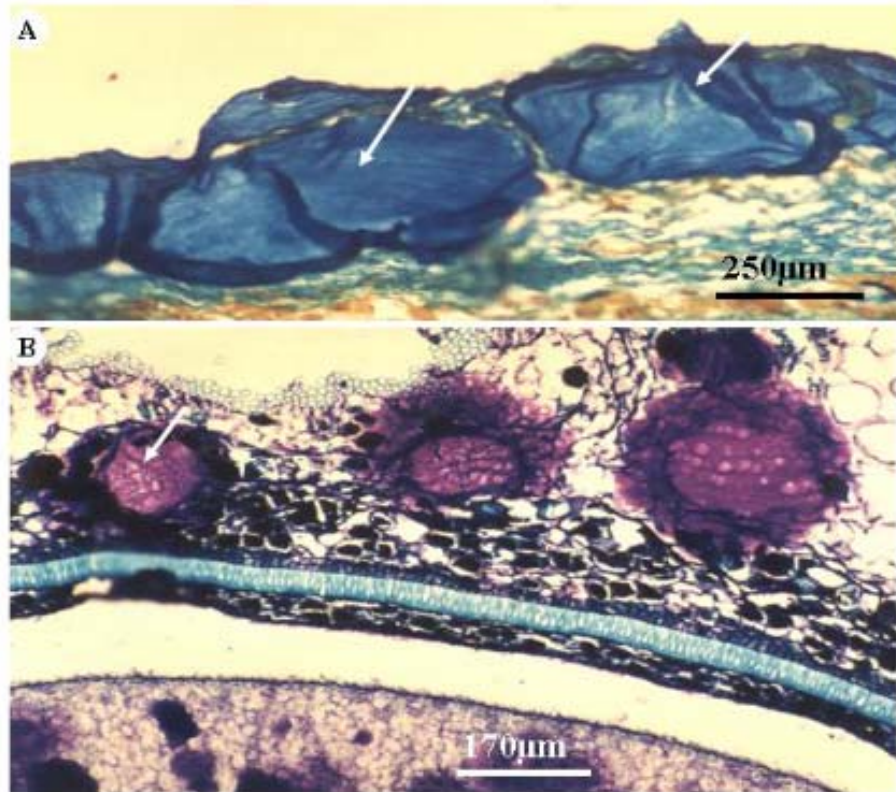


Figura 05- *T. speciosum*. A-idioblastos no tegumento externo AB positivos (seta); B-idioblastos com mucilagem no tegumento externo (seta) com reação metacromática ao AT-O.

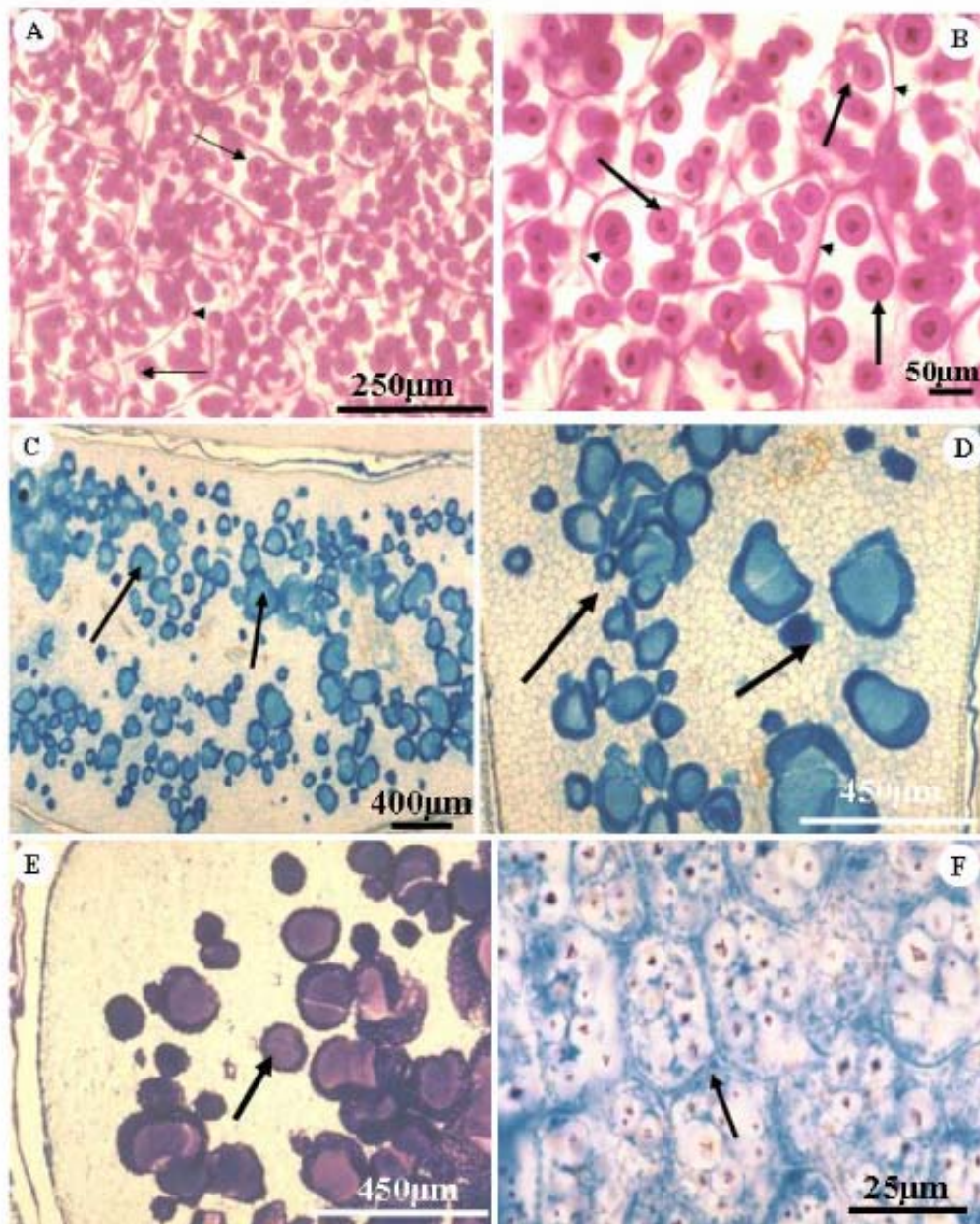


Figura 06- *T. speciosum*. **A e B**-células do parênquima cotiledonar PAS positivas com reação na parede celular (cabeça de seta) e grãos de amido no citoplasma (seta); **C e D**-idioblastos no parênquima cotiledonar mostrando reação positiva ao AB (seta); **E**-idioblastos no parênquima cotiledonar com reação metacromática ao AT-O (seta); **F**-células do parênquima cotiledonar com reação positiva ao CBB (seta).

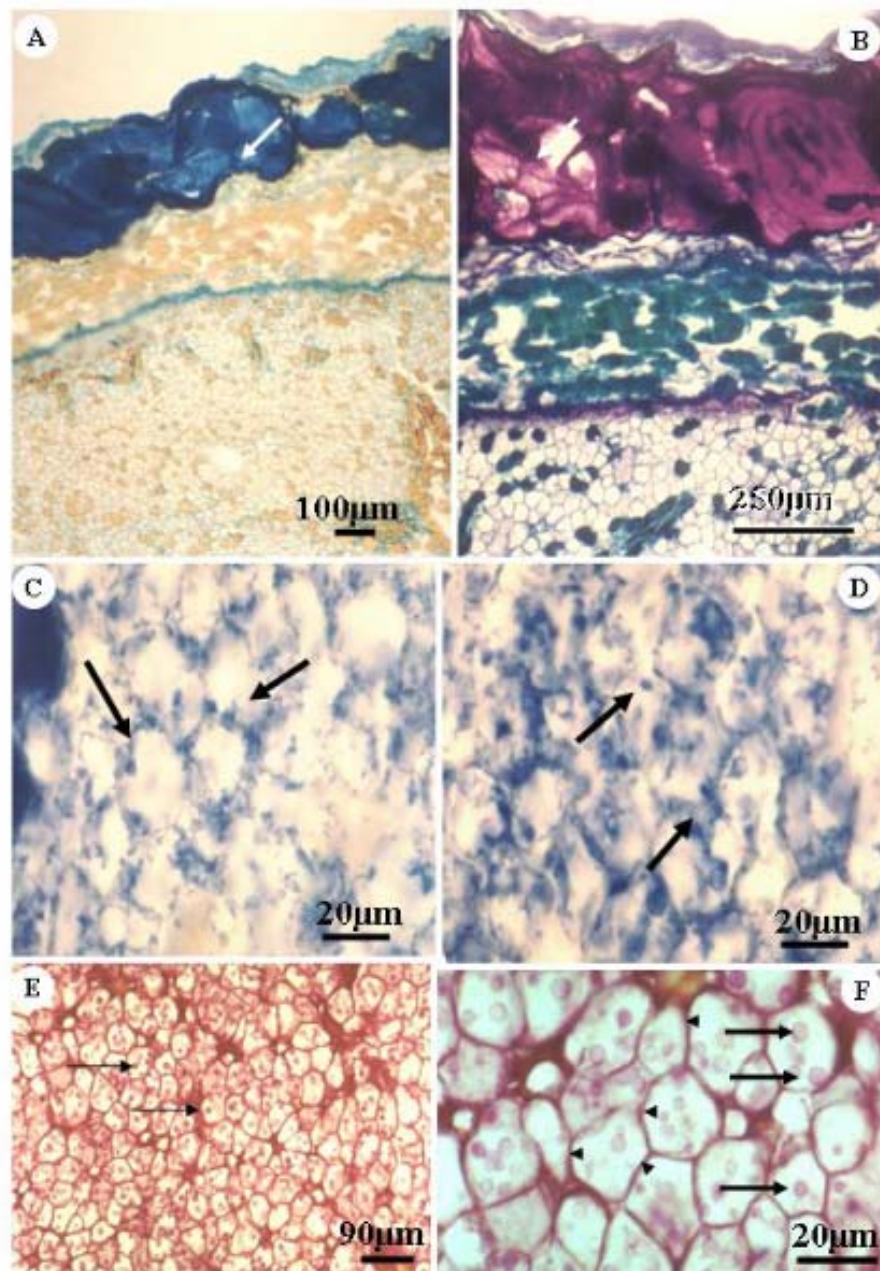


Figura 07- *T. obovatum*. A- idioblastos no tegumento externo com reação positiva ao AB (seta); B- idioblastos (seta) no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O; C e D- granulações protéicas (seta) no parênquima cotiledonar corados com CBB; E e F- células do parênquima cotiledonar PAS positivas mostrando grãos de amido (seta) e parede celular (cabeça de seta) PAS positiva.

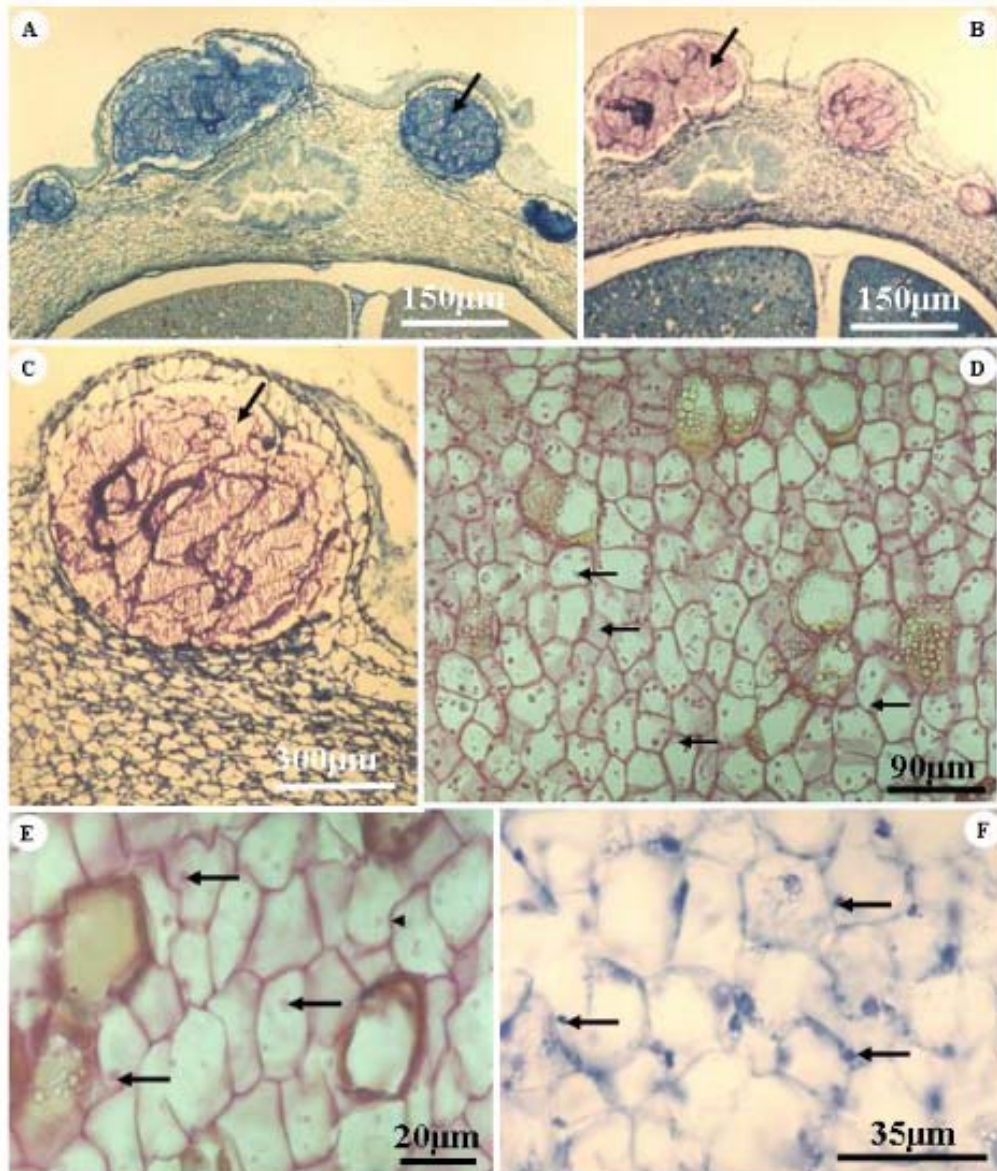


Figura 08- *T. grandiflorum* x *T. obovatum*. A-idioblastos com reação positiva ao AB ; B e C-idioblastos com reação metacromática ao AT-O; D-células PAS positivas no parênquima cotiledonar (seta) mostrando grãos de amido, parede celular (seta); E- células do parênquima cotiledonar PAS positivas evidenciando grãos de amido (seta) e Parede celular (cabeça de seta); F-células do parênquima cotiledonar (seta) positivas ao CBB evidenciando corpos protéicos .

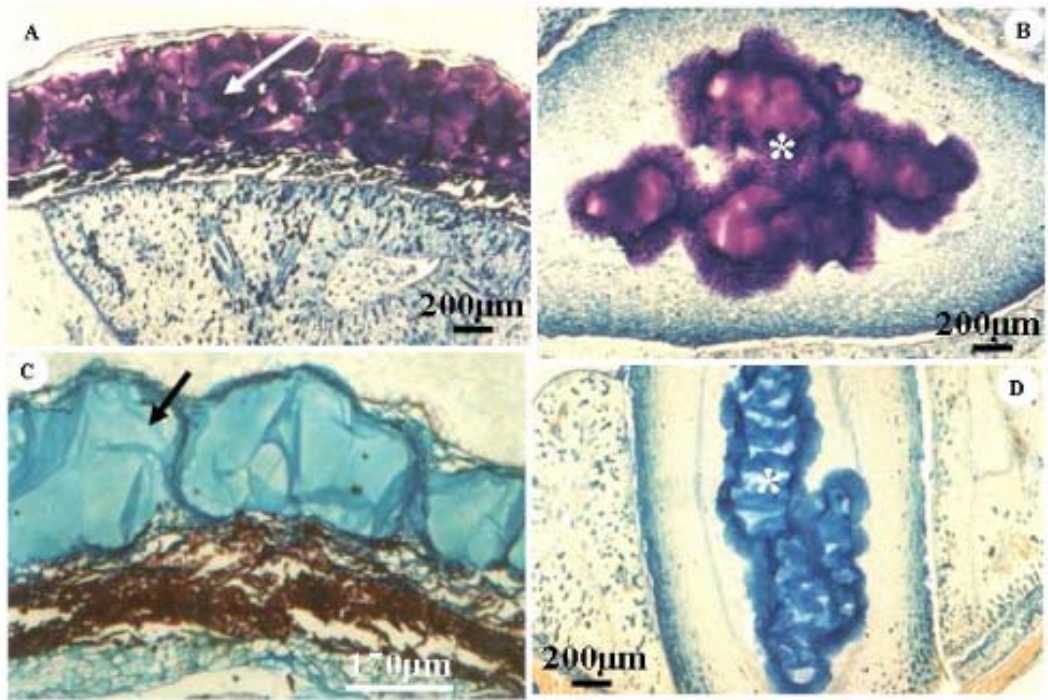


Figura 09-*T. subincanum* x *T. obovatum*. **A**-idioblastos (seta) no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O (seta); **B**-região central do sexto embrionário (*) com reação metacromática ao AT-O; **C**-idioblastos no tegumento externo AB positivos (seta); **D**-região central do sexto embrionário (*) AB positivo.

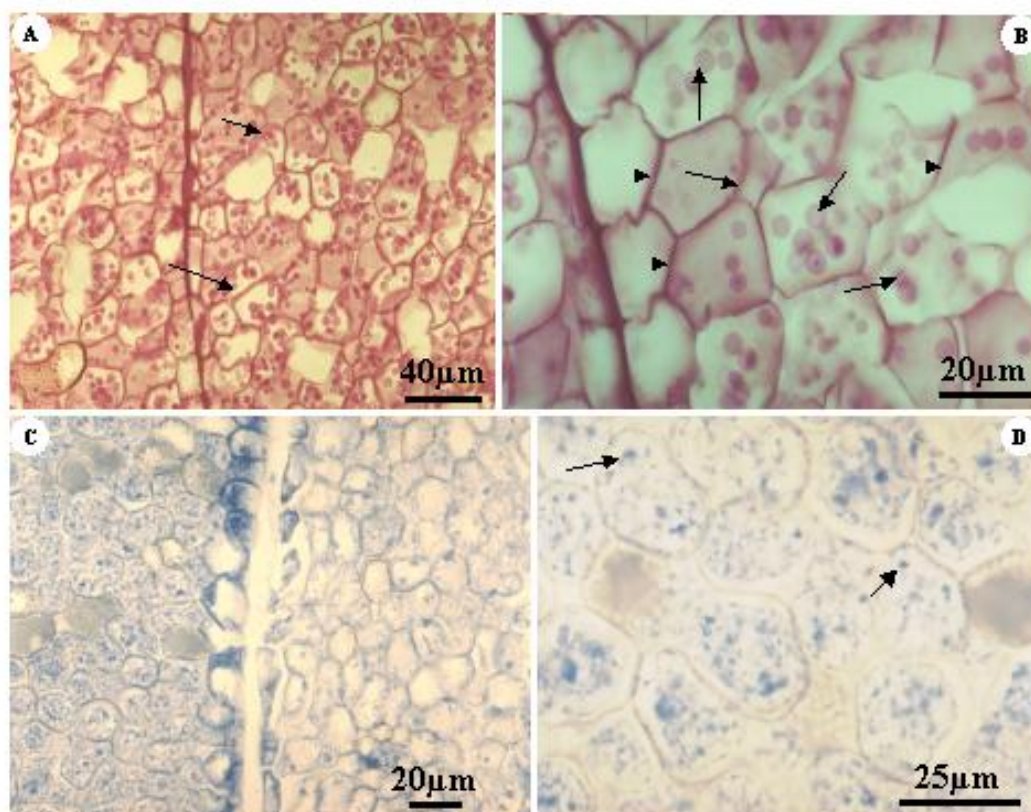


Figura 10- *T. subincanum* x *T. obovatum*. **A e B**-células do parênquima cotiledonar PAS positivas grãos de amido (seta); **C e D**-células do parênquima cotiledonar (seta) mostrando reação positiva ao CBB (evidenciando algumas granulações protéicas).

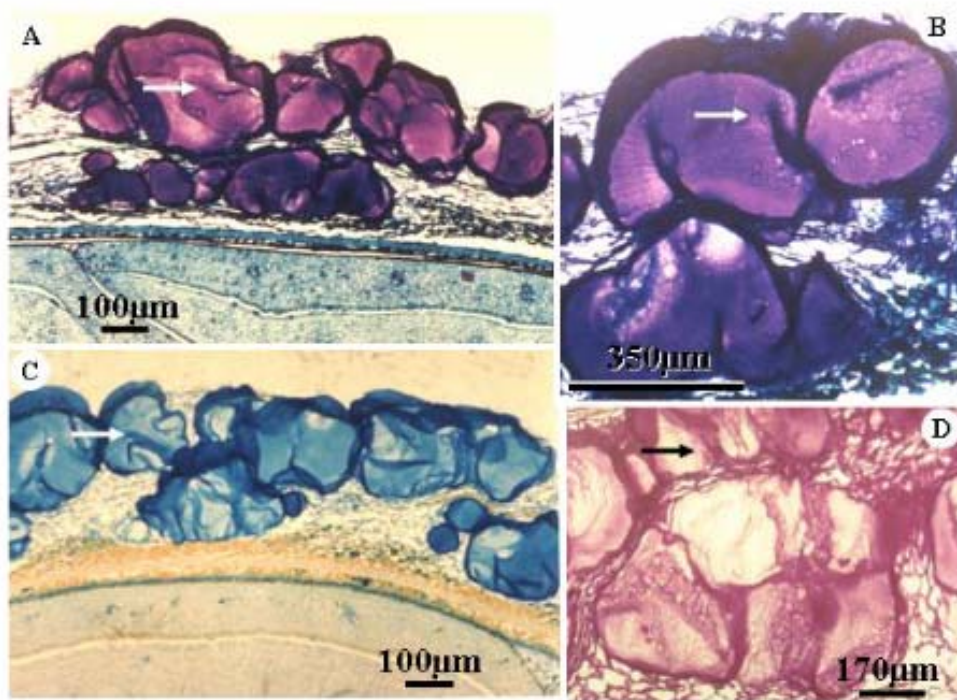


Figura 11- *T. grandiflorum* x *T. subincanum*. A e B- idioblastos no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O (seta); C-idioblastos no tegumento externo com reação positiva ao AB (seta); D-detache dos idioblastos agrupados no tegumento externo PAS positivas (seta).

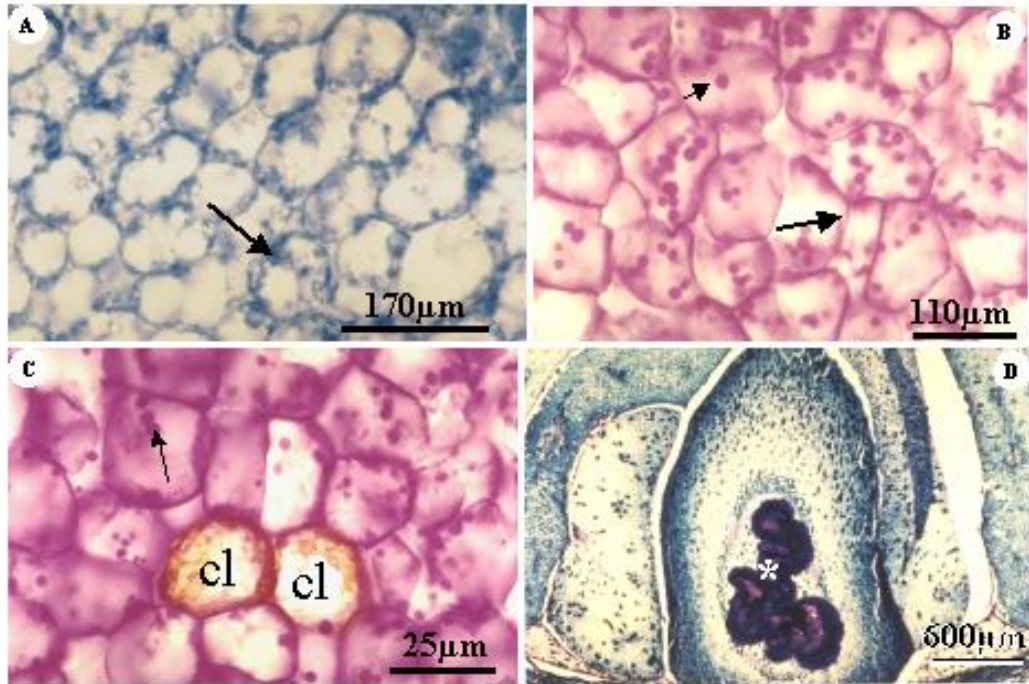


Figura 12- *T. grandiflorum* x *T. subincanum*. **A**-células do parênquima cotiledonar (seta) CBB positivas; **B** e **C**-células do parênquima cotiledonar (seta) positivas ao PAS e idioblastos com corpos lipídicos (cl); **D**-reação metacromática ao AT-O na na região central do eixo embrionário (*).

Tabela 03-Localização de substâncias de reserva em sementes de *Theobroma grandiflorum*

Estrutura	Teste Histoquímico	Composto	Reação
Sacos de mucilagem	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+
	PAS	Polissacarídeos neutros	+
Células cotiledonares	PAS	Polissacarídeos neutros	+
	CBB	Proteínas	+
Eixo embrionário	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+
Espaços intercotiledonares	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+

Tabela 04-Localização de substâncias de reserva em sementes de *Theobroma subincanum*

Estrutura	Teste Histoquímico	Composto	Reação
Sacos de mucilagem	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+
	PAS	Polissacarídeos neutros	-
Células cotiledonares	PAS	Polissacarídeos neutros	+
	CBB	Proteínas	+
Espaços intercotiledonares	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+

Tabela 05-Localização de substâncias de reserva em sementes de *Theobroma speciosum*

Estrutura	Teste Histoquímico	Composto	Reação
Sacos de mucilagem	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+
	PAS	Polissacarídeos neutros	-
Células cotiledonares	PAS	Polissacarídeos neutros	+
	CBB	Proteínas	+
Espaços intercotiledonares	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+
Idioblastos do Parênquima cotiledonar	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+

Tabela 06-Localização de substâncias de reserva em sementes de *Theobroma obovatum*

Estrutura	Teste Histoquímico	Composto	Reação
Sacos de mucilagem	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+
	PAS	Polissacarídeos neutros	-
Células cotiledonares	PAS	Polissacarídeos neutros	+
	CBB	Proteínas	+
Espaços intercotiledonares	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+

Tabela 07-Localização de substâncias de em sementes de *T. grandiflorum* x *T. subincanum*

Estrutura	Teste Histoquímico	Composto	Reação
Sacos de mucilagem	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+
	PAS	Polissacarídeos neutros	+
Células cotiledonares	PAS	Polissacarídeos neutros	+
	CBB	Proteínas	+
Espaços intercotiledonares	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+

Tabela 08-Localização de substâncias de reserva em sementes de *T. grandiflorum* x *T. obovatum*

Estrutura	Teste Histoquímico	Composto	Reação
Sacos de mucilagem	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+
	PAS	Polissacarídeos neutros	-
Células cotiledonares	PAS	Polissacarídeos neutros	+
	CBB	Proteínas	+
Espaços intercotiledonares	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+

Tabela 09-Localização de substâncias de reserva em sementes de *T. subincanum* x *T. obovatum*

Estrutura	Teste Histoquímico	Composto	Reação
Sacos de mucilagem	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+
	PAS	Polissacarídeos neutros	-
Células cotiledonares	PAS	Polissacarídeos neutros	+
	CBB	Proteínas	+
Espaços intercotiledonares	Azul de toluidina	Polissacarídeos ácidos	+
	Alcian blue		+

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDISON, G. O. & TAVARES, R. M. OBSERVAÇÕES SÔBRE AS ESPÉCIES DO GÊNERO *THEOBROMA* QUE OCORRE NA AMAZÔNIA. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte**, n.º 25. I.A.N. Belém/PA, 1951.
- ALEMANO, L.; BERTHOULY, M; MICHAUX-FERRIÈRE, N. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. **In vitro Cell Development Biology** 33: 163-172. 1997.
- AMARAL, L. I. V; PEREIRA, M. D. A; CORTELAZZO, A. L. Formação de Substâncias de Reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.-BIXACEAE). **Acta botanica brasílica**. 15(1): 125-132. 2001.
- ARAGÃO, C. G. MUDANÇAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA SEMENTE DO CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum* Schum) DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO. **Dissertação de Mestrado**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas. Manaus/AM. 1992.
- BAWMANN, T. M. & WARNER, H. The 1,3,7,9- tetrametiluric acid content of cupuassu (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Acta Amazônica**,10 (2): 425. 1980.
- BARROSO, G. M; MORIM, M. P; PEIXOTO, A. L; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV. 443p. 1999.
- BARROSO, G M; LIMA, H. C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Rio de Janeiro: LTC, 2v. 1978.
- BELTRATI, C.M. **Morfologia e Anatomia de Sementes**. Rio Claro: UNESP, 100p. 1994.

- BEWLEY, J. D; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination.** 2 ed. New York: Plenum Press, 445p. 1994.
- BIEHL, B; WENETZER, C; PASSERN, D. Vacuolar (STORAGE) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, V.33,p. 1291-1304, 1982.
- BOESEWINKEL, F. D. & BOUMAN, F. **The Seed Structure.** In: Johri, B.M. Ed. **Embryology of Angiosperms.** Springer-Verlag. Berlin. 1984.
- BOUZON, Z. L. Histoquímica e Ultraestrutura da Espermatogênese e Carposporogênese de Algas Gracilarióides (Rhodophyta). **Tese de Doutorado**, USP, São Paulo, 1999.
- BOZZOLA, J.J; RUSSEL, L.D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists.** New York: Jones and Bartlett Publishers. 452 p. 1991
- BRITO, E. S; GARCÍA, N. H. P; AMÂNCIO, A. C. Effect of polyphenol and tannin content of cocoa nibs. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 22(1): 45-48, 2002.
- BUCKERIDGE, M. S. & REID, J. S.G. Major cell wall polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. **Ciência e Cultura**, 48: 153-162, 1996.
- CORNER, E. J. H. **The Seeds of dicotyledons.** Cambridge: Cambridge. University Press. v. 1, 552p. 1976.
- CONN, H. J. **Biological stains: a handbook on the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory.** Baltimore: Williams & Wilkins. 1989.
- CLEMENT, C. R; NETO, J. T. F.; CARVALHO, J.E.U.; SOUZA, A.G. C.; GONDIM, M. S; LÉDO, F.J.S. & MULLER, A.A. FRUTEIRAS NATIVAS DA AMAZÔNIA: O LONGO CAMINHO ENTRE CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO. IN: **Tópicos Atuais em Botânica**/Palestras convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica. 253-257. Brasília/DF. 2000.

- CRESTANA, C. M; BELTRATI, C. M. Morfologia e anatomia das sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-caesalpinoideae). **Naturalia**, São Paulo, v. 13, p.45-54, 1988.
- CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions From The United States National Herbarium**, Washington, V.35, p.379-614, 1964.
- CUNHA, C, R; JACKIX, M. N. H; CORTELAZZO, A, E, VASCONCELOS, M. A. M. Alterações na microestrutura das amêndoas durante a fermentação de sementes de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), In: **II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas- SP. 1997.
- CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**: Parte II: Órgãos Experimentos e Interpretações. São Paulo: Rocca, 304p. 1987.
- DANGOU JS, HOCHER V, FERRIERI N, FULCHERI C, MORARD P, ALEMANNO L. Histological and biochemical characterization of *Theobroma cacao* L. endosperm during seed development. **Seed Science Research**12 (2): 91-100 APR 2002.
- DUCKE, A. Plantas de cultura pré-colombiana na Amazônia Brasileira. Notas sobre as espécies ou formas espontâneas que supostamente lhes teriam dado origem. **IPEAN, Bol. Técnico**, Belém- PA 8: 11, p11, 1946.
- DUCKE, A. As espécies brasileiras do gênero *Theobroma* L. Belém: **IAN- Boletim de Pesquisa**, 28. 1953.
- DUFFUS, C. M. & SLAUGHTER, J. C. **Seed and their uses**. John Wiley & Sons, New York, 1980.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: EDUSP, 239 Pag. 1974.

- FANH, A. **Plant Anatomy**. 4ed. New York: Pergamon Press, 588 Pag. 1990.
- FEDER. N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**. 55: 123-142. 1968.
- FERREIRA, R.F. & SALOMÃO, A. N. RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS DO BRASIL. IN: **Tópicos Atuais em Botânica/Palestras Convidadas do 51º Congresso Nacional de Botânica**. 258-262. Brasília/DF, 2000.
- FERREIRA, R.A.; BOTELHO, S.A.; DAVIDE, A.C & MALAVASI, M.M. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de *Dimorphandra mollis* Benth.- faveira (Leguminosae- Caesalpinioideae). **Revista brasileira de botânica**. São Paulo, V.24, n.3, p.303-309, set. 2001.
- FIGUEIRÊDO, F. J. C, ROCHA NETO, O.G & CARVALHO, C. J. R. MOBILIZAÇÃO DE RESERVAS NA EMERGÊNCIA E DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE CUPUAÇUZEIRO (*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng.) Schum.). 1- Carboidratos. **Revista de Ciências Agrárias**, N.º 36, p. 101-119, Jul./Dez. 2001.
- FIGUEIRA, A. Biotechnological studies in *Theobroma cacao*: Micropropagation, characterization of polysaccharides, and estimation of genetic diversity using molecular markers. Purdue, (**PhD**) Thesis- Purdue University. 1992.
- FIGUEIRA, A; JANICK, J; LEVY, M; GOLDSBROUGH, P. B. Reexamining the classification of *Theobroma cacao* L. using molecular markers. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 119, p. 1073-1082, 1994.
- GAHAN, P.B. **Plant histochemistry and citochemistry**. London: Academic Press. 301 Pag.1984.
- GATO, A. M. G. Conservação de sementes de *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng) Schum.- Sterculiaceae. 110p. **Dissertação (Mestrado)**-INPA/FUA. Manaus. 1992.

- GORDON, E. M. & McCANDLES. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In M. J. Harvey and J. McLachlan (eds.) *Chondrus crispus*. **Nova Scotian Institute of science**, Halifax. 111-133. 1973.
- GRUBERT, M. Mucilage or gum in seeds and fruits of angiosperms: A Review.- **Minerva Publ.** München. 1981
- HEYWOOD, V. H. **Flowering Plants of the world**. London. 335Pag. 1993.
- JENSEN, W. A. **Botanical Histochemistry; principle and practice**. San Francisco, W. H. Freeman, 1962.
- JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. 2 ed. New York. Mcgraw Hill, 523p. 1940.
- KIERNAN, J. A. **Histological and histochemical methods: theory and practice**. Oxford & Boston: Butterworth-Heineman. 1999.
- KRAUS, J.E. & ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro, RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 198 p. 1997.
- KOZLOWSKI, T. T. **Seed Biology**. Vol. 1, New York, Academic Press. 415 Pag. 1972.
- LENCI, C. G.; MARTINI, M. H.; TAVARES, D. Q.; BEGNAMI, C. N. & CORTELLAZZO, A.L. CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA DE SEMENTES DO GÊNERO *THEOBROMA*. IN: **52º Congresso Nacional de Botânica/Resumos**. João Pessoa /PB. Pag.27. 2001.
- LENCI, C. G. . Caracterização estrutural e química do tecido de reserva das sementes de *T. cacao*, *T. obovatum* e *T. microcarpum*. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. 2002.
- LOTT, J. N. A. Protein bodies in seeds. **Nordic Journal of Botany**. 1:421-432p. 1981.

- YASSEN, M. Y; BARRINGER, S. A.; SPLITTSTOESSER, W. E. & CONSTANZA, S. The role of Seed Coat in Seed viability. **The Botanical Review**, Vol. 60, N. 04, pag.427-439. 1994.
- MAYER, A. M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. New York, Pergamon Press, 2 ed. 192p. 1975.
- METCALFE, C. R; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Oxford: Claredon Press, 1983. v.2, Pag. 68-9.
- McDOWELL, A. & TRUMP, F. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Arch. Pathol Lab. Med.** 1000: 405 – 414. 1976.
- McCULLY, M. E. 1970. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 175: 702-711. 1970.
- NAKAYAMA, L.H.I, SOARES, M.K.M e APPEZZATO-DA-GLORIA, B. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO ANATÔMICO DA FOLHA E DO CAULE DO CACAUEIRO (*Theobroma cacao* L.). **Sci. agric.**, Jan./Abr. vol.53, no.1, p.73-73. 1996.
- NETOLITZKY, F. **Anatomie der angiosperm-samen**. In Handbuch der pflanzenatomie (K. Linsbauer, ed.) Gerruder Borntrager, Berlim.V.10. 1926.
- O'BRIEN, T. P; FEDER, N. & MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue. **Protoplasma.** 59:39-52. 1964.
- O'BRIEN, T. P; McCULLY, M.E. **The study of plant structure, principles and slected methods**. Melbourne: Termarcarphi, 1981.
- OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G; AKISSUE, M. K. **FARMACOGNOSIA**. São Paulo: ATHENEU. 412 Pag. 1998.

- OLIVEIRA, A. N.; QUEIROZ, M.S.M & RAMOS, M.B.P. **Revista Brasileira de Sementes**, Vol.22, N.º 2, Pag.193-199. 2000.
- OGUNMOYELA, O.A. & ESAN, E. B. Influence of nurse shade regimes on cotyledon exhaustion of cocoa (*Theobroma cacao* L.): Changes in basic constituents during germination. In : **Internacional Cocoa Research Conference** (9. Lome, Togo). Proceedings, Lome, Togo. (In press). 1984.
- PAOLI, A. S. Morfo-anatomia e desenvolvimento dos frutos de *Luehea divaricata* Mart. (TILIACEAE). **Naturalia**, 20: 147-156. 1995.
- PEARSE, A.G. E. **Histochemistry; Theoretical and applied**. Vol. I Little, Brow & Co., Boston 759 Pag. 1985.
- ROTH, I.; LINDORSF, H. Desarrollo y anatomía del fruto y de la semilla de *Theobroma cacao* L. **Acta Bot. Venezuelica**, v 6, Pag. 261-95. 1971.
- SASS, J.E. **Botanical microtechnique**. Iowa: Iowa College Press. 228p. 1951.
- SCHUMANN, K. .Sterculiaceae. In: Martius, C., **Flora Brasiliensis**. 12 (3): 2-114, fig. 1-24. 1886.
- SCHUMANN, K. Sterculiaceae, In: Engler, A. & Prantl, H. **Die natürlichen Pflanzenfamilien**. Leipzig. Wilhelm. Engelmann. 3 (6): 69-99. 1895.
- SILVA, J. A. C. STERCULIACEAE VENT. RESERVA FLORESTAL DUCKE. MANAUS-AM. **Dissertação de Mestrado**, INPA-MANAUS, 1998.
- SILVA, C. R. S. FILOGENIA DO GÊNERO *THEOBROMA* UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES E BIOQUÍMICOS. **Dissertação de mestrado**. Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo. Piracicaba/SP, 2000.

- SIQUEIRA, W. J.; FONSECA, M. I. S.; SONDHAL, M. R. Regeneração de plantas híbridas entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* a partir de calos com dois anos de cultura in vitro. **Bragantia**. Campinas, 47(1): 1-8, 1988.
- SMITH, N. J. H; J. T. WILLIAMS; PLUCKNETT, D. L. & TALBOT, J. **Tropical Forests and Their Crops**. Ithaca: Canstock Publishing Associates, Cornell University Press, 568 Pag. 1992.
- SOUZA, F. H. D. & MARCOS-FILHO, J. 2001. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. **Revta. brasil. Bot.**, V24, n4, Pag.365-375, 2001.
- STUESSY, E. **Plant Taxonomy. The evolution of comparative data**. New York: Columbia University Press. 514Pag. 1991.
- TARODA, N. O Gênero *Sterculia* L. no Brasil, **Tese de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil. 1980.
- TIFFNEY, B. H. SEED SIZE, DISPERSAL SYNDROMES, AND THE RISE OF THE ANGIOSPERMS : EVIDENCE AND HYPOTHESIS. **Annals of The Missouri Botanical Garden**. Vol. 71. 1984.
- TIFFNEY, B. H.. Fossil angiosperm fruits and seeds. **J. seed Technol.** 2, 54-71. 1977.
- TRICK, H. N. & PUESCHEL, C. Cytochemical of pit plugs in *Bossiela californica* (Coralinales, Rhodophyta). **Phycologia** 29: 403-409. 1990.
- VASCONCELOS, M. A. M. “TRANSFORMAÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS DURANTE A FEMENTAÇÃO DE AMÊNDOAS DO CUPUAÇU”. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas/SP, 1999.

- VÁZQUEZ-YANES, C. & OROZCO-SEGOVIA, A. Ecophysiology of seed germination in the tropical humid forest of the world : a review. In E. Medina, H. A. Mooney, and C. Vázquez-yanes (Eds). **Physiological ecology of plants of the wet tropics**, Pag. 37-50. 1984.
- VENTURIERI, G. A. Cupuaçuzeiro- Fruteira típica da Amazônia com perspectiva para a exportação. Informativo Soc. Bras. **Fruticultura**. 3 (4): 7. 1994.
- VENTURIERI, G.A. **Cupuaçu**: A espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: clube do cupú, 108p. 1993.
- VENTURIERI, G.A. Biologia aplicada à Domesticação de Fruteiras Amazônicas do Gênero *Theobroma*: **Primeiro Relatório. Universidade Federal do Pará/CNPq/Programa de Trópico Úmido – PTU**. 105 Pag. datil. Belém, PA. 1998.
- VENTURIERI, G.A. Biologia aplicada à Domesticação de Fruteiras Amazônicas do Gênero *Theobroma*: **Segundo Relatório. Universidade Federal do Pará/CNPq/Programa de Trópico Úmido – PTU**. 79 Pag. datil. Belém, PA. 1999.
- WERKER, E. **Seed Anatomy**: encyclopedia of plant anatomy. Stuttgart Borntraeger, 424Pag. 1997.
- WHITLOCK, B. A.; BAUM, D. A.. Phylogenetic relationships of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae) based on sequences of the nuclear gene *Vicilin*. **Systematic Botany**, V. 24, Pag.128-138, 1999.
- ZOBEL, A.. M. Localization of phenolic compounds in tannin-secreting cells from *Sambucus racemosa* L. shoots. **Annals of Botany**, London, v. 57, Pag.801-810, 1986.