

631.523

V469b

2004

LV-2004.00012

RELATÓRIO DE PESQUISA

Janeiro de 2000 a Janeiro de 2004

Embrapa Amazônia Oriental
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNPq/PTU (Processo n. 46915/00-5)

BIOLOGIA APLICADA AO USO ECONÔMICO DO GÊNERO THEOBROMA

Giorgio Cristino Venturieri – EMBRAPA - CPATU

Giorgini Augusto Venturieri - UFSC/CCB - BEG

João de Deus Medeiros - UFSC/CCB - BOT

José Edmar Urano de Carvalho EMBRAPA - CPATU

Zenilda Laurita Bouzon – UFSC - CCB

Seidel Ferreira dos Santos - Pós Grad. em Rec. Genéticos, UFSC - CCA

Gunther Barbosa - IBAMA e Pós Grad. em Rec. Genéticos, UFSC - CCA

Alessandra de Azevedo Rodrigues da Silva - Pós Grad. Biologia Vegetal MPEG/UFPA



Instituição Executora



Instituição Financiadora



Instituições Parceiras

Belém – PA
Fevereiro, 2004

Sumário

Sub-projeto I

BANCO DE GERMOPLASMA DE <i>Theobroma</i> L. (STERCULIACEAE) DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, BELÉM, PA	1
PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE GENOTIPOS DE HÍBRIDOS ENTRE <i>THEOBROMA GRANDIFLORUM</i> X <i>T. OBOVATUM</i>	9
BIOMETRIA DE FRUTOS DE <i>THEOBROMA SPECIOSUM</i> (STERCULIACEAE)	14
BIOMETRIA DE FRUTOS DE <i>THEOBROMA BICOLOR</i> (STERCULIACEAE)	23
BIOMETRIA DE FRUTOS E SEMENTES DE <i>THEOBROMA OBOVATUM</i> KLOTZSCH EX BERNOULLI (STERCULIACEAE)	34

Sub-projeto II

NOTAS SOBRE A BIOLOGIA REPRODUTIVA DE <i>THEOBROMA OBOVATUM</i> KLOTZSCH EX BERNOULLI	39
POLINIZAÇÃO DE CACAUÍ (<i>THEOBROMA SPECIOSUM</i> WILLD. EX SPRENG. - STERCULIACEAE): IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO	43

Sub-projeto III

HIBRIDIZAÇÃO ENTRE CUPUAÇU (<i>T. GRANDIFLORUM</i>) e CACAU (<i>THEOBROMA CACAO</i>) - STERCULIACEAE UTILIZANDO MISTURA DE PÓLEN)	89
HIBRIDIZAÇÃO ENTRE CACAU (<i>THEOBROMA CACAO</i>) E O CUPUAÇU (<i>T. GRANDIFLORUM</i>) - STERCULIACEAE UTILIZANDO MISTURA DE PÓLEN) - II	92
PROTO - EXPERIMENTOS EM CULTURA DE TECIDOS DE ESPÉCIES AMAZÔNICAS DO GÊNERO <i>THEOBROMA</i>	101
CALOGÊNESE DO HÍBRIDO <i>THEOBROMA GRANDIFLORUM</i> X <i>T. OBOVATUM</i> (STERCULIACEAE)	113
CALOGÊNESE DO CACAU (<i>THEOBROMA CACAO</i>), CACAUÍ (<i>T. SPECIOSUM</i>) E DO CUPUAÇU (<i>T. GRANDIFLORUM</i>) USANDO 2,4-D E BAP	123

Sub-projeto IV

ASPECTOS ESTRUTURAIS E ANATÔMICOS DE SEMENTES DO GÊNERO <i>THEOBROMA</i> L. (STERCULIACEAE)	139
HISTOQUÍMICA DE SEMENTES DO GÊNERO <i>THEOBROMA</i> L. (STERCULIACEAE)	181

ANEXO: MAPA DA COLEÇÃO DE *THEOBROMA*

Introdução

A Amazônia é um dos maiores repositórios de espécies úteis do planeta com pelo menos 100 fruteiras consideradas potenciais de uso consagrado entre os povos amazônicos, fazendo da região um campo bem apropriado para a seleção de novas espécies e variedades com maior capacidade de produção e resistência (Clement 1992, Venturieri 1993).

Dentre os numerosos problemas que a sociedade brasileira necessita resolver dois são de inegável importância: o de garantir a produção de alimentos em escala e custo que atendam as demandas de mercado e a sua compatibilização com a preservação da biodiversidade e do meio ambiente. Com esta preocupação, para a Amazônia, estão sendo sugeridas a adoção de sistemas agroflorestais e o aproveitamento da biodiversidade regional de suas fruteiras (Venturieri 1993, Gasparotto et al. 1997, Locatelliet al. 1996).

As espécies do gênero *Theobroma*, cujo o seu componente mais conhecido é o cacau (*Theobroma cacao* L.) possui pelo menos 4 espécies de antigo manejo dos índios amazônicos para a produção de polpa (*T. grandiflorum*) de amêndoas para consumo humano em forma de chocolate (*T. grandiflorum* novamente, *T. speciosum* e *T. cacao*) e para o consumo direto após serem tostada (*T. bicolor*). Estas espécies tem porte florestal e se prestam bem para o cultivo em sistemas agroflorestais, por serem tolerantes à sombra (Venturieri 1999).

A hibridação entre espécies afins do gênero *Theobroma* é uma estratégia apontada para promover a resistência a importantes doenças do cacauzeiro como o inchaço dos brotos ("swollen shoot") e a Vassoura de bruxa (*Criniplellis perniciosa*). Esta última, tem sido a responsável pelo drástico declínio na produção brasileira de cacau.

Para a obtenção de variedades resistentes a uma doença como Vassoura-de-bruxa existem duas estratégias: a) exploração da variabilidade genética já existente do cacau em si e de suas espécies afins e b) formação de transgênicos. Acreditamos que a primeira estratégia ainda não foi suficientemente explorada e não apresenta riscos e por isto deve, até o momento, ser preferida. A base para a aplicação da primeira estratégia mencionada são as coleções de germoplasma. Com as coleções é possível inventariar a variabilidade existente, proceder estudos de biologia reprodutiva, promover avaliações preliminares, facilitar a formação de novas combinações genéticas e seu posterior aproveitamento em programas mais aplicados de caráter agrônomico. Neste sentido, o grupo envolvido no presente relatório vem trabalhando desde 1994 (ver relatórios Venturieri e colaboradores, 1998, 1999 e 2000 - Trabalhos desenvolvidos também com recursos do PTU proc. n. 63.00.13/95). O presente relatório é mais um segmento dos objetivos já mencionados, mostrando persistência (já somam 13 anos de trabalho) e coerência entre pesquisadores de diversas áreas e instituições brasileiras, em um mutirão para tornar uma minúscula parte da biodiversidade existente na Amazônia em produto comercial renovável. Os resultados nos últimos três anos, agora financiados pelo presente projeto, tiveram como ponto alto, a redescoberta e recuperação da mais expressiva coleção de germoplasma do gênero *Theobroma* existente no mundo, com a retirada da situação de risco de perda que estava e de pelo menos 7 híbridos interespecíficos feitos pelo pesquisador Addison O'Neill na década de 40. Um destes híbridos vem demonstrando resistência à doença "Vassoura-de-bruxa", um fato que por si só mostra a expressividade desta coleção. Em adição foram também desenvolvidos estudos sobre biologia floral, biometria dos frutos, anatomia das sementes, enxertia, e biotecnologia da micropropagação. Foram geradas duas páginas na internet, uma sobre a coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental (www.cpatu.embrapa.br/paginas/theobroma/theobroma.htm) e outra sobre uma base de

dados que organiza todas as informações existentes sobre cupuaçu (www.ccb.ufsc.br/~cupu), a espécie do gênero presente na coleção mais requeridas no momento.

Não se pode deixar de mencionar que através do presente projeto foi possível ainda formar pessoal qualificado para trabalhar com o aproveitamento dos recursos genéticos da Amazônia. Foram formados dois mestres e recebidos como estagiários nove alunos.

Os resultados estão apresentado no formato de trabalhos, que foram e/ou serão, apresentados em reuniões e/ou publicações científicas, subdivididos entre os quatro segmentos que corresponderam aos sub-projetos, conforme submetido no projeto original.

Ao longo destes últimos quatro anos foi registrado um grande número de fotografias, contendo imagens dos diversos segmentos do presente projeto. Estas fotos estão sendo algumas digitalizadas, tratadas, rotuladas e organizadas para a formação de um banco de imagem sobre as árvores, folhas, flores, frutos, sementes e plântulas das espécies contidas na coleção. Estas imagens serão utilizadas para a reformulação das páginas da Internet e gravadas em CD para distribuição entre os pesquisadores envolvidos no projeto.

A equipe agradece os recursos recebidos e mostra pelo presente relatório o que pode ser feito com a competência e seriedade dos seus colaboradores, temperada com a paixão de trabalhar na Amazônia. Os recursos genéticos de *Theobroma* estão agora inventariados, organizados e com informações que mostram o seu potencial. A ponta do "iceberg foi mostrada". Na coleção existem genes de valor incalculável, fruto de muitas horas de trabalho e recursos públicos. Caberá aos seus gestores promoverem o seu aproveitamento e fazer "bons negócios" com eles para transformar esta riqueza latente em recursos que possam beneficiar o nosso país, e dentro dele, preferentemente, os povos que vivem na Amazônia.

Referências Bibliográficas

- CLEMENT, C. R. 1992 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, v. 53, n.2, p.188-202, 1999.
- GASPAROTTO, L; Araújo, R. Da C. e Silva, S.E.L. 1997. Cupuaçuzeiro em Sistemas Agroflorestais - Program SHIFT. International Symposium of Cupuassu and Black-Pepper. EMBRAPA/CPATU/JICA, Belém, PA, p: 106-136
- LOCATELLI, M.; SOUZA, V.F. De; VIEIRA, A. H. e QUINSEN, R.C. 1996. Estudo do Comportamento Produtivo do Cupuaçuzeiro em Sistemas Agroflorestais. Workshop sobre as Culturas de Cupuaçu e Pupunha, 1, Documentos 6, EMBRAPA/CPAA/ IICA/ PROCITRÓPICOS, Manaus, AM, p: 158- 159.
- VENTURIERI, G. A. 1993. Cupuaçu: A espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: Clube do Cupu, 108p.
- VENTURIERI, G. A. e colaboradores 1998. Biologia Aplicada à Domesticação de Fruteiras Amazônicas do Gênero *Theobroma* - Primeiro Relatório. Relatório Técnico elaborado para o CNPq/Programa de Trópico Úmido – PUT (Proc. n. 63.00.13/95-0), 105 p. Datil. Belém, PA. (em inglês e português)
- VENTURIERI, G. A. e colaboradores 1999. Biologia Aplicada à Domesticação de Fruteiras Amazônicas do Gênero *Theobroma* - Segundo Relatório. Relatório Técnico elaborado para o CNPq/Programa de Trópico Úmido - PUT (Proc. n. 63.00.13/95-0), 79 p. Datil. Belém, PA.
- VENTURIERI, G. A. e Colaboradores. 2000. Biologia Aplicada à Domesticação de Fruteiras Amazônicas do gênero *Theobroma* – Terceiro / Último Relatório. Relatório Técnico elaborado para o CNPq/Programa de Trópico Úmido – PUT (Proc. n. 63.00.13/95-0), 39p. Datil. Belém, PA.

BANCO DE GERMOPLASMA DE *Theobroma* L. (STERCULIACEAE) DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, BELÉM, PA¹

Giorgio Cristino Venturieri²
Marcio Roberto da Silva Melo³
Giorgini Augusto Venturieri⁴
Vanessa de Fátima Oliveira Raiol³

RESUMO

A necessidade de se manter bancos ativos de germoplasma de espécies de *Theobroma*, fundamenta-se principalmente pela dificuldade de se preservar suas sementes, por serem recalcitrantes, não toleram baixas temperaturas e dessecação. O gênero *Theobroma* abriga duas importantes espécies econômicas da Amazônia, o cacauzeiro (*T. cacao*) e o cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*) onde a cultura de ambas sofre pesadas perdas pela doença conhecida como vassoura-de-bruxa. Objetivando a revitalização e conseqüente acesso do material genético contido em um antigo banco de germoplasma, situado nos campos de pesquisa da Embrapa Amazônia Oriental, realizou-se um inventário com o mapeamento e a identificação de todos os espécimes contidos na referida área, já que as informações originais foram perdidas, não existindo mais os mapas nem o histórico das origens dos espécimes ali plantados. Em uma área de 70.200 m² foram encontradas 1.208 matrizes, com pelo menos nove espécies diferentes originadas de diversas regiões da Amazônia, deste total de matrizes, pelo menos 290 são de híbridos de quatro tipos de cruzamentos diferentes.

Termos para indexação: fruticultura, cacau, cupuaçu.

¹ Como apoio financeiro do CNPq, Proc. n. 469915/00-5.

² Eng. Agronom., D.Sc. da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa. Postal 48, CEP: 66.017-970, Belém, PA, giorgio@cpatu.embrapa.br.

³ Acadêmico de Agronomia, UFRA, Caixa. Postal 917, CEP: 66.077-530, Belém, PA.

⁴ Professor PhD., UFSC, Caixa. Postal 476, CEP: 88.040-900, Florianópolis, SC, giorgini@ccb.ufsc.br.

Abstract

The necessity of the establishment of germplasm banks of *Theobroma* species, is due to difficulties in preserving their seeds in viable conditions for a long term since they are recalcitrant, do not tolerate low temperatures and desiccation. *Theobroma* genus includes two economically important Amazonian species, cocoa (*T. cacao*) and cupuassu (*T. grandiflorum*) both suffering heavy losses caused by witches broom disease. With the objective of revitalise and consequently give access for genetic resources from an long term stabilised germplasm bank located at the fields of EMBRAPA - Oriental Amazon. Since the original the original maps and precedence registrations of specimens planted were lost, an inventory mapping and identification of all specimens existing in the area were made. In an area of 70.200 m² were founded 1,208 trees, with at least nine different species from diverse regions of Amazon, from these, at least 290 are hybrids from four different matches.

Key words: fruit crop, cocoa, cupuassu

INTRODUÇÃO

A Embrapa Amazônia Oriental, situada em Belém, Estado do Pará, abriga um banco de germoplasma de diferentes espécies do gênero *Theobroma* L. (Sterculiaceae). Esta coleção foi inicialmente estabelecida por volta de 1945, pelos pesquisadores do antigo "Instituto Agrônomo do Norte - IAN", George O'Neill Addison e Rosendo Miranda Tavares. O objetivo principal da criação dessa coleção foi dar suporte a um programa de criação de "*uma nova espécie que apresentasse resistência às principais moléstias atuais* (que na época eram: vassoura-de-bruxa - *Crinipelis pernicioso*, podridão parda dos frutos (ou podridão-do-pé) - *Phytophthora palmivora* e mancha negra dos frutos - *Lasiodiplodia theobromae* (Benchimol, 2000)) e tivesse ainda a qualidade de suportar plantio direto no campo, sem necessidade de sombreamento" (Addison & Tavares, 1951).

A necessidade de se manter bancos ativos de germoplasma de espécies de *Theobroma*, fundamenta-se principalmente pela dificuldade de se preservar suas sementes, por serem recalcitrantes, não toleram baixas temperaturas e

dessecamento. O gênero *Theobroma* abriga duas importantes espécies econômicas da Amazônia, o cacauzeiro (*T. cacao*) e o cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*) onde a cultura de ambas sofre pesadas perdas pela doença conhecida como vassoura-de-bruxa.

A magnitude dessa coleção, doravante chamada "O'Neill Addison" é principalmente pela riqueza de diferentes híbridos férteis e elevado número de indivíduos e espécies, todos reprodutivamente ativos.

O presente trabalho é fruto do esforço conjunto entre a Embrapa Amazônia Oriental e a Universidade Federal de Santa Catarina, onde essas instituições, com o apoio financeiro do CNPq/PTU, empenharam-se no inventário e revitalização da coleção, já que as informações originais foram perdidas, não existindo mais os mapas nem o histórico das origens dos espécimes ali plantados (Silva & Venturieri, 1998).

MATERIAIS E MÉTODOS

Baseados nos relatórios gerados por Venturieri et al. (1998, 1999) deu-se continuidade ao trabalho de inventário da coleção remanescente. A área com 70.200 m², foi dividida em três subáreas (S-1, S-2 e S-3), que por sua vez, sofreram tratamentos distintos de acordo com suas condições e localização de suas matrizes.

A subárea-1 (S-1), por estar localizada em meio a uma capoeira com mais de 50 anos, fez-se necessário à abertura de trilhas com a colocação de piquetes nos vértices das quadras. Cada quadra continha 50 m x 50 m e foram dispostas baseadas em um eixo cartesiano imaginário (Fig. 1).

As matrizes foram numeradas em faixas de 10 m, ao longo de 50 m, conforme Fig. 3. A rotulagem das matrizes foi feita com etiquetas de alumínio contendo o número da quadra, o número da matriz e a identificação da espécie. Das matrizes inventariadas foi coletado o diâmetro, a posição exata com relação aos eixos cartesianos e amostras botânicas. As herborizações foram identificadas e posteriormente depositadas no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental.

Na subárea-2 (S-2), inicialmente foi realizada uma limpeza para retirada de árvores caídas, excesso de vassoura-de-bruxa, plantas invasoras e epífitas existentes nos troncos das matrizes. Esta limpeza foi feita para facilitar as aferições,

rotulagem e posicionamento das matrizes, adotando-se o mesmo sistema empregado na S-1. Com esse trabalho foi possível a remarcação das matrizes ainda existentes, em que a maioria delas já haviam sido identificadas por Silva & Venturieri (1998).

Na subárea-3 (S-3) realizou-se o coroamento e adubação das matrizes, adotando-se a mesma metodologia de inventário empregada nas subáreas anteriores. A maioria das matrizes desta área também já haviam sido identificadas por Silva & Venturieri (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

É importante ressaltar que tanto na S-1 quanto na S-3, as condições naturais mantiveram-se quase inalteradas, evitado-se o máximo possível a eliminação da vegetação natural existente. Na S-1, foram encontradas diversas matrizes de híbridos, ainda não-identificados.

A S-3 é constituída principalmente de híbridos de *T. sylvestre* com *T. speciosum* (Fig. 3-f), 261 indivíduos e 63 indivíduos da seção *Oreanthes* (Segundo Cuatrecasas (1964) a seção *Oreanthes* é constituída de 5 espécies: *T. sylvestri*, *T. speciosum*, *T. velutinum*, *T. glaucum*, e *T. bernoullii*). Híbridos de *T. grandiflorum* com *T. subincanum* (Fig. 3-d) e *T. grandiflorum* com *T. obovatum*, também foram encontrados, em que ambos apresentaram aparente resistência à vassoura de bruxa.

No total, foram inventariadas 1.208 árvores, sendo: 442 na S-1, 427 na S-2 e 339 na S-3 (Fig. 1). É importante ressaltar que desse total de 1.208 matrizes, nem todas foram identificadas, contudo, amostras botânicas foram coletadas e depositadas no Herbário-IAN da Embrapa Amazônia Oriental.

Tabela 1. Espécies do gênero *Theobroma* encontradas na subárea 2 da coleção "O'Neill Addison" da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

Matrizes	Código	Nº de árvores
<i>T. speciosum</i>	SEC	198
<i>T. grandiflorum</i>	GRA	119
<i>T. obovatum</i>	OBO	15
<i>T. sylvestre</i> x <i>T. speciosum</i>	SLV x SEC	36
<i>T. obovatum</i> x <i>T. subincanum</i>	OBO x SUB	7
<i>T. sylvestre</i>	SLV	5
<i>T. subincanum</i>	SUB	1
Árvores da secção Oreanthes não identificadas	-	32
<i>T. especiosum</i> x <i>T. sylvestre</i> cf. <i>poliplóide</i>	SS	1
<i>T. bicolor</i>	BIC	3
Árvores não identificadas	-	10
Total de matrizes		427

Tabela 2. Espécies do gênero *Theobroma* encontradas na subárea 3 da coleção "O'Neill Addison" da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA.

Matrizes	Nº de árvores
Árvore da seção Oreanthes não identificadas	63
<i>T. sylvestre</i> x <i>T. speciosum</i>	251
<i>T. grandiflorum</i> x <i>T. subincanum</i> e <i>T. grandiflorum</i> x <i>T. obovatum</i>	31
Total de matrizes	339

A coleção de germoplasma de *Theobroma* "O'Neill Addison" abriga importante material genético deste gênero, contendo 1.208 matrizes, com pelo menos nove espécies diferentes de diversas regiões da Amazônia. Dessas 442 matrizes da S-1, muitas ainda não foram identificadas, havendo a possibilidade da existência de novas espécies e novos híbridos, aumentando ainda mais a importância dessa coleção.

CONCLUSÕES

A Coleção de Germoplasma de *Theobroma* Addison O'Neill abriga importante material genético deste gênero, contendo no mínimo 290 híbridos (4 tipos diferentes), com pelo menos seis espécies diferentes de diversas regiões da Amazônia. A coleção poderá servir de base para trabalhos de melhoramento genético e biologia reprodutiva.

AGRADECIMENTOS

A Antonio Andrey Silva Matos, Carla K. A. Moraes, Charles André Barbosa Pereira, Gracielma Costa Ferreira, Januário Souza de Araújo, Kalry Koga e Sebastião da Cunha Lopes, que colaboraram em diversas fases deste projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENCHIMOL, R. L. **Doenças do cupuaçuzeiro causadas por fungos**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000, 50p.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Bulletin of the United States National Museum**. Washington D. C: Smithsonian Institution. 1964, 614p.

O'NEILL ADDISON, G. e TAVARES, R. M. Observações sobre as espécies do gênero *Theobroma* que ocorrem na Amazônia. **I.A.N. - Boletim Técnico**, Belém, v. 25, outubro 1951.

SILVA, C. R. de S. e VENTURIERI, G. A. Híbridos do Gênero *Theobroma*: Levantamento, Histórico e Perspectiva. 1-33p. in VENTURIERI, G. A.; RODRÍGUEZ, A. A.; RAMOS, A. R.; SILVA, C. R. S.; SILVA, F. C. O.; OHANA, F. M.; BRABO, L. B.; SOUZA, M. S.; POTIGUAR, R. V.; SOUZA, S. P. de. **Biologia aplicada à domesticação de fruteiras amazônicas do gênero *Theobroma*. Primeiro Relatório**. Processo n. 63.00.13/95-0 CNPq/PTU. Universidade Federal do Pará. 1998. (não publicado)

VENTURIERI, G. A.; RODRÍGUEZ, A. A.; RAMOS, A. R.; FIGUEIRA, A. V. O.; SILVA, C. R. S.; OHANA, F. M.; BRABO, L. B.; CASTRO, N. M. ; CUCCO, S. M.; POTIGUAR, R. V. **Biologia aplicada à domesticação de fruteiras amazônicas do gênero *Theobroma*. Segundo Relatório**. Processo n. 63.00.13/95-0 CNPq/PTU. Universidade Federal do Pará. 1999. (não publicado)

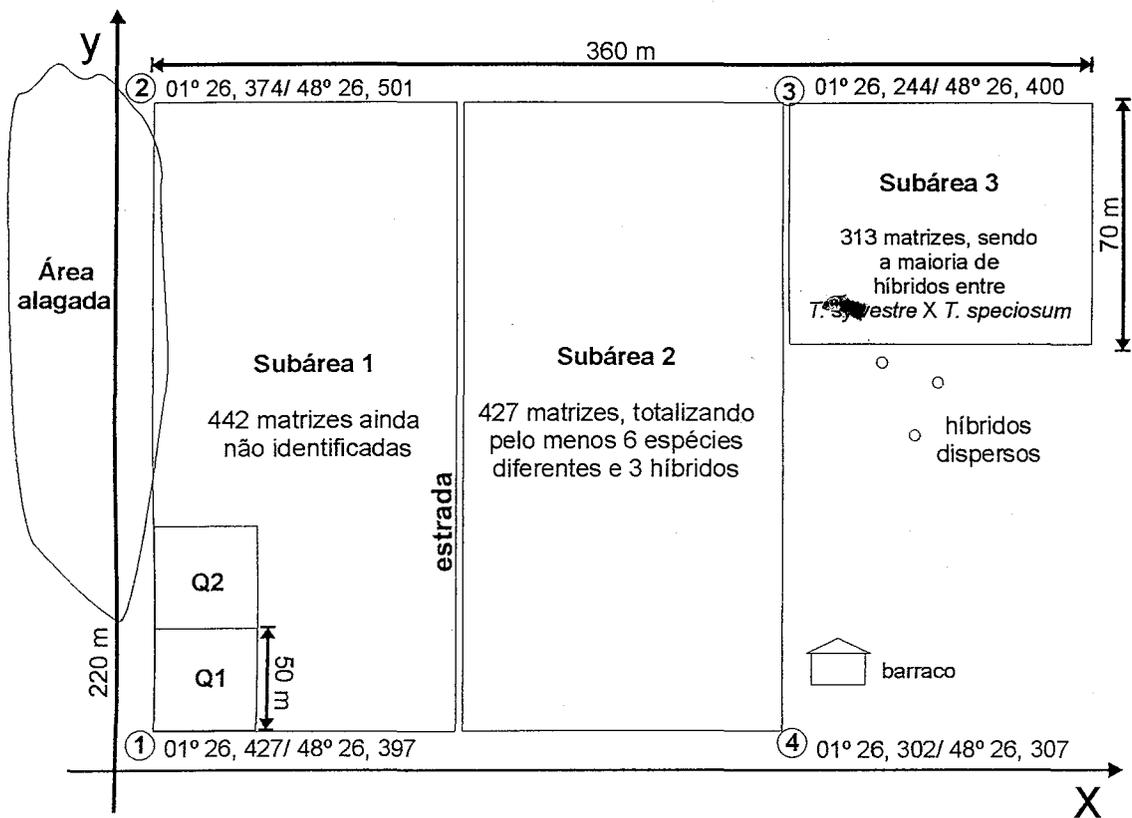


Fig. 1. Localização das três subáreas da coleção de Theobroma "O'Neill Addison", Embrapa Amazônia Oriental, Belém- PA.

Subárea - 1, Quadra - 7

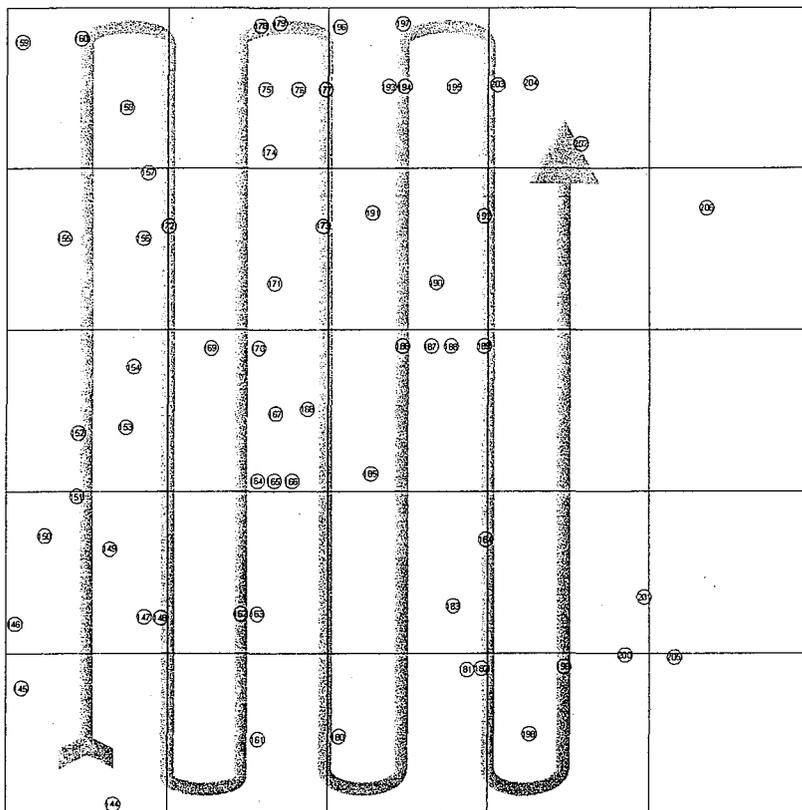


Fig. 2. Exemplo de numeração realizada nas matrizes, quadra sete (Q-7), na coleção de Theobroma "O'Neill Addison", Belém, PA.

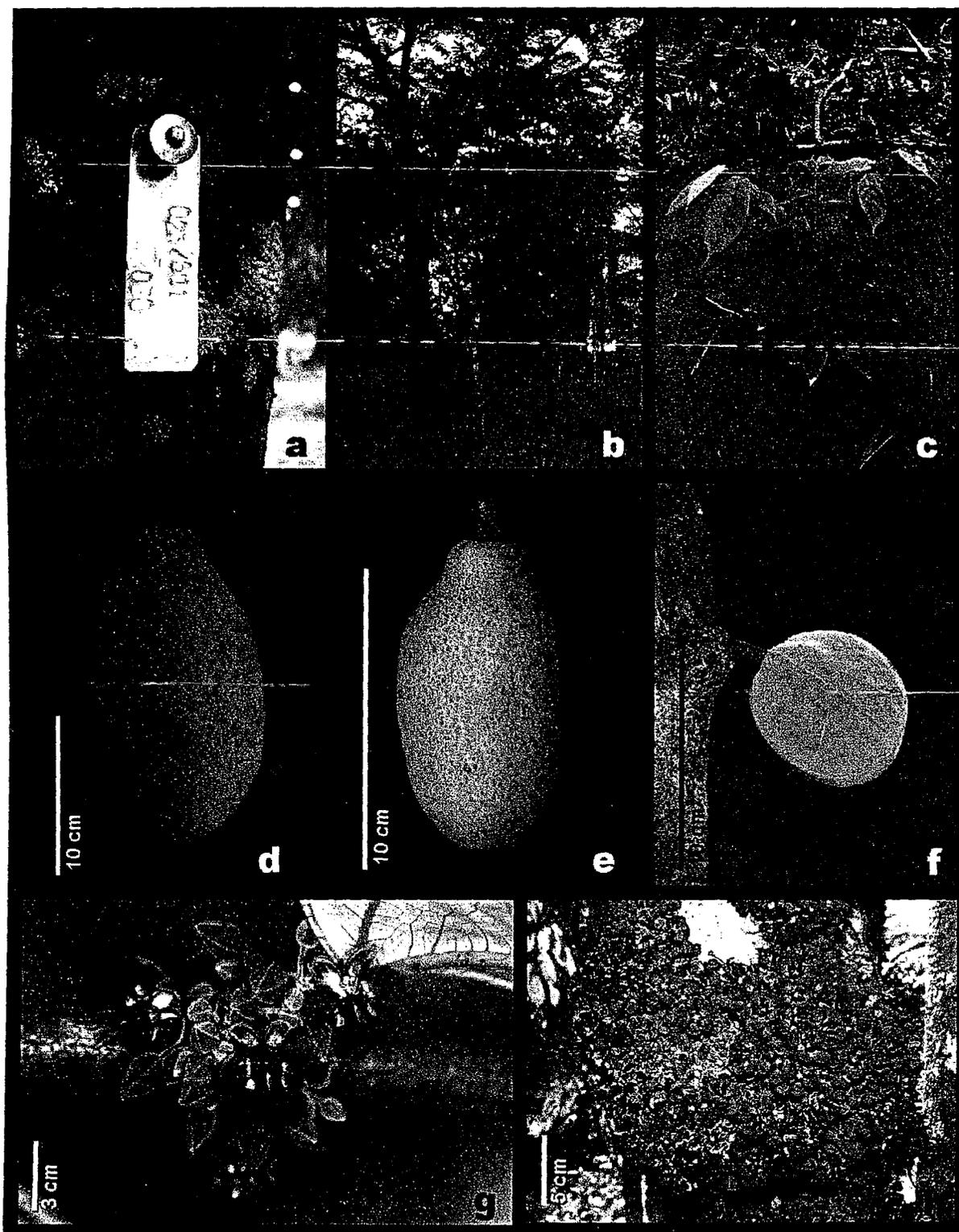


Fig. 3. Coleção de *Theobroma* O'Neill Addison, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. a. rotulagem permanente das árvores inventariadas; b. árvore de híbrido de *T. obovatum* x *T. subincanum*; c. reconstituição da coleção com o plantio de novos espécimes; d. fruto de híbrido entre *T. grandiflorum* X *T. subincanum*; e. fruto de híbrido entre *T. obovatum* x *T. subincanum*; f. fruto de híbrido entre *T. sylvestre* x *T. speciosum*; g. inflorescência de híbrido de *T. sylvestre* x *T. speciosum* e h. inflorescência de *T. speciosum*.

PROPAGAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE GENOTIPOS DE HÍBRIDOS ENTRE *Theobroma grandiflorum* x *Theobroma obovatum*¹

José Edmar Urano de Carvalho²
Giorgio Cristino Venturieri³
Giorgini Augusto Venturieri⁴

RESUMO

Com o objetivo de propagar e conservar dois genótipos do híbrido interespecífico entre *T. grandiflorum* e *T. obovatum*, existentes no Banco de Germoplasma de *Theobroma* da Amazônia Oriental, foram realizados testes em dois porta enxertos diferentes. A propagação dos dois indivíduos foi efetuada pelo método de garfagem no topo em fenda cheia. Para o híbrido identificado no Banco como GO 1 estudou-se a compatibilidade do mesmo em porta-enxertos de *T. grandiflorum* e *T. subincanum*. Não foi constatada diferença significativa entre os diferentes porta-enxertos pelo teste de *t* ($p = 0,17$). No entanto, a propagação de híbridos interespecíficos entre *T. grandiflorum* x *T. obovatum* por enxertia, pelo método de garfagem no topo em fenda cheia, mostrou-se eficiente, particularmente quando utilizou-se como porta-enxerto a espécie *T. grandiflorum*, obtendo-se porcentagem de enxertos pegos superior a 80%. Observou-se, um ano após o plantio no local definitivo, floração abundante em todas as plantas, não havendo, com exceção de uma planta, vingamento de frutos.

INTRODUÇÃO

Os trabalhos de hibridação entre espécies do táxon *Theobroma*, desenvolvidos por Addison & Tavares (1951 e 1952), no início da década de 50, tinham como principal objetivo a obtenção de híbridos interespecíficos entre o cacauero e outras espécies do gênero, que apresentassem resistência às principais doenças e que pudessem ser cultivados em pleno sol. Não obstante o fato dos estudos estarem direcionados para o cacauero, a espécie mais importante do gênero do ponto de vista econômico. Esses pesquisadores efetuaram também cruzamentos entre outras espécies do gênero, que culminaram com a obtenção de diversos híbridos interespecíficos e a demonstração de que há grande afinidade genética entre as espécies *T. subincanum*, *T. obovatum* e *T. grandiflorum* e entre as espécies *T. sylvestre* e *T. speciosum*. As relações filogenéticas foram menos expressivas entre *T. grandiflorum* e *T. cacao* e nas demais espécies (Venturieri 1993).

Os híbridos obtidos por Addison & Tavares (1951) constituem-se em valioso patrimônio mas, paradoxalmente, pouca atenção tem sido dispensada aos mesmos. Todos os materiais originais, que contam presentemente com mais de 50 anos de idade, têm sido

¹ Projeto financiado pelo CNPq/PTU, Processo n. PTU/469915/00-5.

² Pesquisador II Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro s/n, 66.095-100.
urano@cpatu.embrapa.br.

³ Pesquisador III Embrapa Amazônia Oriental, giorgio@cpatu.embrapa.br.

⁴ Professor PhD., UFSC/CCB, giorgini@ccb.ufsc.br.

conservados, precariamente, na coleção deixada por esses pesquisadores, na sede da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA. Os trabalhos de conservação têm sido limitados ao controle do mato e, eventualmente, a remoção de ramos atacados pela doença vassoura-de-bruxa. Em decorrência desses fatos, importantes genótipos da coleção têm sido perdidos, tanto pelo ataque de pragas e doenças como pelo tombamento de plantas devido a ventos fortes.

Esse trabalho teve como objetivo propagar e conservar dois genótipos do híbrido interespecífico entre *T. grandiflorum* e *T. obovatum*, cujas árvores tinham sido derrubadas pela ação de ventos, no ano de 2000, mas cujos ramos ainda continuavam vivos no início de 2001, inclusive com frutificação abundante em uma delas.

MATERIAL E MÉTODOS

A propagação dos dois híbridos foi efetuada pelo método de garfagem no topo em fenda cheia. Para o híbrido identificado no Banco como GO 1 estudou-se a compatibilidade do mesmo em porta-enxertos de *T. grandiflorum* e *T. subincanum*. Para o híbrido identificado na Coleção como GO 10 a enxertia foi efetuada somente sobre porta-enxertos de *T. grandiflorum*.

Os porta-enxertos dessas duas espécies foram obtidos por meio de sementes, oriundas de plantas estabelecidas no Banco. Adotou-se o sistema de semeadura direta em sacos de plástico, contendo como substrato a mistura de solo (60%), esterco (20%) e pó de serragem (20%). Os sacos de plástico para formação dos porta-enxertos apresentavam as seguintes dimensões: 18 cm de largura, 35 cm de altura e espessura de 200 μ .

Para cada espécie de porta-enxerto, foi utilizado cinco repetições de dez plantas. As ponteiras foram retiradas de ramos iguais. Para tanto, foram retiradas ponteiras de ramos vivos e com folhas maduras. Por ocasião da enxertia, efetuou-se a remoção de todas as folhas das ponteiras, com exceção das duas últimas que foram, no entanto seccionadas transversalmente na sua porção mediana. Os resultados dos tratamentos foram comparados pelo teste de *t* usando o arco seno da proporção de pegamento (SOKAL & ROHLF, 1981)

A conservação desses dois genótipos está sendo efetuada na sede da Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA, tendo sido implantado, em julho de 2001, um pequeno pomar constituído de 21 plantas do híbrido GO 1 e três do híbrido GO 10. Esse pomar foi implantado no espaçamento de 4 m x 3,5 m.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi constatada diferença significativa entre os diferentes porta-enxerto pelo teste de *t* ($p= 0,17$). No entanto, a propagação de híbridos interespecíficos entre *T. grandiflorum* x *T. obovatum* por enxertia, pelo método de garfagem no topo em fenda cheia, mostrou-se eficiente, particularmente quando utilizou-se como porta-enxerto a espécie *T. grandiflorum*, obtendo-se porcentagem de enxertos pegos superior a 80%. A porcentagem de enxertos pegos foi menos satisfatória quando a enxertia foi efetuada em porta-enxertos da espécie *T. subincanum*, obtendo-se valor em torno de 80% (Figura 1).

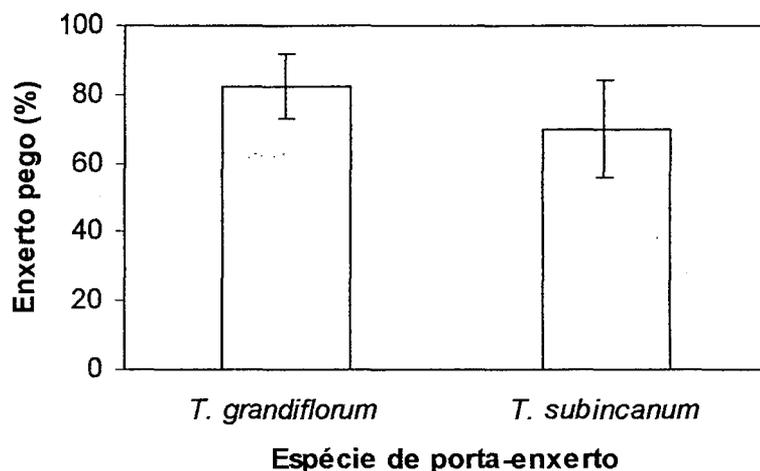


Figura 1. Percentagem de pegamento de enxertos de do híbrido de *T. grandiflorum* x *T. obovatum* sobre diferentes porta-enxertos. As barras ao topo indicam 1 desvio padrão.

Em ambas as espécies de porta-enxertos o início da brotação dos enxertos verificou-se entre 30 e 35 dias após a enxertia. Os enxertos mais retardatários requereram cerca de 55 dias para que ocorresse a emissão de brotações. As mudas estavam aptas para serem plantadas no local definitivo aproximadamente três meses após a enxertia.

No que concerne a conservação dos dois genótipos foram efetuadas as adubações das plantas e o controle do mato, no período de julho de 2001 a dezembro de 2002. Também efetuou-se a poda das mesmas com o objetivo de corrigir o tropismo, pois as plantas, independente, do genótipo e do porta-enxerto, ao atingirem 50 cm de altura, apresentavam copa decumbente.

Observou-se, um ano após o plantio no local definitivo, floração abundante em todas as plantas, não havendo, com exceção de uma planta, vingamento de frutos.

Decorridos 18 meses do plantio, apenas uma planta, das 24 plantadas morreu. Para recompor o estande o replantio deverá ser efetuado no período chuvoso dos anos subseqüentes.

CONCLUSÕES

A propagação de híbridos interespecíficos de *T. grandiflorum* com *T. obovatum* pode ser feita com eficiência através de enxertia - método de garfagem no topo em fenda cheia. O método mostrou-se particularmente eficiente quando se utilizou como porta-enxerto a espécie *T. grandiflorum*.

BIBLIOGRAFIA

ADDISON, G. O'N. & TAVARES, R. M. 1951. Observações sobre as espécies do gênero *Theobroma* que ocorrem na Amazônia. **Bol. Tec. do Inst. Agron. do Norte**. 25: 1-41

ADDISON, G. O'N. & TAVARES, R. M. 1952. Hybridation and grafting in species of *Theobroma* which occur in Amazonia. **Evolution** 6: 380-386

SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. 1981. **The Principles and Practice of Statistics in Biological Research** (2nd ed.). San Francisco: State University of New York at Stony Brook, 776 p.

VENTURIERI, G. A. 1993. **Cupuaçu: A Espécie, sua Cultura, Usos e Processamento**. Clube do cupu, 118p. Belém PA.



Figura 2. Híbrido entre *Theobroma grandiflorum* e *T. obovatum*. **a.** Indivíduo adulto (aproximadamente 50 anos) da coleção de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, Belém,PA; **b.** híbridos propagados por enxertia; **c.** fruto; **d.** flor e **e.** planta enxertada com um ano de idade.

BIOMETRIA DE FRUTOS DE *THEOBROMA SPECIOSUM* (STERCULIACEAE)¹

Giorgini Augusto Venturieri²

Gunther Barbosa³

Giorgio Cristino Venturieri⁴

RESUMO: É reconhecido que a Amazônia é um dos maiores repositórios de espécies úteis do planeta o que faz da região um campo propício para a seleção de novas espécies e variedades econômicas. O cacauí (*Theobroma speciosum*) é possivelmente uma destas espécies pois as suas sementes dão um excelente chocolate e é, entre as espécies amazônicas, a que tem o perfil da gordura mais similar ao do cacau (*T. cacao*). No presente trabalho é apresentada a biometria do seu fruto e avaliado o rendimento de cada uma das partes. A mais pesada é a casca (60% em média), seguida da sementes (24%), polpa (12%) e a placenta (4%). As matrizes diferem consideravelmente para todas as variáveis indicando que há possibilidades para a seleção genética. O peso do fruto está fortemente associado ao seu comprimento ($r = 0,92$) e diâmetro ($r = 0,90$), ou seja ao seu volume. O peso do fruto também está fortemente associado ao peso da casca ($r = 0,97$). O peso total de sementes tem um menor grau de associação com as variáveis relacionadas ao volume do fruto. Está mais associada ao número de sementes normais ($r = 0,79$) e ao peso da placenta ($r = 0,76$). Todas estas variáveis praticamente não estão relacionadas ao número de sementes murchas apesar desta última ter apresentado uma fraca (porém significativa) correlação negativa com o peso da placenta. O peso da placenta mostrou um associação fraca, embora significativa, com o número de sementes normais ($r = 0,41$) e associação negativa ($r = -0,26$) com o número de sementes murchas de onde supõe-se que o vigor da placenta esteja favorecendo um maior pegamento das sementes ou vice versa. A casca é um caráter que seria interessante diminuir a sua proporção mas esta característica mostrou-se modestamente variável entre as matrizes avaliadas, logo matrizes mais variáveis para este caráter teriam que ser buscadas. A porcentagem de casca é um caráter de fraca associação significativa com os demais. Está negativamente correlaciona ao peso das sementes ($r = -0,42$), ao peso da polpa ($-0,38$) e ao número de sementes normais ($r = -0,52$). Por ser esta última característica a de maior índice de associação negativa com a porcentagem de casca, e também por ser mais fácil de ser obtida, sugere-se que, para diminuir a porcentagem de casca, sejam selecionadas matrizes cujo os frutos tenham um maior número de sementes.

Palavras chave: rendimento, domesticação, cacau, sucedâneo

¹ Estudos financiados pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq)/ Programa do Trópico Úmido (PTU) (proc. n.º 46.99915/00-5)

² Professor, UFSC, giorgini@ccb.ufsc.br, Cx.P. 476, Florianópolis, SC, CEP: 88.040-900.

³ Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC/CCA - Pós graduação RGV, 88.040-900, Florianópolis - SC Brasil. e-mail: gunther_cca@yahoo.com.br

⁴ Pesquisador, Embrapa Amazônia Oriental, giorgio@cpatu.embrapa.br, Cx. P. 48, Belém, PA, CEP: 66.095-100.

INTRODUÇÃO

É reconhecido que a Amazônia é um dos maiores repositórios de espécies úteis do planeta, com pelo menos 100 fruteiras consideradas potenciais e/ou de uso consagrado entre os povos da Amazônia (VENTURIERI, 1993), o que faz da região um campo propício para a seleção de novas espécies e variedades com maior capacidade de produção e resistência. O cacauí (*Theobroma speciosum*) é possivelmente uma destas espécies.

O gênero *Theobroma* possui 22 espécies restritas da América Tropical, dessas 8 são amazônicas e 7 habitam o Estado do Pará (CUATRECASAS, 1964). Segundo este autor o gênero está dividido em 6 seções (*Andropetalum*, *Glossopetalum*, *Oreanthes*, *Rhytidocarpus*, *Telmatocarpus* e *Theobroma*). O *T. bicolor* pertence a seção *Rhytidocarpus*. O gênero é mais conhecido pela espécie *T. cacao*, que é a base da indústria chocolateira, mas as sementes de outras espécies de *Theobroma* (*T. camargoanum*, *T. bicolor*, *T. grandiflorum*, *T. microcarpum*) também servem para fazer chocolate, mas com exceção de *T. grandiflorum*, as demais ainda não são exploradas comercialmente para este fim (VENTURIERI, 1993).

O cacauí ocorre nas florestas úmidas da América Central até a Hiléia Amazônica (CUATRECASAS, 1964; DUCKE, 1953). A sua árvore atinge 15 m, com um pequeno capitel de folhas no topo. As flores, com forte cheiro de casca de limão, são hermafroditas e apresentadas em densas almofadas florais (figura 1). Os estames são cobertos por um capuz (cógula) e separados do gineceu por uma coroa de estaminódios que impossibilitam o contato direto entre as partes sexuais da flor. O fruto é semelhante ao do cacau verdadeiro, com polpa succulenta brancacenta (figura 1).

No presente trabalho é apresentada a biometria de frutos de *T. speciosum* e avaliado o rendimento de cada uma de suas partes passíveis de aproveitamento.

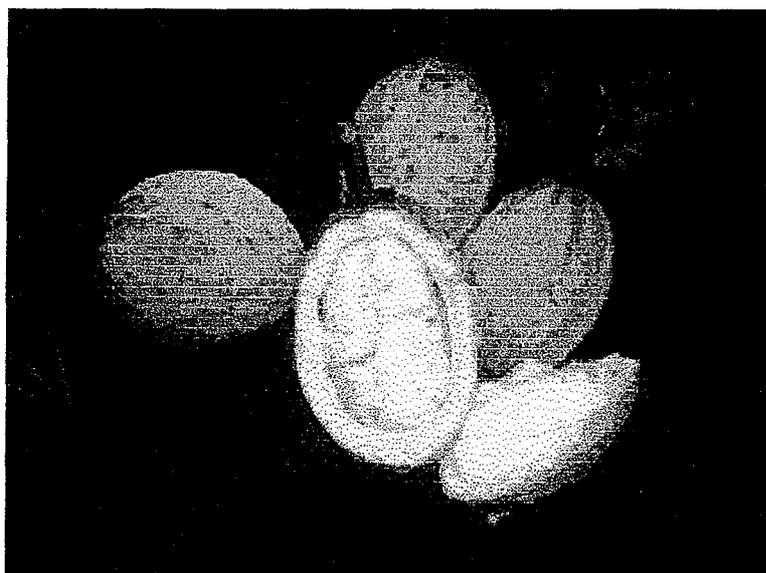


Figura 1: Fruto de *Theobroma speciosum*

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos maduros de *T. speciosum* foram coletados da árvore na coleção "Basil Bartley", pertencente a CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), em Ananindeua, PA (BR 316, Km17; Lat. 1° 12'S; Long. 49° 13'W). Logo após a coleta foram feitas as seguintes medições: comprimento; diâmetro e espessura da casca na parte equatorial do fruto; peso total do fruto; peso da casca; peso das sementes com polpa e sem polpa; peso da placenta; número de sementes boas e murchas. Para a determinação das dimensões do fruto foram utilizados uma régua com um esquadro e um paquímetro. As pesagens foram feitas em balança com precisão de 0,01 g. O despulpamento das sementes foi feito manualmente esfregando-se as sementes contra um pano e depois em um papel-toalha. O peso da polpa foi obtido por diferença entre o peso das sementes com polpa e despulpadas.

Foram coletados frutos de 5 matrizes (min. 6, máx. 19 frutos por matriz), totalizando 63 frutos.

Os dados foram analisados com o auxílio do programa Statistica (STATSOFT, 1995) tendo sido calculadas, para todos os caracteres tomados, estatísticas descritivas (média, valores mínimos, máximos e coeficiente de variação) e elaborados gráficos bi-dimensionais com a média (mais e menos 1 erro padrão da média). O índice de correlação de Pearson entre as características foi calculado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de cada característica estão apresentados na tabela 1:

Tabela 1: Valores médios de cada característica tomada de *T. speciosum*.

Característica	N	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Comprimento do fruto (cm)	63	97.08	56.38	126.08	15.37	15.83
Diâmetro do fruto (cm)	63	64.88	29.90	77.90	8.74	13.48
Espessura da casca (cm)	63	0.71	0.35	0.98	0.11	16.08
Peso do fruto (g)	63	187.52	26.00	346.00	70.42	37.55
Peso da casca (g)	63	117.33	18.00	211.00	42.66	36.36
Peso das sementes (g)	63	46.17	4.00	87.00	19.82	42.92
Peso da polpa (g)	63	22.68	3.00	56.00	11.42	50.35
Peso da placenta (g)	63	8.59	1.00	22.00	4.36	50.83
Número de sementes	63	20.49	4.00	30.00	6.69	32.66
N. de sementes murchas	63	1.32	0.00	7.00	1.51	114.73

A parte do fruto mais pesada é a casca (60% em média), seguida da sementes (24%), polpa (12%) e a placenta (4%) (tabela 1 e figura 2). As matrizes diferem consideravelmente para todas as variáveis indicando que há possibilidades para a seleção genética de matrizes com frutos mais pesados e com menor proporção de casca (tabela 2).

Tabela 2: Valores médios da porcentagem de cada característica por matriz estudada de *T. speciosum*.

Matriz	Peso fruto (g)	Casca (%)	Sementes (%)	Polpa (%)	Placenta (%)
L6PI13	187.83	62.20	22.01	15.71	5.41
L8PI01	134.00	60.25	28.75	10.76	3.57
L8PI02	215.43	62.86	25.73	10.74	3.91
L8PI03	133.57	68.56	18.72	13.37	3.64
L8PI04	244.75	60.84	23.83	13.31	5.55
L8PI10	230.08	64.51	24.12	10.87	4.82
CV (%)	25.19	4.79	14.20	16.24	19.90

Embora os frutos aqui analisados possam ser considerados como característicos para a espécie, na Coleção "Addison O'Neill, pertencente a EMBRAPA - Amazônia Oriental, existe uma fila de plantas produzindo frutos grandes, muito bonitos e abundantemente, indicando que o formador desta coleção já tinha em mente usar *T. speciosum* com uma possível fonte de matéria prima para a indústria chocolateira. Segundo LeCointe, (1947) "as sementes (do *T. speciosum*) dão um excelente chocolate" e é, entre as espécies amazônicas, a que tem o perfil da gordura mais similar ao do cacau (*T. cacao*) (Silva, 2000).

Avaliando a associação entre variáveis (figura 3 e 4), nota-se o peso do fruto está fortemente associado ao seu comprimento ($r = 0,92$) e diâmetro ($r = 0,90$), ou seja ao seu volume. O peso do fruto também está fortemente associado ao peso da casca ($r = 0,97$). O peso total de sementes, que seria o produto mais nobre para o momento, tem um menor grau de associação com as variáveis relacionadas ao volume do fruto. Está mais associada ao número de sementes normais ($r = 0,79$) e ao peso da placenta ($r = 0,76$). Todas estas variáveis praticamente não estão relacionadas ao número de sementes murchas, apesar desta última ter apresentado uma fraca (porém significativa) correlação negativa com o peso da placenta. O peso da placenta mostrou uma associação fraca, embora significativa, com o número de sementes normais ($r = 0,41$) e associação negativa ($r = - 0,26$) com o número de sementes murchas de onde supõe-se que o vigor da placenta esteja favorecendo um maior pagamento das sementes ou vice versa.

Como visto, a casca é a parte do fruto de maior peso (figura 2) e no momento sem qualquer potencial de uso identificado, logo é um caráter que seria interessante diminuir a sua proporção para evitar o carreamento de energia da planta para uma parte não aproveitável. No entanto esta característica mostrou-se modestamente variável entre as matrizes avaliadas (tabela 2) e passível de pouco progresso de seleção, logo mais matrizes que mostrem-se mais variáveis para este caráter teriam que ser buscadas. A porcentagem de casca é um caráter de fraca associação

significativa com os demais. Está negativamente correlaciona ao peso das sementes ($r = -0,42$), ao peso da polpa ($- 0,38$) e ao número de sementes normais ($r= - 0,52$). Por ser esta última característica a de maior índice de associação negativa com a porcentagem de casca, e também por ser mais fácil de ser obtida, sugere-se que, para diminuir a porcentagem de casca, sejam selecionadas matrizes cujo os frutos tenham um maior número de sementes (tabela 3).

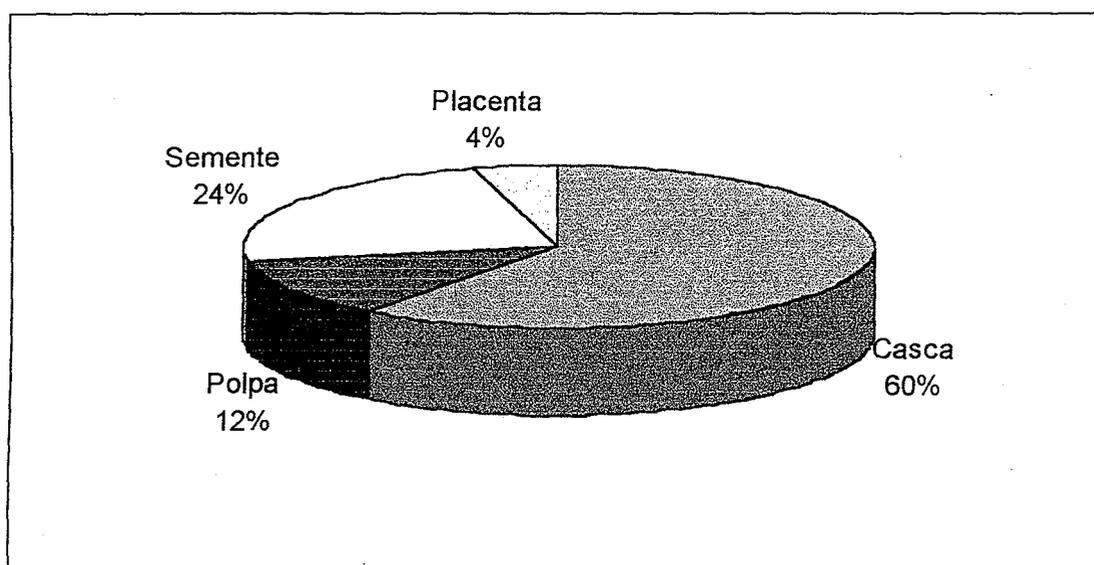


Figura 2: Proporções das partes do fruto de *T. speciosum*

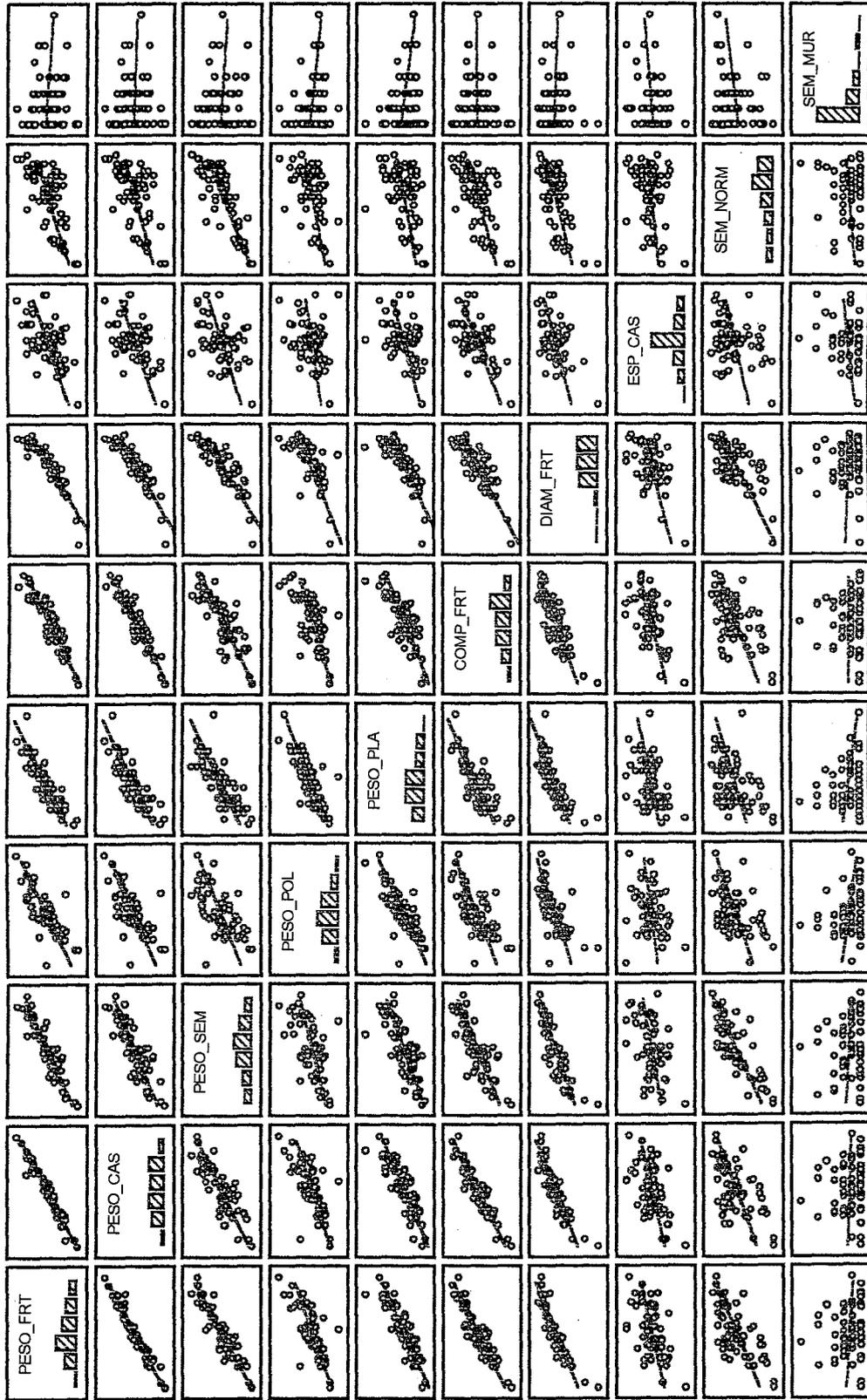


Figura 3: Associação entre todas as características tomadas de frutos de *T. speciosum*.

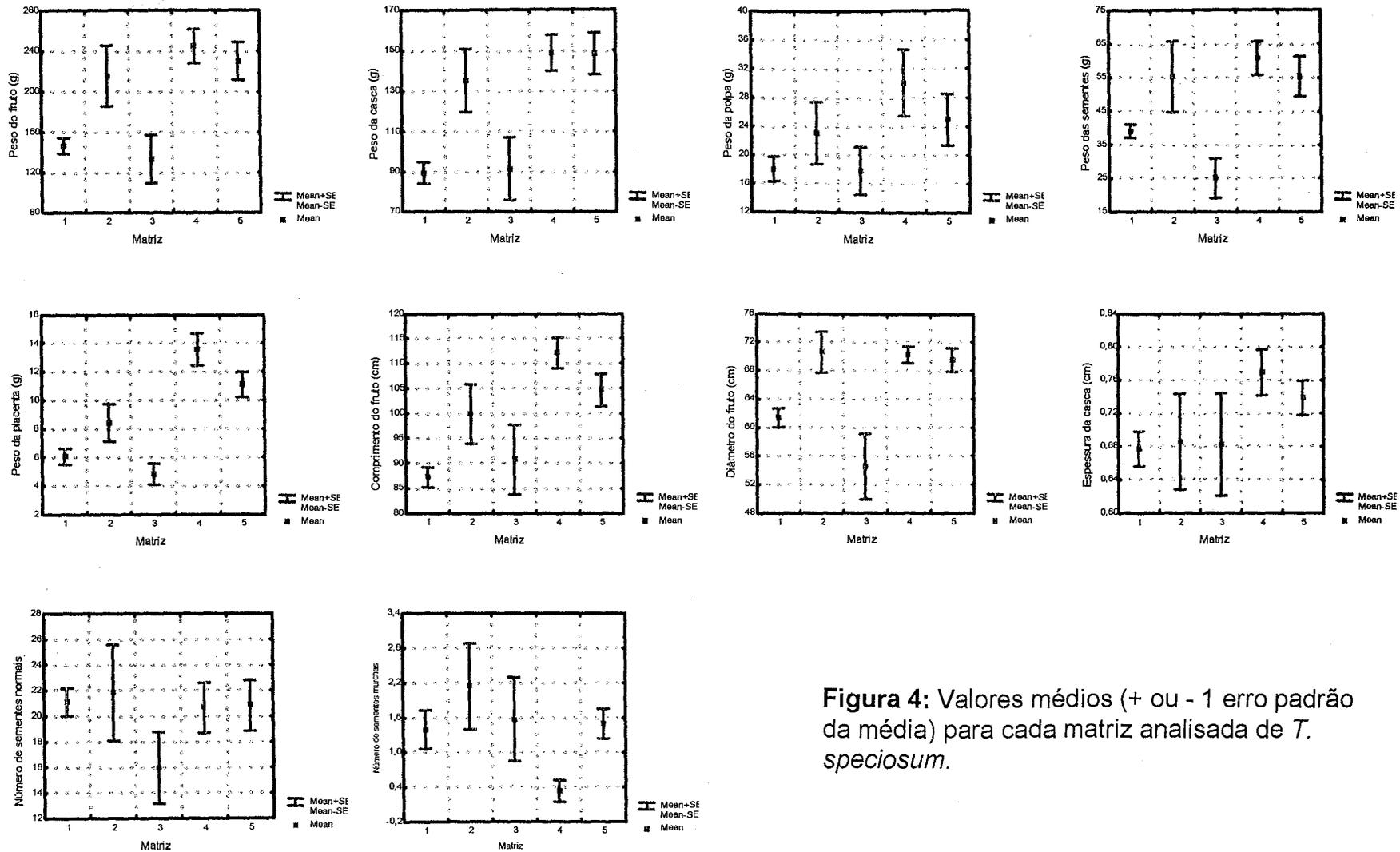


Figura 4: Valores médios (+ ou - 1 erro padrão da média) para cada matriz analisada de *T. speciosum*.

Tabela 3: Correlação entre todas as características tomadas dos frutos de *T. specisum*. Os valores em negrito são significativos ao nível de 5%.

	<i>Comprimento do fruto (cm)</i>	<i>Diâmetro do fruto (cm)</i>	<i>Espessura da casca (cm)</i>	<i>Peso total (g)</i>	<i>Peso da casca (g)</i>	<i>Peso das sementes (g)</i>	<i>Peso da polpa (g)</i>	<i>Peso da placenta (g)</i>	<i>Num. de sementes normais</i>	<i>Num. de sementes murchas</i>
Comprimento do fruto (cm)	1.00									
Diâmetro do fruto (cm)	0.81	1.00								
Espessura da casca (cm)	0.57	0.48	1.00							
Peso total (g)	0.92	0.90	0.51	1.00						
Peso da casca (g)	0.93	0.89	0.52	0.97	1.00					
Peso das sementes (g)	0.82	0.85	0.43	0.91	0.84	1.00				
Peso da polpa (g)	0.65	0.65	0.26	0.76	0.69	0.58	1.00			
Peso da placenta (g)	0.79	0.79	0.42	0.89	0.85	0.76	0.79	1.00		
Num. de sementes normais	0.59	0.65	0.29	0.66	0.58	0.79	0.47	0.41	1.00	
Num. de sementes murchas	0.01	-0.06	0.19	-0.12	-0.06	-0.11	-0.23	-0.26	0.18	1.00
Casca (%)	-0.08	-0.21	0.07	-0.22	-0.02	-0.42	-0.38	-0.23	-0.52	0.20

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CUATRECASAS, J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Conmt. Nat. Herb. (USA)* 35:379-614.
- DUCKE, A. 1953 As Espécies Brasileiras do Gênero *Theobroma* L *Boletim Técnico do IAN N° 28*, Belém Pará Brasil.
- LE COINTE, P. 1947. Árvores e Plantas Úteis (Indígenas e Aclimatadas) 2 ed. S. Paulo, Ed. Nacional, 506 p.
- STATSOFT, 1995. Statistica for Windows, Statsoft, Inc., Tulsa, OK (USA).
- SILVA, C. R., 2000. Filogenia do Gênero *Theobroma* Utilizando Marcadores Moleculares e Bioquímicos (Tese de Mestrado). CENA/USP, Piracicaba, 139 p.
- VENTURIERI, G.A. 1993. *Cupuaçu: A Espécie, sua Cultura, Usos e Processamento*. Clube do cupu, 118p. Belém PA.

BIOMETRIA DE FRUTOS DE *THEOBROMA BICOLOR* (STERCULIACEAE)¹

Giorgini Augusto Venturieri²

Gunther Barbosa³

Giorgio Cristino Venturieri⁴

RESUMO: É reconhecido que a Amazônia é um dos maiores repositórios de espécies úteis do planeta o que faz da região um campo propício para a seleção de novas espécies e variedades econômicas. O cacau-do-peru (*Theobroma bicolor*) é possivelmente uma destas espécies. No presente trabalho é apresentada a biometria do seu fruto e avaliado o rendimento de cada uma de suas partes passíveis de aproveitamento. A parte do fruto mais pesada é a casca (44% em média), seguida da polpa (35%) e depois sementes (19%) e por último a placenta (2%). O peso do fruto e da casca são fatores variáveis entre matrizes, mas a porcentagem de casca tem alguma variação (43,9% a 49,3%) indicando que há possibilidades para a seleção genética para frutos mais pesados e menor proporção de casca. O peso do fruto está associado ao seu comprimento ($r = 0,82$) e diâmetro ($r = 0,77$), ou seja ao seu volume. O peso do fruto também está associado ao peso ($r = 0,77$) e número ($r = 0,77$) de sementes normais. Todas estas variáveis praticamente não estão relacionadas ao número de sementes murchas. Há indicadores que o tamanho das sementes tendem a ser maiores nos frutos de maior volume. Para efeito de seleção genética para a produção de sementes devem ser selecionadas plantas que produzam os frutos maiores. A casca é um caráter que seria interessante diminuir a sua proporção. A porcentagem de casca está negativamente correlacionada à espessura da casca ($r = -0,60$) ao peso da polpa ($r = -0,78$) e curiosamente ao número de sementes murchas ($r = -0,51$). Como o peso da polpa é um caráter associado a vários outros associados ao tamanho do fruto, conclui-se que além da indicação para a seleção de frutos grandes, sejam preferidos os de casca fina e com baixo número de sementes murchas.

Palavras chave: rendimento, domesticação, cacau, sucedâneo

¹ Estudos financiados pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq)/ Programa do Trópico Úmido (PTU) (proc. n.º 46.99915/00-5)

² Professor, UFSC, giorgini@ccb.ufsc.br, Cx.P. 476, Florianópolis, SC, CEP: 88.040-900.

³ Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC/CCA - Pós graduação RGV, 88.040-900, Florianópolis - SC Brasil. e-mail: gunther_cca@yahoo.com.br

⁴ Pesquisador, Embrapa Amazônia Oriental, giorgio@cpatu.embrapa.br, Cx. P. 48, Belém, PA, CEP: 66.095-100.

INTRODUÇÃO

É reconhecido que a Amazônia é um dos maiores repositórios de espécies úteis do planeta, com pelo menos 100 fruteiras consideradas potenciais e/ou de uso consagrado entre os povos da Amazônia (VENTURIERI, 1993), o que faz da região um campo propício para a seleção de novas espécies e variedades com maior capacidade de produção e resistência. O cacau-do-peru (*Theobroma bicolor*) é possivelmente uma destas espécies.

O gênero *Theobroma* possui 22 espécies restritas da América Tropical, dessas 8 são amazônicas e 7 habitam o Estado do Pará (CUATRECASAS, 1964). Segundo este autor o gênero está dividido em 6 seções (*Andropetalum*, *Glossopetalum*, *Oreanthes*, *Rhytidocarpus*, *Telmatocarpus* e *Theobroma*). O *T. bicolor* pertence a seção *Rhytidocarpus*. O gênero é mais conhecido pela espécie *T. cacao*, que é a base da indústria chocolateira, mas as sementes de outras espécies de *Theobroma* (*T. camargoanum*, *T. bicolor*, *T. grandiflorum*, *T. microcarpum*) também servem para fazer chocolate, mas com exceção de *T. grandiflorum*, as demais ainda não são exploradas comercialmente para este fim (VENTURIERI, 1993).

O cacau-do-peru é uma espécie cujo local de origem não está definido. É encontrada desde o México passando pela América Central até o Norte da América do sul, incluindo a Amazônia (CUATRECASAS, 1964).

Os nomes mais comuns para a espécie *T. bicolor*, são: macambo (Amazônia Peruana e Colômbia); pataste (Costa Rica) e cacau-do-peru (Brasil). É uma planta bastante rústica que se adapta a diferentes habitats, tanto na beira do rio como em Terra Firme (CUATRECASAS, 1964).

A árvore em estado silvestre pode alcançar 30m de altura, apresenta tronco reto e madeira branca, com folhas amplas, ovato-oblongas e cartáceas, as flores são pequenos dicásios de cor vermelho-púrpura, o fruto é volumoso, oblongo elipsóideo medindo até 30 cm de comprimento e 12 de diâmetro com numerosas sementes, sua polpa é amarelada fibroso-sucosa (figura 1) e com odor que lembra ao de gasolina. O gosto é similar ao da jaca (*Artocarpus heterophyllus*). O fruto pode ser encontrado nas feiras em Belém no período de janeiro à abril. A porcentagem de sobrevivência da planta é alta, seu crescimento é rápido, e começa sua vida reprodutiva entre o 2º e 3º ano. Não é uma planta muito fecunda, geralmente produz no máximo de 12 frutos/planta (CAVALCANTE, 1988), esta é uma produtividade similar a do cupuaçu (*T. grandiflorum*) quando não cultivado em sistemas naturais (VENTURIERI, 1994). A baixa produtividade do cupuaçu é atribuída a problemas de polinização (VENTURIERI, 1994; VENTURIERI & RIBEIRO-FILHO, 1995).

O cacau-do-peru é um cultivo pré-colombiano, hoje em vias de abandono, com uso restrito em populações de índios do alto rio Solimões. Em Iquitos (Peru) é uma fruteira muito comum nos quintais domésticos, onde da polpa preparam refresco e consomem suas sementes depois de tostadas tomando o seu aroma e sabor mais delicados e atraentes (FAO, 1986; CAVALCANTE, 1988).

Esta espécie, assim outras do gênero *Theobroma*, que embora não tenham importância econômica atual, poderão vir a ser uma fonte de genes importantes

para as espécies atualmente econômicas como o cacau (*Theobroma cacao*) e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) ou mesmo como produto novo.

No presente trabalho é apresentada a biometria de frutos de *T. bicolor* e avaliado o rendimento de cada uma de suas partes passíveis de aproveitamento.

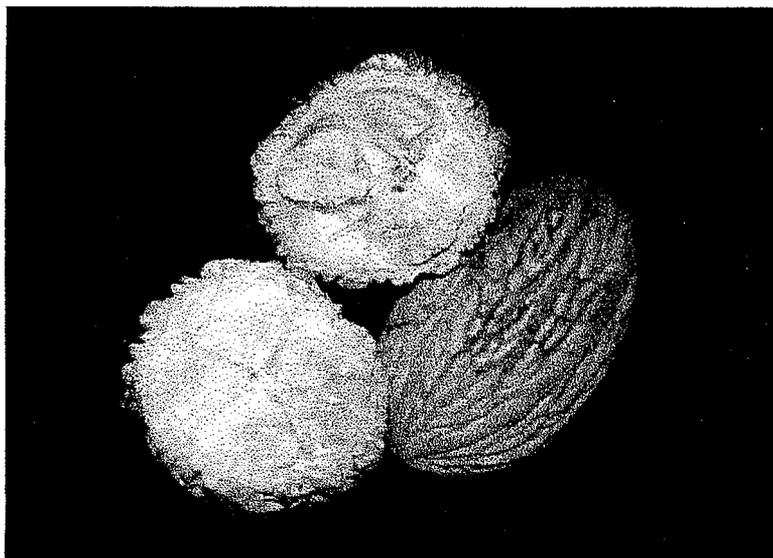


Figura 1: Fruto de *Theobroma bicolor*

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos recentemente caídos de *T. bicolor* foram coletados na coleção "Basil Bartley", pertencente a CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), em Ananindeua, PA (BR 316, Km17; Lat. 1° 12'S; Long. 49° 13'W). Logo após a coleta, dos frutos foram feitas as seguintes medições: peso total do fruto; peso da casca; peso das sementes com polpa e sem polpa; peso da placenta; comprimento e diâmetro do fruto; espessura da casca na parte equatorial do fruto; número de sementes boas e murchas. Para a determinação das dimensões, foi utilizado um paquímetro manual. As pesagens foram feitas em balança com precisão de 0,001 g. O despulpamento das sementes foi feito com o auxílio de uma tesoura comum. O peso da polpa foi obtido por diferença entre o peso das sementes com polpa e despulpadas.

Foram coletados frutos de três matrizes, 6 frutos por matriz, totalizando 18 frutos. As sementes foram fermentadas na casaca do próprio fruto por 4 dias. Uma amostragem de 5 sementes / matriz foi formada e colocadas para secagem ao sol, até que atingissem o peso mínimo constante.

Dos dados foram analisados com o auxílio do programa Statistica (STATSOFT, 1995) tendo sido calculadas estatísticas descritivas (média, valores

mínimo, máximos e coeficiente de variação) e elaborados gráficos bi-dimensionais com a média (mais e menos 1 erro padrão da média) para cada característica por matriz e entre todos os caracteres tomados. O índice de correlação de Pearson entre as características foi calculado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de cada característica estão apresentados na tabela 1:

Tabela 1: Valores médios de cada característica tomada de *T. bicolor*.

Característica	N	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Comprimento do fruto (cm)	18	17.2	14.5	19.5	1.77	10.29
Diâmetro do fruto (cm)	18	10.6	9.5	12	0.68	6.48
Espessura da casca (mm)	18	9.2	5.12	11.95	2.04	22.22
Peso do fruto (g)	18	890.2	645	1107	134.94	15.16
Peso da casca (g)	18	399.5	305	541	72.03	18.03
Peso das sementes (g)	18	173.8	113	231	34.03	19.58
Peso da polpa (g)	18	315.6	171	553	79.94	25.33
Peso da placenta (g)	18	21.6	10	32	7.00	32.38
Número de sementes	18	41.6	27	53	8.49	20.41
N. de sementes murchas	18	2.3	0	11	3.54	155.62

Tabela 2: Valores de cada característica das sementes de *T. bicolor*.

Característica das sementes	N	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
Peso total (g)	15	1.67	0.37	2.59	0.62	37.05
Peso do tegumento (g)	15	0.54	0.36	0.77	0.12	22.32
Peso da parte aproveitável (g)	15	1.12	0.01	2.03	0.63	55.99

A parte do fruto mais pesada é a casca (44% em média), seguida da polpa (35%), sementes (19%) e a placenta (2%) (tabela 1 e figura 2). O peso do fruto e da casca são fatores variáveis entre matrizes, mas a porcentagem de casca tem alguma variação (43,9% para a matriz 1; 43,5% para a 2 e 49,3% para a 3) (figura 5) indicando que há possibilidades para a seleção genética de matrizes com frutos mais pesados e menor proporção de casca. No Brasil e Amazônia Peruana o *T. bicolor* é uma espécie geralmente encontrada em agrupamentos indígenas e de caboclos, geralmente árvores vigorosas que produzem frutos muito maiores que os descritos botanicamente para a espécie, indicando a existência de seleção ou mesmo domesticação. Esta espécie provavelmente já teve uso mais extensivo, hoje

negligenciado. Como as variedades domesticadas tendem a voltar ao seu estado primitivo se cessar a pressão de seleção feita pelo homem (Harlan, 1975), o *T. bicolor*, permanecendo o interesse atual, é uma espécie cuja as variedades nitidamente domesticadas tendem a ser perdidas.

Quanto as sementes secas, estas pesam em média 1,67g com um coeficiente de variação elevado (37,0%) que é mais devido ao peso da parte aproveitável (68% do total) do que ao seu tegumento (32%) (tabela 2 e figura 3).

Avaliando a associação entre variáveis (figura 5 e 6), nota-se o peso do fruto está associado ao seu comprimento ($r= 0.82$) e diâmetro ($r = 0,77$), ou seja ao seu volume. O peso do fruto também está associado ao peso ($r= 0,77$) e número ($r= 0,77$) de sementes normais. Todas estas variáveis praticamente não estão relacionadas ao número de sementes murchas. As sementes murchas não apresentam os cotilédones desenvolvidos, mas somente o peso do seu tegumento que são mantidos quase que constante e em valores similares ao das sementes normais (figura 4). No entanto, maior é o peso unitário da semente, maior a proporção da parte aproveitável (rendimento). Como o número de sementes tende a ser maior nos frutos de maior volume ($r= 0,64$ para comprimento do fruto; $r= 0,80$ para diâmetro do fruto), para efeito de seleção genética para a produção de sementes, conclui-se que devem ser selecionadas plantas que produzam os frutos maiores que por sua vez produziram sementes mais granadas.

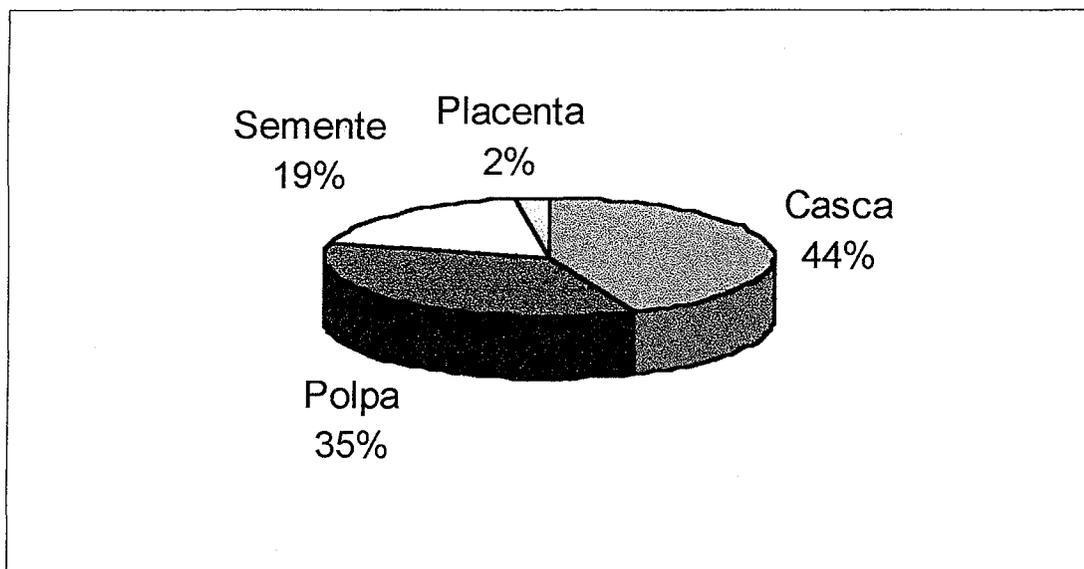


Figura 2: Proporções das partes do fruto de *T. bicolor*

Como visto, a casca é a parte do fruto de maior peso (figura 2) e no momento sem qualquer potencial de uso identificado, logo é um caráter que seria interessante diminuir a sua proporção para evitar o carreamento de energia da planta para uma parte não aproveitável. A porcentagem de casca está negativamente correlacionada a

espessura da casca ($r = -0,60$) e com o peso da polpa ($r = -0,78$) e curiosamente ao número de sementes murchas ($r = -0,51$) (tabela 3). Como o peso da polpa é um caráter associado a vários outros que compõem o tamanho do fruto, conclui-se que além da indicação para a seleção de frutos grandes, sejam preferidos os de casca fina e com baixo número de sementes murchas.

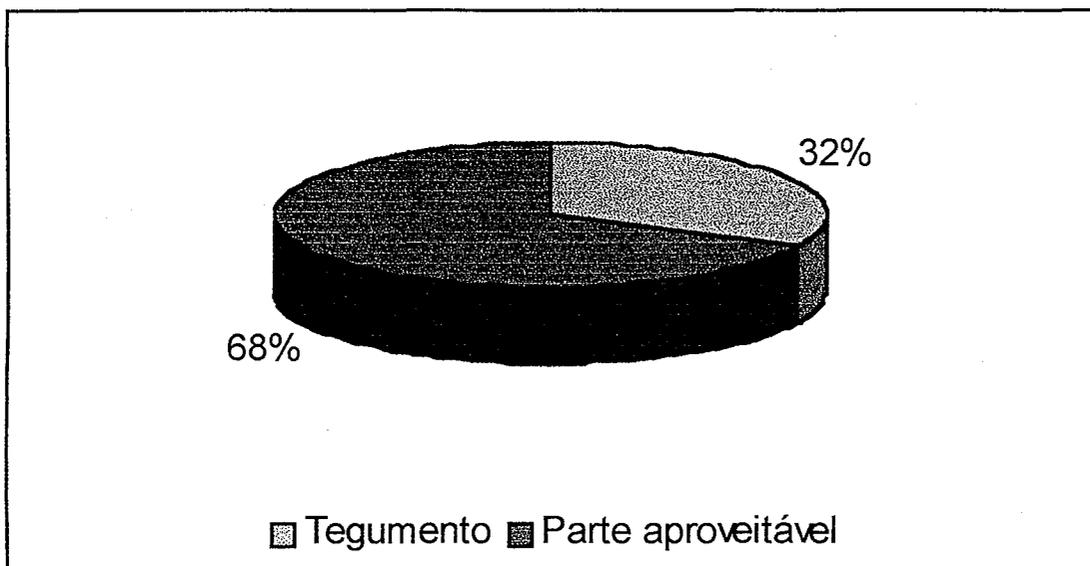


Figura 3: Valores médios da proporção do tegumento e parte aproveitável de sementes secas de *T. bicolor*.

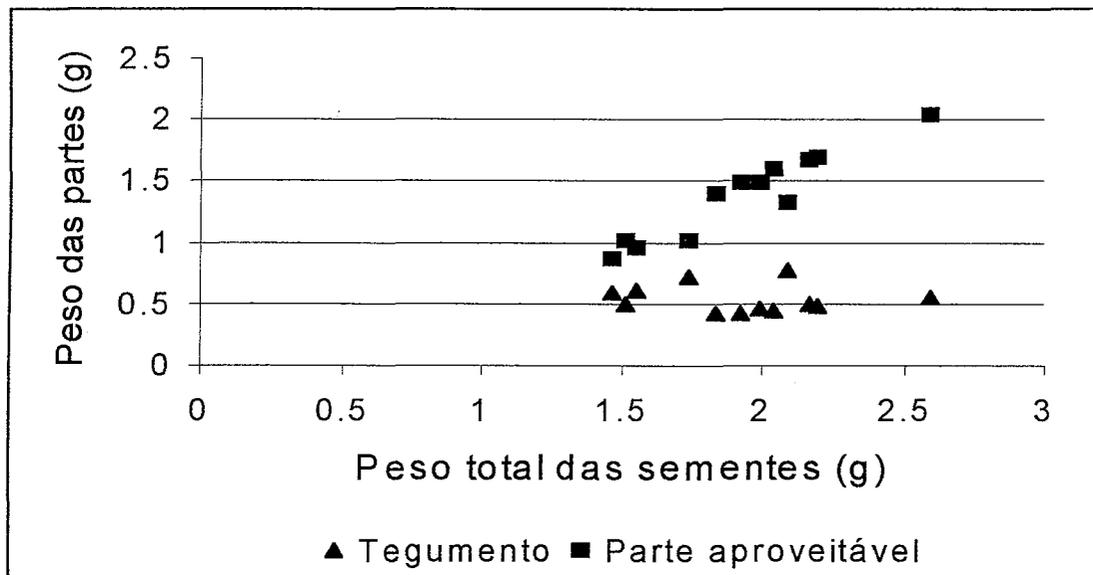


Figura 4: Relação entre o peso total das sementes normais x peso do tegumento e da parte aproveitável de *T. bicolor*.

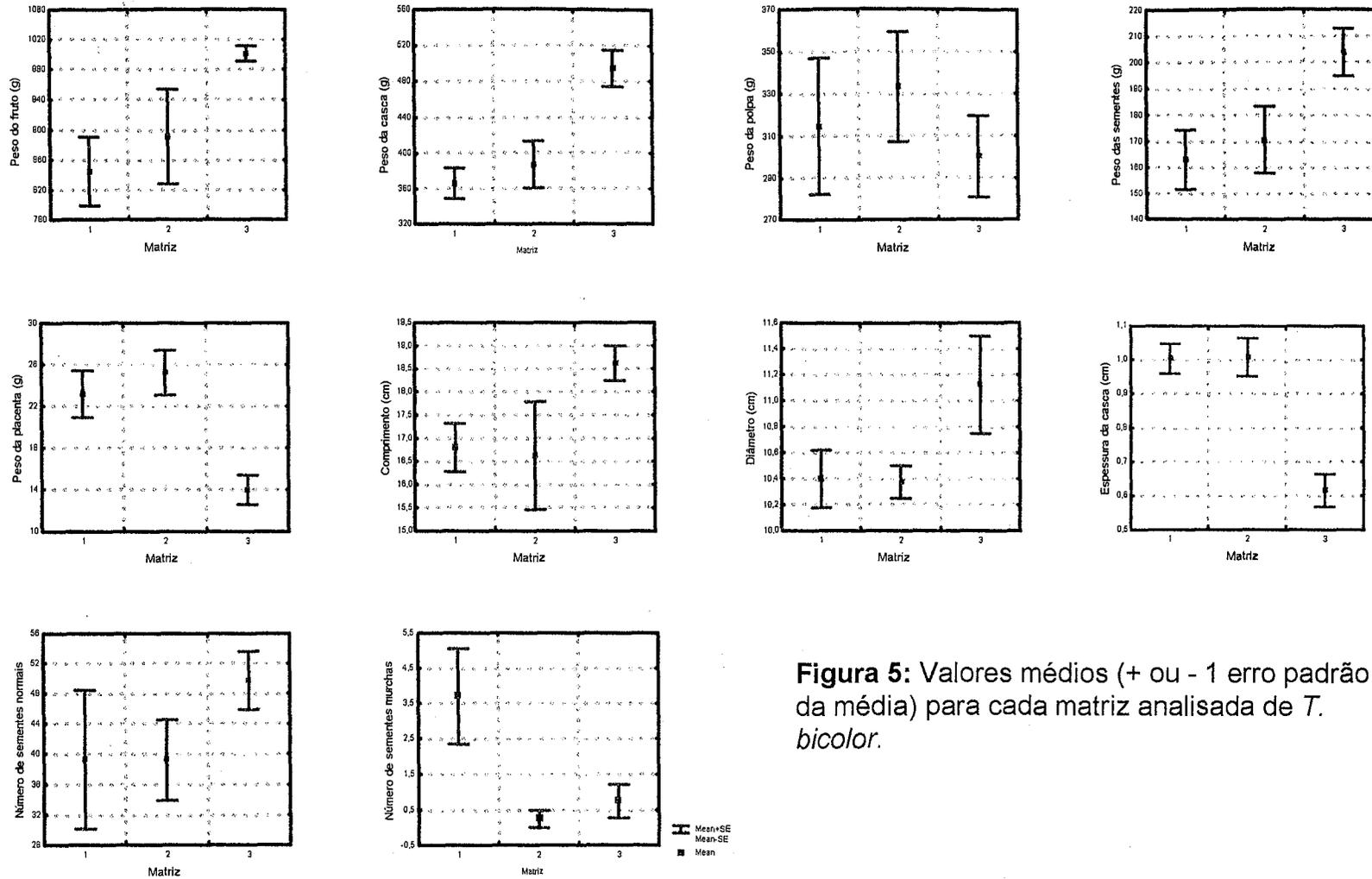


Figura 5: Valores médios (+ ou - 1 erro padrão da média) para cada matriz analisada de *T. bicolor*.

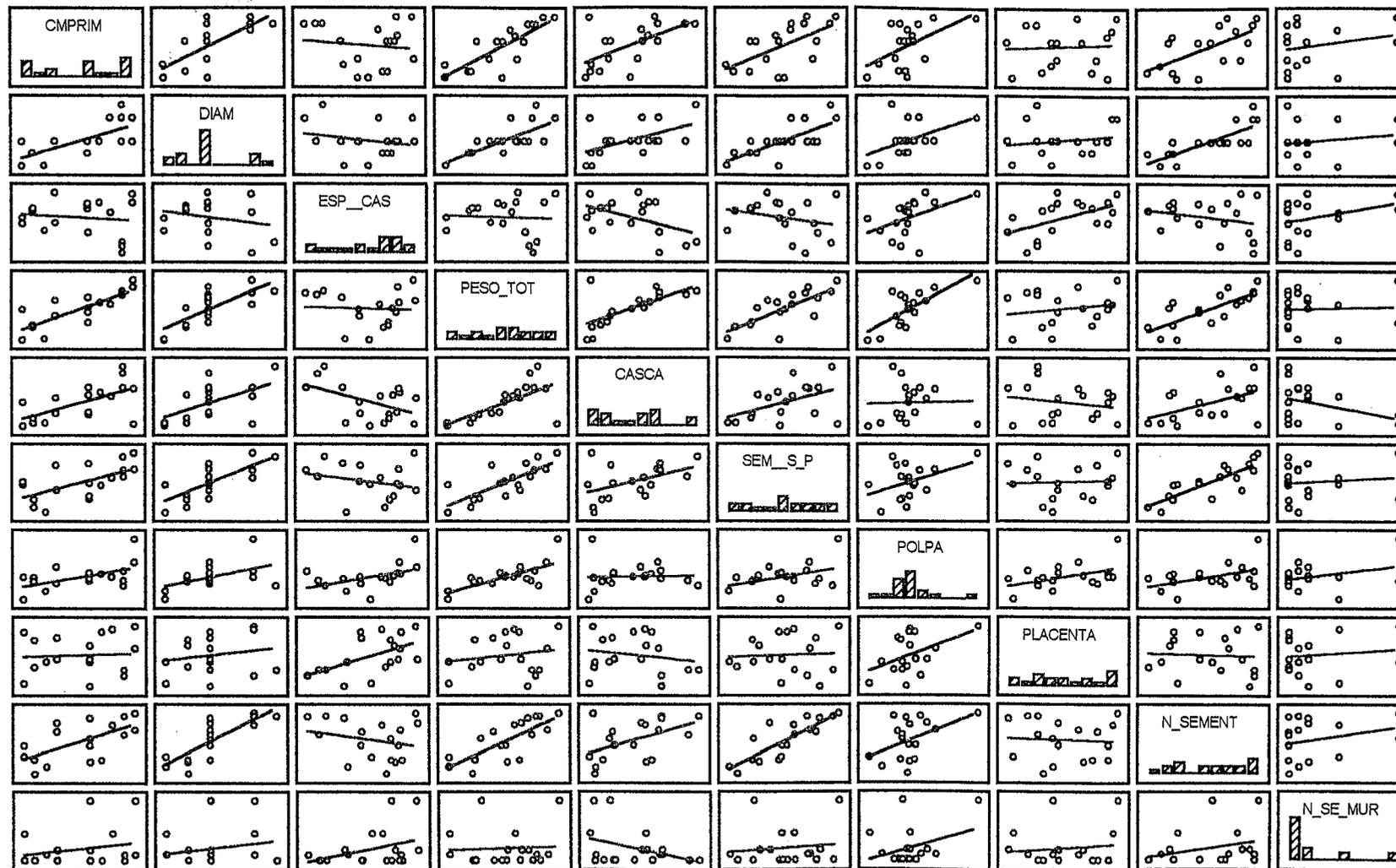


Figura 6: Associação entre todas as caraterísticas tomadas de frutos de *T. bicolor*.

Tabela 3: Correlação entre todas as características tomadas dos frutos de *T. bicolor*. Os valores em negrito são significativos ao nível de 5%.

	<i>Comprimento do fruto (cm)</i>	<i>Diâmetro do fruto (cm)</i>	<i>Espessura da casca (cm)</i>	<i>Peso total (g)</i>	<i>Peso da casca (g)</i>	<i>Peso das sementes (g)</i>	<i>Peso da polpa (g)</i>	<i>Peso da placenta (g)</i>	<i>Num. de sementes normais</i>	<i>Num. de sementes murchas</i>
Comprimento do fruto (cm)	1.00									
Diâmetro do fruto (cm)	0.71	1.00								
Espessura da casca (cm)	-0.12	-0.21	1.00							
Peso total (g)	0.82	0.77	-0.05	1.00						
Peso da casca (g)	0.61	0.54	-0.48	0.68	1.00					
Peso das sementes (g)	0.61	0.73	-0.24	0.77	0.48	1.00				
Peso da polpa (g)	0.55	0.48	0.46	0.73	0.03	0.43	1.00			
Peso da placenta (g)	0.07	0.18	0.53	0.19	-0.18	0.06	0.47	1.00		
Num. de sementes normais	0.64	0.80	-0.23	0.77	0.51	0.83	0.47	-0.05	1.00	
Num. de sementes murchas	0.23	0.19	0.36	0.05	-0.37	0.11	0.36	0.12	0.28	1.00
Casca (%)	-0.09	-0.16	-0.60	-0.23	0.56	-0.23	-0.78	-0.46	-0.19	-0.51

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAVALCANTE, P. B. 1988. *Frutas Comestíveis da Amazônia*. 4ª ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi/Souza Cruz, 279 p.
- CUATRECASAS, J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Conmt. Nat. Herb. (USA)* 35:379-614.
- FAO, 1986. Food and Fruit-bearing Forest Species. 3. Examples from Latin America. Rome: FAO Forestry Paper 44/3.
- HARLAN, J.R. 1975. Crops and man. American Society of Agronomy/Crop. Science Society of Marica. Madison, Wisconsin. 295 p.
- STATSOFT, 1995. Statistica for Windows, Statsoft, Inc., Tulsa, OK (USA).
- VENTURIERI, G.A. 1993. *Cupuaçu: A Espécie, sua Cultura, Usos e Processamento*. Clube do cupu, 118p. Belém PA.
- . 1994. Floral Biology of cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann). PhD Thesis, Univ. of Reading, UK, 211p.
- ; RIBEIRO FILHO, A. A. 1995. A polinização manual no cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willdenow ex Sprengel) Schumann). *Acta Amazônica*, 25 (2/4): 181-192.

BIOMETRIA DE FRUTOS E SEMENTES DE *THEOBROMA OBOVATUM* KLOTZSCH EX BERNOULLI (STERCULIACEAE)¹

Giorgio Cristino Venturieri²
Seidel Ferreira dos Santos³
Giorgini Augusto Venturieri⁴

INTRODUÇÃO

A Amazônia é considerada como um expressivo centro de diversidade genética de fruteiras, superado apenas pelo sudeste asiático. No entanto, a contribuição amazônica para o desenvolvimento da fruticultura comercial no Brasil e no mundo é insignificante, se comparado com as frutíferas do sudeste asiático Clement et al. (2000).

Sete fruteiras nativas da Amazônia são consideradas totalmente domesticadas, o biribá (*Rollinia mucosa*), urucum (*Bixa orellana*), mari ou umari (*Poraqueiba paraensis*), pupunha (*Bactris gaspaes*), guaraná (*Paullinia cupana*), abiu (*Pouteria caimito*), cubiu (*Solanum sessiliflorum*); 20 são consideradas semi-domesticadas e 36 são incipientemente domesticadas (Clement et al. 2000).

Theobroma L., é um gênero tipicamente neotropical abrange cerca de 22 espécies sendo 8 de ocorrência amazônica (Cuatrecasas 1964) dentre as espécies deste gênero destacam-se *T. cacao* (cacau) conhecida internacionalmente por constituir a matéria prima para a fabricação do chocolate, e *T. grandiflorum* (cupuaçu) espécie cultivada que tem tido seu plantio expandido rapidamente na região norte, já alcançando outras regiões do Brasil e países como a Colômbia e Peru (Venturieri, 1993).

O cacau-cabeça-de-urubu (*T. obovatum*) é uma espécie afim ao cacau (*T. cacao*) e ao cupuaçu (*T. grandiflorum*) e por isto, uma possível fonte de genes para estas espécies, que são as de maior importância econômica do gênero. A obtenção de híbridos destas espécies com o cacau-cabeça-de-urubu poderia ser útil para a transferência de genes de uma espécie para outra, como por exemplo para a melhoria da qualidade de gordura das sementes e da arquitetura de copa do cacauzeiro e do cupuaçuzeiro.

A espécie *T. obovatum* Klotzsch ex Bernoulli é conhecido vulgarmente como "cacau-cabeça-de-urubu", possuindo outras denominações como: "copu-ai", "cupu-curúa", "cupurana", "cacau-de-macaco", "urubú-acain" e "cabeça-de-umbú". É uma espécie que atinge até 15m de altura, possui copa larga com ramos delgados (figura 1a); as folhas são ovado-elípticas ou ovado-oblongas, mais ou menos estreitas e muito assimétrica, densamente lanosas-tomentosa quando jovens, glabras quando maduras; as inflorescências muito pequenas, axilares ou extra-axilares; as flores possuem cálice com 5 sépalas ovadas, espessas e semiagudas; corola com 5 pétalas, cada uma com uma expansão laminar e base da pétala em forma de cógula, a qual recobre os estames, formando desta maneira uma barreira física entre o androceu e o gineceu; apresentam 5 estaminódios petalóides intercalados por cinco feixe de estames (figura 1b); o fruto é ovado 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 1c) (Cuatrecasas, 1964; Ducke, 1953). Esta espécie encontra-se

¹ Projeto financiado pelo CNPq/PTU, Processo n. PTU/469915/00-5.

² Pesquisador III Embrapa Amazônia Oriental, Tv. Dr. Enéas Pinheiro s/n, 66.095-100.
giorgio@cpatu.embrapa.br.

³ Pós Graduando em Recursos Genéticos UFSC/CCA.

⁴ Professor Dr. UFSC/CCB, giorgini@ccb.ufsc.br.

freqüentemente distribuída na sub-mata de várzea e de terra firme na metade ocidental da Amazônia. Os pontos mais orientais onde foi encontrada são: em Tefé (Rio Solimões), rio Jaú afluente do Baixo Rio Negro, rio Purus e Baixo Acre e limite do Brasil com Peru e Colômbia (Cuatrecasas, 1964). O cacau-cabeça-de-urubu é consumido geralmente no seu estado natural, sua polpa é adocicada e pouco ácida, com gosto muito similar ao do cacau. Presume-se que as sementes possam ser usadas na indústria chocolateira. Informações sobre a biologia das espécies arbóreas nativas da Amazônia são de extrema importância, ao passo que cresce a demanda por produtos das florestas tropicais, além disso não se dispõe de informações sobre conhecimentos básicos destas espécies e muitos dos princípios biológicos aplicados às florestas temperadas não servem para os trópicos (Crestana & Beltrati, 1988).

Neste sentido, o presente trabalho apresenta observações a respeito da biometria de frutos e sementes de *T. obovatum* (cacau-cabeça-de-urubú) que possam servir para avaliar o seu potencial tecnológico.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho de biometria foi realizado no Laboratório de Botânica e as amostras de frutos e sementes coletadas na coleção de *Theobroma* "George O'Neill Addison", pertencente a Embrapa Amazônia Oriental, em Belém, PA (1° 53'S 48° 46'W) durante os meses de fevereiro e abril de 2002, época chuvosa.

Após a coleta, os frutos maduros foram imediatamente analisados para que não houvesse interferência nos resultados, especialmente aqueles relacionados com o peso fresco e teores de açúcares da polpa. Para a determinação das dimensões (comprimento, largura, espessura dos frutos, sementes e casca) foi utilizado um paquímetro manual e o peso fresco obtido com balança de precisão.

Foram coletados cinco frutos de cinco matrizes diferentes (Q24/598, Q22/550, Q24/609, Q21/526 e Q20/511), totalizando 25 frutos, realizando-se as seguintes medições: a) **fruto**: peso total, peso da casca, comprimento, largura, espessura da casca, número de sementes boas e chochas; b) **sementes**: peso com polpa, peso sem a polpa; dimensões (maior e menor diâmetro de sementes boas escolhidas aleatoriamente); c) **polpa**: graus brix, peso total (polpa com a placenta). A quantidade de polpa foi calculada por diferença entre o peso das sementes com a polpa e placenta, menos o peso das sementes sem a polpa. Foram calculadas as proporções de: casca, polpa mais placenta e de sementes em relação ao peso total do fruto. O grau-brix (que expressa a proporção de açúcares na polpa) foi obtido com o auxílio de um refratômetro com escala de 0 a 50% (Bellingham & Stanley LTD.), as fotografias foram realizadas com máquinas digitais Nikon D1 e Sony DSC-707.

O peso seco foi obtido através da média de 25 sementes, onde as mesmas foram colocadas para secagem em uma estufa (70-80°C), até que atingissem o peso mínimo constante.

Para a descrição da germinação, as sementes foram postas para germinar imediatamente após o despulpamento, dispostas em bandejas plásticas em ambiente aberto, sob condições naturais de o ar, umidade e iluminação indireta em leito composto de terra preta misturada com serragem, na proporção de 2:1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores dos dados biométricos dos frutos, sementes e polpa de *T. obovatum* encontram-se respectivamente nas tabelas 1, 2 e 3.

O tempo médio de emissão da radícula foi de 4 a 5 dias, onde 100% das sementes germinaram. A forma de germinação das sementes é hipógea.

O peso seco constante da semente de *T. obovatum* foi de 0,29 g (N=25).

Tabela 1. Dimensões e peso dos frutos de *Theobroma obovatum* (N=25).

Matrizes	Comprimento (cm)	Diâmetro (cm)	Espessura da casca (cm)	Peso fruto inteiro (g)	Peso da casca (g)	Peso da sem. férteis (g)	Peso das sem. estéreis (g)
Q24/598	3,8	2,7	0,38	11,7	9,2	3,6	-
Q22/550	4,3	2,8	0,38	14,2	10,6	4,6	0,2
Q24/609	4,9	2,7	0,46	15,2	11,9	4,2	-
Q21/526	4,4	3,1	0,42	18,0	13,3	5,2	-
Q20/511	4,3	3,0	0,42	18,4	14,2	4,2	-
Média/ desv.pad.	4,3 (0,35)	2,9 (0,16)	4,1 (0,03)	15,5 (2,49)	11,8 (1,80)	4,4 (0,53)	0,2 (0,0)

Tabela 2. Dimensões e peso das sementes de *Theobroma obovatum* (N=25).

Matrizes	Comprimento (cm)	Maior diâmetro (cm)	Menor diâmetro (cm)	Peso c/ polpa (g)	Peso despulpa da (g)	Proporção de sementes/fruto (%)
Q24/598	1,04	0,59	0,52	2,5	1,4	12,3
Q22/550	1,04	0,59	0,56	3,7	2,0	12,8
Q24/609	1,12	0,62	0,54	3,3	1,8	13,7
Q21/526	1,24	0,60	0,54	4,7	2,5	14,5
Q20/511	1,16	0,61	0,51	4,2	2,1	14,7
Média/ dev.pad.	1,12 (0,08)	0,60 (0,01)	5,3 (0,02)	3,7 (0,75)	2,0 (0,36)	12,7 (0,93)

Tabela 3. Peso e grau brix da polpa de *Theobroma obovatum* (N=25).

Matrizes	Peso da polpa (g)	Grau brix (%)	Proporção de polpa/ fruto (%)
Q24/598	1,1	10,8	8,9
Q22/550	1,7	17,4	9,9
Q24/609	1,4	13,2	10,7
Q21/526	2,2	17,2	11,0
Q20/511	2,1	15,0	10,4
Média/dev.pad.	1,7 (0,41)	14,7 (2,49)	11,0 (0,74)

CONCLUSÕES

No geral, as características estudadas apresentaram baixa variação, dando indícios que o Banco de Gerplasma possui um baixo número de introduções para esta espécie. Na tabela 4 *T. obovatum* é comparado com outras espécies do gênero, nota-se que esta espécie não apresenta nenhuma característica agrônômica importante em seu fruto. Contudo, sua rusticidade quanto a resistência a doença vassoura-de-bruxa (*Cripelis perniciosa*) não pode ser desconsiderada.

Tabela 4. Características biométricas entre diferentes espécies de *Theobroma*.

Espécie	Peso do fruto (g)	% de casca	% de polpa	% de sementes	(%) placenta e resíduos	Referência
<i>T. obovatum</i>	15,5	76,13	11	12,7	-	Presente trabalho adaptado de Pina 2001
<i>T. cacao</i>	500	80	14	4	2	
<i>T. speciosum</i>	187,52	60	12	24	4	Venturieri et al. (não publicado)
<i>T. bicolor</i>	890,2	44	35	19	2	Venturieri et al. (não publicado)
<i>T. grandiflorum</i>	1275	43	38	17	2	Venturieri 1993

AGRADECIMENTOS

Ao Antonio Andrey Silva Matos, Márcio Melo, Vanessa Raiol e Charles Pereira pela ajuda em diferentes etapas deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Clement, C.R. 1992 and the loss of Amazonian crop genetic resources. I. The relation between domestication and human population decline. **Economic Botany**, v. 53, n.2, p.188-202, 1999.
- Crestana, C. R. & Beltrati, C. M. Morfologia e anatomia das sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-caesalpinoidea). **Naturalia**, São Paulo, v. 13, p.45-54, 1988.
- Cuatrecasas, J. 1964. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Connt. Nat. Herb. (USA)** 35:379-614.
- Ducke, A. 1953 As Espécies Brasileiras do Gênero *Theobroma* L **Boletim Técnico do IAN** N° 28, Belém Pará Brasil.
- Pina, M. G. M. 2001. Aproveitamento de Subprodutos e Resíduos do Cacau. In, Silva Neto, P.J. *Sistema de Produção de Cacau para a Amazônia Brasileira*. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC.125 p. Belém, PA.
- Venturieri, G. A. 1993. *Cupuaçu: A Espécie, sua Cultura, Usos e Processamento*. Clube do cupu, 118p. Belém PA.
- Venturieri, G. A., Barbosa, G., Venturieri, G. C. Biometria de frutos de *Theobroma speciosum* (Sterculiaceae). Não publicado.
- Venturieri, G. A., Barbosa, G., Venturieri, G. C. Biometria de frutos de *Theobroma bicolor* (Sterculiaceae). Não publicado.

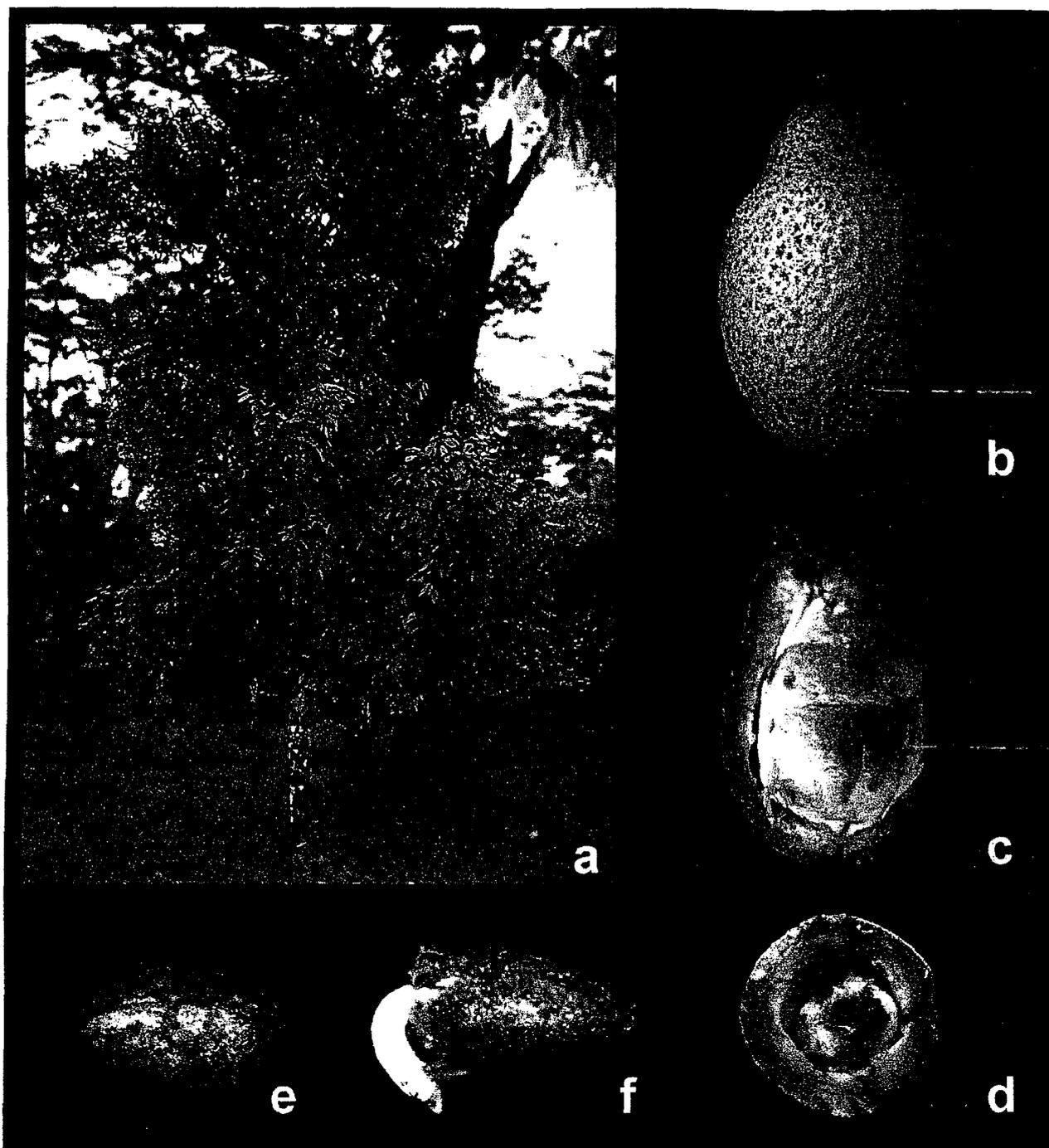


Figura 1. *Theobroma obovatum*, a-árvore adulta, b-fruto, c-fruto em corte longitudinal, d-fruto em corte transversal, e-semente e f-semente com radícula.

NOTAS SOBRE A BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *THEOBROMA OBOVATUM* KLOTZSCH EX BERNOULLI.

Giorgio Cristino Venturieri¹
Marcio Roberto da S. Melo²
Alethéa Fernanda L. Almeida²

Introdução

Na Família Sterculiaceae, o gênero *Theobroma* é considerado o mais importante economicamente, pois é nele que estão presentes o cacau (*T. cacao*) e o cupuaçu (*T. grandiflorum*). *T. obovatum* é uma frutífera arbórea tipicamente tropical, encontrada na parte ocidental das bacias amazônicas brasileira, peruana e colombiana. Este trabalho objetivou descrever diferentes aspectos da biologia reprodutiva de *T. obovatum*, com o intuito de fornecer subsídios a fitotecnistas e melhoristas dedicados a domesticação de frutíferas desta família.

Material e método

As observações foram realizadas de outubro de 2001 a março de 2002 em 5 indivíduos da coleção de *Theobroma* da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. Observações diretas com o auxílio de andaimes e escadas, foram realizadas sobre o comportamento dos visitantes, fenologia e morfologia floral. Foi observado sob microscopia, a presença de pólen nos estigmas. Para a descrição e ilustração da morfologia e do comportamento floral, foi utilizado máquina fotográfica digital.

Resultados e discussão

Apesar de hermafroditas, *T. obovatum* apresenta dois tipos florais, diferenciados pelo peculiar comportamento de suas lígulas, que isolam ou não o gineceu (Figura 1). As flores abrem-se ao amanhecer, por volta das 4h. A primeira fissura do botão ocorre aproximadamente 3h, as sépalas encontram-se totalmente abertas às 6h. A coloração do estilete escurece após o segundo dia da antese, ficando seco e inviável para polinização. A maioria das flores do *T. obovatum* possui lígulas abertas. A abscisão ocorre em média quatro dias após a antese, com maior frequência às 18h. As flores permaneceram abertas durante todo esse período. A coloração da superfície adaxial das sépalas pode variar do rosa claro ao vermelho escuro, dependendo de cada indivíduo.

Em 23 frutos estudados, foi observado um número médio de 5,2 ($\pm 1,41$), mínimo de três e máximo de oito sementes por fruto, sugerindo a necessidade da fecundação de no mínimo de três óvulos para que ocorra o desenvolvimento do fruto.

¹ Pesquisador III, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, giorgio@cpatu.embrapa.br.

² Bolsista PIBIC/CNPq/UFRA/EMBRAPA.

A presença de flores do tipo fechada foi menor do que de flores abertas. Quanto à presença de grão de pólen no estigma, 76,25% do total das flores analisadas continham polens aderidos ao estigma, demonstrando a elevada presença de polinizadores na área onde os indivíduos foram estudados, já que o estigma se encontra isolado das anteras por uma coroa de estaminódios, impedindo a auto-fecundação espontânea (Figura 1).

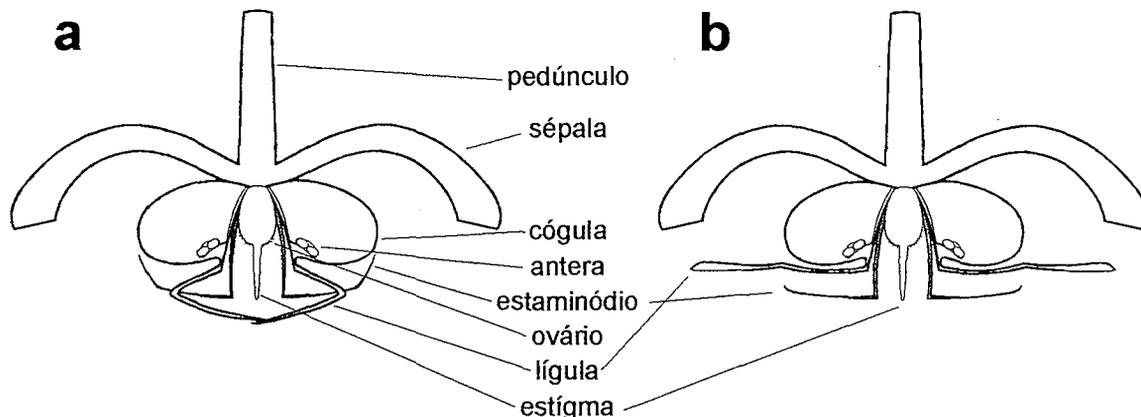


Figura 1. Esquema de dois tipos florais encontrados em *Theobroma obovatum*. **a.** flor com as lígulas fechando-se sobre o estigma e **b.** flor com lígulas abertas, expondo o gineceu.

Comparando-se flores do tipo aberta com flores do tipo fechada, 100% das flores abertas apresentaram grãos de pólen aderidos ao estigma, e apenas 52% das flores fechadas apresentaram grãos de pólen aderidos ao estigma. Quando se comparou o número médio de grãos de pólen presentes no estigma, entre flores abertas e fechadas, a diferença entre os resultados é ainda maior, 28,6 e 6,25, respectivamente. Estes resultados demonstraram a existência de um eficiente mecanismo de isolamento do gineceu, propiciando um maior número de polinizações cruzadas.

A figura 3 ilustra a distribuição, por intervalo de classe, dos grãos de pólen aderidos ao estigma entre os dois tipos florais existentes em *Theobroma obovatum*, estes resultados novamente demonstram a importância deste mecanismo de isolamento, em que uma percentagem alta de flores fechadas não recebeu pólen algum no estigma. Por sua vez, as flores abertas, além de receberem pólen em 100% de seus estigmas, também apresentou um grande número de grãos por estigma.

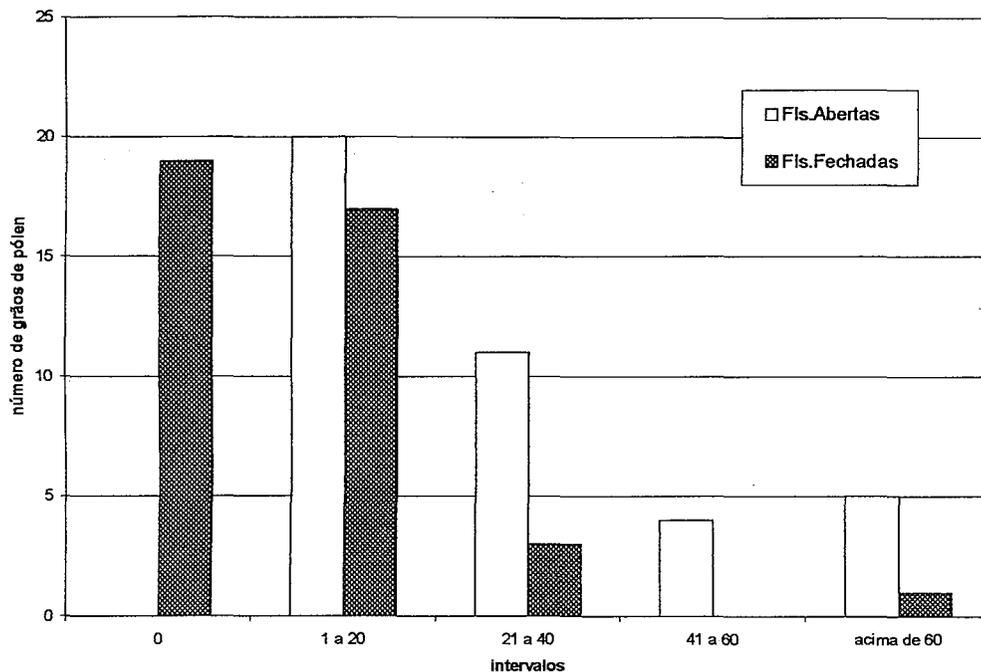


Figura 3. Distribuição, por intervalo de classe, dos grãos de pólen aderidos ao estigma entre os dois tipos florais existentes em *Theobroma obovatum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CUATRECASAS, J. Cacao and its Allies: A Taxonomic Revision of the Genus *Theobroma*. *Contribution from the United States National Herbarium*, 35: 379-614, 1964.

VENTURIERI, G. A. e colaboradores 1998. *Biologia Aplicada à Domesticação de Fruteiras Amazônicas do Gênero Theobroma - Primeiro Relatório*. Relatório Técnico elaborado para o CNPq/Programa de Trópico Úmido - PUT. 105 pg. Datil. Belém, PA. (em inglês e português)

VENTURIERI, G. A. e colaboradores 1999. *Biologia Aplicada à Domesticação de Fruteiras Amazônicas do Gênero Theobroma - Segundo Relatório*. Relatório Técnico elaborado para o CNPq/Programa de Trópico Úmido - PUT. 79 pg. Datil. Belém, PA.

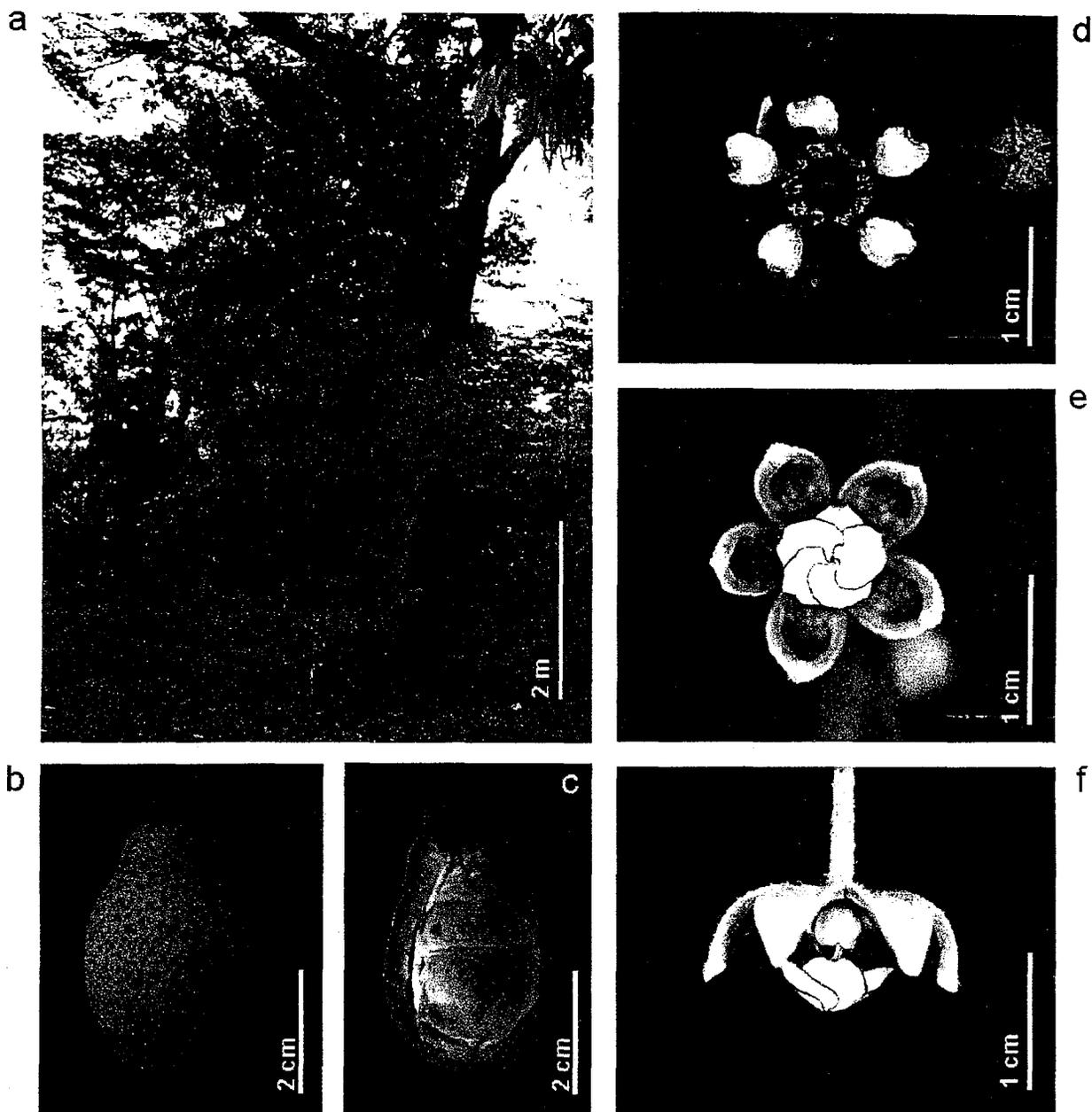


Figura 2. Biologia reprodutiva de *Theobroma obovatum* em Belém, PA. **a.** indivíduo adulto do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental; **b.** fruto maduro, observar rugosidade da casca; **c.** fruto em corte longitudinal, observar o número reduzido de sementes; **d.** flor totalmente aberta; **e.** flor aberta com lígulas fechando-se sobre o gineceu e **f.** perfil de flor com as lígulas fechando-se sobre o gineceu.

POLINIZAÇÃO DE CACAÚ (*Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. - Sterculiaceae): IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO

Alessandra de Azevedo Rodrigues da Silva¹

RESUMO

O cacauí (*Theobroma speciosum*) é uma fruteira típica da Região Norte, cujas flores sapromiofilicas atraem dípteros. Os recursos que os insetos utilizam são muito variados e entre eles estão as flores, as quais podem ser utilizadas como alimento e local para reprodução. Este trabalho visou fazer uma comparação do sistema de polinização de *T. speciosum* em duas áreas de preservação distintas, contribuindo para a avaliação das estratégias de conservação da espécie. O trabalho foi realizado nos anos de 2000 a 2002, no Centro de Pesquisa do Trópico Úmido da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CPATU) e na Estação Científica Ferreira Penna (ECFPn/MPEG). Foram realizados estudos sobre estrutura populacional e fenologia de *T. speciosum* nas duas áreas de preservação, observação comportamental dos insetos no campo, coletas de insetos visitantes das flores de cacauí, análise de carreamento de pólen pelos insetos e verificação dos insetos emergentes no laboratório. As árvores de cacauí, em ambos os locais, florescem em períodos mais secos e frutificam em períodos mais úmidos. As populações de cacauí nas duas áreas diferem pela distribuição espacial e etária dos seus indivíduos. A falta de jovens e subadultos na área de preservação *ex situ*, mostra falha no “turn over” populacional, demonstrando fragilidade no sistema estabelecido. As inflorescências de *T. speciosum* são utilizadas por uma grande diversidade de invertebrados. Nove ordens de insetos, e pelo menos duas ordens de outros invertebrados, visitaram as flores de cacauí. As ordens com maior quantidade de indivíduos foram Hymenoptera, Thysanoptera, Diptera e Coleoptera. Os visitantes das flores de cacauí foram classificados como: oportunistas, predadores e polinizadores. Drosofilídeos foram indicados como polinizadores de *T. speciosum*, com a possibilidade da participação de alguns forídeos. As guildas dos drosofilídeos foram distintas nas duas áreas de preservação e mais diversa na área de preservação *in situ*. Quatro espécies foram comuns as duas áreas. A perda de diversidade e alteração na composição na guilda de polinizadores parece não ter afetado a população de *T. speciosum* na área de preservação *ex situ*. No caso em estudo o sistema de polinização apesar de profundamente alterado, ainda apresenta sinais de viabilidade.

¹ Bolsista do curso de mestrado em zoologia (Museu Paraense Emílio Goeldi/ Universidade Federal do Pará.

ABSTRACT

Cacauhy (*Theobroma speciosum*) is a common tree in Amazonian Brazil whose decaying flowers attract flies. The flies utilize various parts of the plant, including the flowers, which are used for food and as breeding sites. This study is a comparison between the pollination systems of two widely separated populations of *T. speciosum*, each population growing in an area representing a different biodiversity conservation strategy: *ex situ* and *in situ*. Fieldwork took place between 2000 and 2002 in the "Addison O'Neil" germplasm collection of the Brazilian Agroforestry Research Institute's Center for Humid Tropical Research (*ex situ* site) and in the "Emílio Göeldi" Natural History Museum's "Ferreira Penna" Research Station (*in situ* site). This investigation included studies of population structure and phenology of *T. speciosum*, field observations of insect behavior, the collection of flowers and their insect visitors, analyses of pollen load, and the identification of insects collected and those emerging in the lab from collected flowers. Both populations of cacauhy studied flowered during the driest part of the year and produced fruit during the wettest. The lack of juveniles and subadults in the *ex situ* (i.e., cultivated) population indicates zero population turnover and demonstrates the fragility of the system established. The inflorescences of *T. speciosum* are utilized by a wide variety of invertebrates. Individuals from 9 insect orders and at least two other invertebrate orders were observed visiting *T. speciosum* flowers. Most visitors were in the Hymenoptera, Thysanoptera, Diptera, and Coleoptera. The insect visitors were classified as opportunists, predators, and pollinators. Drosophilids were the observed to be the principal pollinators, with the possibility that some phorids also participated in pollination. The drosophilid guilds were different in the two areas and were most diverse in the *in situ* area. Four species were common to both areas. The loss of diversity and alteration in the composition of the guild of pollinators in the *ex situ* area does not seem to have effected the population of *T. speciosum*. Although the pollination system was greatly altered the *ex situ* population of *T. speciosum* still shows signs of viability.

I. INTRODUÇÃO

Dentre as inúmeras definições, pode-se dizer que biodiversidade é a variabilidade morfológica, comportamental, fisiológica e bioquímica dos seres; isto inclui diversidade dentro e entre táxons, as relações com seus ecossistemas e os processos filogenéticos que sofreram (Mallet, 1996). Não existe um consenso entre as muitas estimativas de diversidade de espécies biológicas. Uma dessas, sugere que existam entre 10 a 30 milhões de espécies sobre a terra e que apenas 1.4 milhão foram nomeadas e sumariamente descritas (Wilson, 1994). Segundo Glowka et al (1994) seria preciso pelo menos mais 100 anos de pesquisa para suprir a falta de informação sobre a diversidade biológica, haja visto que as contínuas interferências ocorridas no meio ambiente ao longo do tempo tem diminuído drasticamente esta biodiversidade sem que ela ao menos tenha podido ser devidamente entendida. Diante desta situação, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias de conservação que visem a preservação e o conhecimento dos ecossistemas, contribuindo desta forma para a sobrevivência das diferentes espécies, e garantindo a manutenção das relações intra e interespecíficas presentes nestes ambientes, as quais, em última instância mantêm o equilíbrio do próprio ecossistema.

A conservação de espécies pode ser realizada através de diversas estratégias, dentre elas: preservação *in situ*; preservação *ex situ*; reabilitação e restauração de habitats; administração do uso da terra e estabelecimento de políticas globais e mecanismos financeiros (Jeffries, 1997). Estas estratégias necessitam de um bom envolvimento dos atores sociais e adequado suporte econômico, porque envolvem tecnologias, conhecimento e ações políticas, para a preservação das espécies ou ainda a manutenção de parte ou totalidade do ecossistema intacto, isto representa o não uso, visando prioritariamente a conservação de espécies raras e as de importância ecológica.

A preservação *in situ* significa a manutenção de áreas para assegurar a variabilidade genética e a estrutura populacional das espécies, com isso manter um bom funcionamento dos processos reprodutivos e a manutenção das comunidades e das suas relações competitivas, mutualísticas e simbióticas, disponibilizando amplos recursos indispensáveis à sobrevivência das espécies. O estabelecimento de áreas implica em uma série de dificuldades, entre elas o desenho de estratégias técnico científicas com base em levantamentos bióticos, identificando as espécies raras ou de importância econômica (Jeffries, 1997).

A preservação *ex situ* visa assegurar a sobrevivência de espécies economicamente importantes e/ou em perigo de extinção, propiciando um ambiente similar ao seu original. Esta estratégia compreende a formação de banco de germoplasma e sementes ou construção de parques ecológicos, bioparques ou de zoológicos. Um dos pontos positivos deste tipo de preservação é propiciar a manutenção de uma espécie de valor biológico. O principal aspecto negativo é que a espécie é introduzida em outros ambientes, que pode ser similar mas nunca igual ao seu habitat natural. Com isso, são muitas vezes, introduzir modificações significativas na estrutura populacional e comportamental desses indivíduos, podendo levar prejuízo ao processo reprodutivo (Jeffries, 1997).

A perda da variabilidade genética é um ponto importante a ser considerado em populações manejadas, pois as interferências do meio ambiente podem até ocasionar a extinção da espécie (Soulé, 1986). Normalmente a preservação *ex situ* de espécies vegetais, como por exemplo os bancos de germoplasma, buscam a similaridade com o ambiente natural, porém é muito difícil conseguir reproduzir todas as relações existente no ambiente original, pois a própria estrutura homogênea da plantação é muito diferenciada da natural. Os indivíduos de plantio são menos diversificados geneticamente e mais suscetíveis a doenças ou mudança abióticas. Além disso a maioria das plantações sofre manipulações químicas ou

biológicas que se propõem a cuidar da espécie em questão, mas acabam interferindo na composição dos agentes polinizadores, o que também pode ocasionar a diminuição do sucesso reprodutivo das espécies.

A polinização é a forma de reprodução sexuada dos vegetais superiores. O processo de polinização é iniciado com a transferência dos grãos de pólen até o estigma que, por meio de elementos químicos, fixa os pólenes em suas estruturas. Os grãos de pólen formam os tubos polínicos que servem como passagem dos anterozóides até o ovário, efetivando a fecundação. Mas, para ocorrer a transferência dos grãos de pólen até o ovário são necessários agentes polinizadores que podem ser tanto abióticos (vento e água) como bióticos (principalmente animais). Os angiospermas precisam de agentes polinizadores para aumentar sua variabilidade genética, e ao longo do tempo vem passando por mecanismos de adaptação e co-adaptação que otimizam este processo.

O sistema de polinização constitui um exemplo importante de como se dão as relações interespecíficas entre organismos taxonomicamente diferenciados e como a história evolutiva destas interações, pode ser afetada pela alteração do habitat e por outras formas de intervenção humana. Tais ações diminuem a biodiversidade e são determinantes nas mudanças na composição de espécies (Tabarelli, 1999).

As modificações ambientais produzem mudanças abióticas que, por sua vez, interferem diretamente nas populações dos polinizadores e conseqüentemente, no próprio sistema de polinização. Como é o caso das abelhas da subfamília Euglossinae, onde pequenas alterações ambientais diminuíram consideravelmente sua população interferindo desta forma no processo da polinização de *Dianthus deltoides* (Caryophyllaceae) (Didham et al, 1996).

Para melhor estimar o efeito das perturbações antrópicas sobre o sistema de polinização, é necessário compreender o funcionamento de cada um desses sistemas e as intrincadas relações neles envolvidas em seu ambiente natural. Isso dificilmente é feito já que a maioria dos trabalhos de polinização são realizados em áreas de plantio (Posnette, 1944; Souza & Venturieri, 1998).

A polinização envolve várias adaptações na estrutura floral que tornam o processo viável. Os vegetais ao longo da sua evolução formaram estruturas especializadas para auxiliar o transporte do pólen até o estigma. As flores polinizadas pelo vento apresentam estruturas que permitem a melhor exposição das anteras nas flores, para facilitar o transporte dos grãos de pólen. Outras flores que são polinizadas por animais apresentam estruturas especializadas para atrair seus polinizadores, esses mecanismos de atração podem ser expressos através do odor, cor e/ou forma floral. Algumas espécies de orquídeas possuem flores com estruturas que permitem o contato dos beija-flores com as anteras, assim quando estes pássaros visitam outras flores deixam nelas os grãos de pólen (Raven, 1978).

Os baobás (*Adansonia* spp. - Bombacaceae) dependendo da estrutura floral, fenologia e produção de néctar, são polinizados por morcegos frugívoros, lêmures e falcões, que ao se alimentarem dos recursos florais ficam com seu aparato bucal coberto de grãos de pólen, facilitando o transporte dos mesmos até outra flor (Baum, 1995).

Os insetos são atraídos por diferentes tipos de recursos “oferecidos” pelas plantas e são ou podem ser recompensados com alimento e também por abrigo para a prole, já que em alguns casos as fêmeas podem depositar ovos no interior das flores (Lachaise, 1982). Os besouros são atraídos às flores pela sua fragrância, visto que não apresentam boa percepção visual; as abelhas por sua vez são atraídas pela fragrância adocicada e pelo colorido das flores.

As moscas são, entre os insetos, o segundo grupo de polinizadores mais importantes em termos de eficiência e esta interação parece ser bastante antiga (Lloyd & Wells, 1992 apud Endress, 1994). As flores miofilicas, aquelas associadas especificamente com dípteros

(moscas), podem ser subdivididas em dois grupos: as sapromiofilicas (que imitam material em decomposição) e as micofilicas (que imitam fungos). As flores miofilicas são visitadas entre outras por moscas das famílias Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae e Drosophilidae (Endress, 1994). Para as moscas saprófitas os fatores de atração são as características semelhantes a seu substrato de alimentação e oviposição. Estas flores são mais comumente representadas dentro de certos grupos de plantas, como por exemplo, *Aristolochia*, algumas Araceae, Orchidaceae e Sterculiaceae (Endress, 1994).

Na família Drosophilidae, existem espécies oportunistas que podem utilizar o recurso flor como substrato de oviposição, mas também são conhecidas espécies antofilicas (são atraídas por flores ou se alimentam delas) que são representadas nos gêneros *Drosophila* (grupo bromeliae, flavopilosa e onychophora e subgênero Phoridosa), *Clastopteromyia*, *Laccodrosophila*, *Scaptomyza* (Subgênero *Exalloscaphomyza*), *Zaprionus*, *Zaprionus*, *Zaprionus* e *Zygothrica* (Okada, 1975). Brncic (1983) indica 140 espécies de *Drosophila* que utilizam as flores como sítio de criação sendo que algumas destas utilizam obrigatoriamente este recurso. O grupo flavopilosa, onde todas as espécies são florífagas, foi considerado por Brncic (1983) como sendo ecologicamente restrito e provavelmente sua distribuição está relacionada com a das plantas hospedeiras.

As moscas da família Drosophilidae foram indicadas como polinizadoras da espécie *Aristolochia maxima* da família Aristolochiaceae. *Drosophila* spp. são primeiramente atraídas pelo odor, assim que as flores se abrem, e acabam ficando presas dentro das flores até o outro dia, quando acontece a deiscência das anteras e abertura das flores, liberando as moscas completamente cheias de pólen pelo corpo. Os polinizadores de *Aristolochia* são classificados como sendo do grupo saprófago, e portanto não utilizam néctar nem pólen, caracterizando um sistema de polinização do tipo enganador, que a planta simula odor característico do substrato de oviposição (Sakai, 2002).

As flores da família Sterculiaceae têm especializações estruturais propícias à penetração de pequenos insetos (Young, 1984). Estas flores contém pétalas modificadas, em cógulas e lígulas, e estaminódios que protegem as estruturas reprodutivas formando uma armadilha para os possíveis polinizadores, que ao entrarem na cógula ficam com seus corpos cobertos de grãos de pólen, evidenciando que estas flores envolvem um mecanismo de polinização mediado por insetos (Young et al, 1984). Essas pétalas modificadas apresentam o odor mais acentuado, variando padrões acredoce (Souza & Venturieri, 1998). Tais padrões são facilmente evidenciados nas espécies de Sterculiaceae do gênero *Theobroma*.

Em *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), pequenos himenópteros, como *Plebeia minima* e *Trigonisca pediculana* foram indicados como polinizadores (Venturieri 1994) e Venturieri (1997) identificou besouros da subfamília Eumolpinae como polinizadores desta espécie. Posnette (1944) indicou pequenos dípteros da família Ceratopogonidae como polinizadores efetivos de *Theobroma cacao* (cacau) em plantações de cacau em Trinidad. Mas em plantações próximos de Cameroon, em Yaoundé foram encontrados muitos drosofilídeos com grãos de pólen de cacau pelo corpo como: *Drosophila bocqueti*; *D. colendo*; *D. lambi*; *Zaprionus armatus*; *Z. ghesquierei*; e *Z. tuberculatus* que foram considerados eficientes no processo de polinização devido a estrutura morfológica que favoreceu o transporte de grande quantidade de grãos de pólen, além de permanecerem por um bom tempo nas plantações. Estes drosofilídeos foram comparados com outros insetos que carregavam pólen e apresentaram mais grãos de pólen no corpo do que os outros insetos (Massaux et al 1976 apud Lachaise & Tsacas, 1983).

Em estudo da proporção de frutos com a visitação de drosofilídeos, ceratopogonídeos e formigas em Cameroon, foram identificados dois drosofilídeos (*Scaptodrosophila* sp. e

Drosophila triangulifer) responsáveis por 43% da fertilização do cacau (De Miré 1971 apud Lachaise & Tsacas, 1983).

Theobroma speciosum (cacaú) possui síndrome floral adequada à polinização por dípteros saprófagos. Sua síndrome floral é bastante semelhante a *Herrania mariae*, gênero próximo de *Theobroma*, que é polinizado por forídeos (Venturieri & Silva, 1995). A *Herrania purpura*, *H. nitida* e *H. albiflora* também são polinizadas por forídeos (*Megaselia* sp. e *Dorniphora* sp.) que visitam estas flores na madrugada e à noite quando as mesmas estão receptivas, com odor acentuado e grande produção de exsudato (Young, 1984).

Nos trabalhos de Ohana et al (1998) moscas da família Drosophilidae foram encontradas sobrevoando as inflorescências de *T. speciosum* num comportamento ritualístico de sempre pousar nas lígulas, penetrar na cógula, sobrevoar e penetrar no estigma. Essas flores emitem odor muito forte, semelhante a limão, que foi considerado como um atrativo para as drosófilas, já que as espécies identificadas neste estudo, como atraídas às flores são conhecidas por utilizarem frutos em decomposição como substrato de alimentação e oviposição. Também Souza & Venturieri (1998) encontraram drosófilas visitando flores de cacaú da coleção de "Addison O'Neil" da EMBRAPA/CPATU-PA e "Basil Bartle" da CEPLAC/PA. Ambos os trabalhos foram realizados em áreas de plantio.

Este trabalho tem como objetivo caracterizar e comparar o sistema de polinização de *T. speciosum* em duas áreas de preservação distintas, contribuindo para a avaliação das estratégias de conservação. São objetivos específicos:

- Caracterizar a estrutura populacional de *T. speciosum* nas duas áreas de preservação;
- Estabelecer o padrão fenológico das populações de *T. speciosum* na área de plantio e de ocorrência natural;
- Identificar e caracterizar a guilda de insetos visitantes;
- Identificar os agentes polinizadores de *T. speciosum*;
- Estabelecer a forma de uso dos recursos florais pelos polinizadores;
- Comparar a guilda de polinizadores e o sistema de polinização nas áreas de preservação *in situ* e *ex situ*.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1- Áreas de estudo:

Os trabalhos foram realizados no Centro de Pesquisa do Trópico Úmido da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CPATU), município de Belém-PA, e na Floresta Nacional de Caxiuanã, Estação Científica Ferreira Penna (ECFPn) do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Caxiuanã, município de Melgaço-PA (Figura 1).

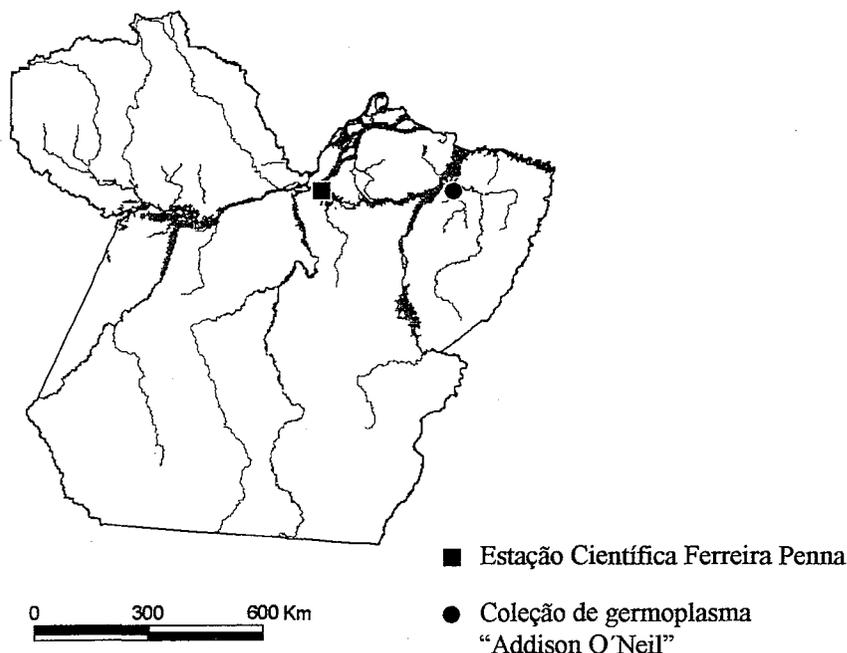


Figura 1: Mapa do estado do Pará, indicando a localização da Coleção de germoplasma "Addison O'Neil", município de Belém; e da Estação Científica Ferreira Penna, município de Melgaço, Pará, Brasil.

a) Área de preservação ex-situ

A área de pesquisa da EMBRAPA/CPATU, localizada na área urbana da cidade de Belém, Pará, abriga a coleção de germoplasma "Addison O'Neil" (CGAON) destinada a preservação *ex situ* de espécies amazônicas do gênero *Theobroma*, implantadas desde de 1945 (Addison & Tavares, 1951).

Os indivíduos desta coleção estão em área de terra firme, distribuídos em três parcelas, uma de aproximadamente 2 hectares e outras duas somando 1 hectare. A parcela de 2 hectares (107 x 162 m), é uma área onde os indivíduos de *Theobroma* foram enfileirados a cada 4 metros, com o espaçamento de 3 metros entre os indivíduos de cada fileira. Estas árvores foram entremeadas por outras espécies de grande porte. A manutenção frequente da área de plantio, com corte do sub-bosque, é feita apenas nesta parcela. As duas outras parcelas menores, adjacente a esta área, estão abandonadas há pelo menos 10 anos e apresentam características de capoeira. Para efeito deste trabalho somente esta parcela de 2 hectares foi considerada.

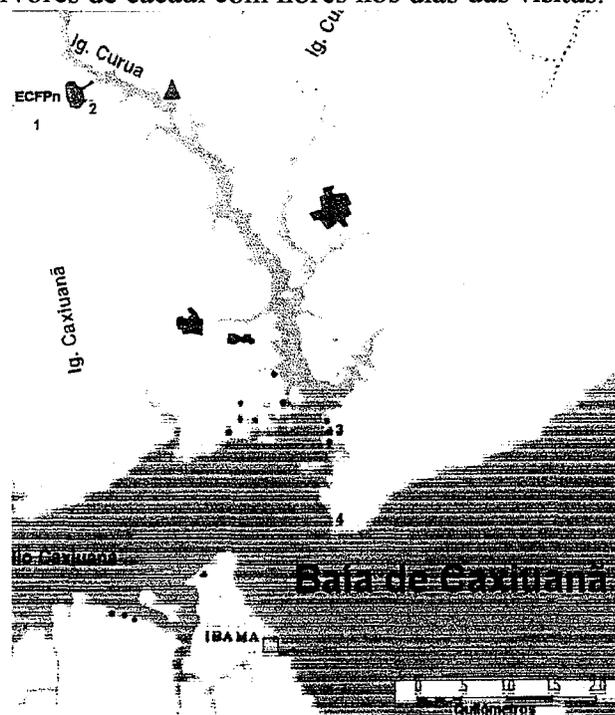
A coleção de *Theobroma* na parcela estudada contém 1162 indivíduos de 7 espécies amazônicas do gênero que são: *Theobroma grandiflorum*, *T. speciosum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. bicolor*, *T. sylvestre* e *T. spruceanum*. Cinco híbridos: *T. grandiflorum* x *T.*

obovatum; *T. grandiflorum* x *T. subincanum*; *T. obovatum* x *T. subincanum*; *T. speciosum* x *T. sylvestre* cf. *poliplóide* e *T. speciosum* x *T. sylvestre*. Cento e cinquenta e nove indivíduos de *T. speciosum*, espécie objeto deste trabalho, estão distribuídos homogeneamente em 4 fileiras seqüenciais, exceto por uma fileira que está a 40 metros de distância das demais com 45 indivíduos e por 2 indivíduos dispersos na área. Quase todos os indivíduos estão sob sombreamento. Uma pequena parte está localizada próxima a uma área aberta e sob influência de sol direto e com grande circulação de vento.

b) Área de preservação *in situ*

A ECFPn/MPEG (Caxiuanã) é uma unidade de preservação permanente de 33.000 ha, inserida na Floresta Nacional de Caxiuanã com área total de 330.000 ha, e é destinada exclusivamente à pesquisa científica. A fitofisionomia predominante é de floresta densa de terra firme que ocupa 85 % da área (Lisboa, 1999). De um modo geral a vegetação encontra-se em estado primário de conservação, constituindo uma área de preservação *in situ* para as diversas espécies ali presentes, e entre elas *T. speciosum*. Segundo Almeida et al (1993) a densidade populacional de *T. speciosum* nas florestas de Caxiuanã é baixa, apresentando em 4 ha estudados, apenas 8 indivíduos com DAP igual ou superior a 10 cm.

Os indivíduos utilizados neste estudo encontram-se localizados em quatro pontos distintos da Estação científica (Figura 2): Ponto 1- na mata de terra firme da ECFPn/MPEG, trilha adjacente a entrada da parcela principal; Ponto 2- em terra firme, na área das instalações da base física da ECFPn/MPEG; Ponto 3- em área de mata secundária, nas proximidades das casas dos ribeirinhos denominada “caiçara”; e Ponto 4- em área de várzea, na mata do “caiçara” às margens do Rio Caxiuanã. A utilização dos diferentes pontos variou conforme a presença de árvores de cacauí com flores nos dias das visitas.



■ Área utilizada para agricultura (roça) ● Residência dos ribeirinhos ▲ Heliporto

Figura 2: localização dos pontos utilizados na Estação Científica Ferreira Penna, Caxiuanã, Município de Melgaço, Pará. Ponto 1: Trilha adjacente a central; Ponto 2: área das instalações da base física da ECFPn; Ponto 3: Caiçara, próximo a casa dos ribeirinhos e ponto 4: Mata do caiçara.

2- Caracterização das populações de cacauí nas duas áreas estudadas:

a) Estrutura populacional de cacauí:

A análise populacional de cacauí, foi realizada com base no estudo de todos os indivíduos presentes em uma parcela de 4 hectares, definida por sorteio entre os 32 ha utilizados para o estudo de DAP e altura das árvores de cacauí, no ponto 1 da ECFPn. Na CGAON foram considerados todos os indivíduos presentes na parcela 2, de 2 hectares, citada no item 1a. Os parâmetros analisados foram: distribuição espacial e frequência das classes de tamanho. Todas as plantas de *T. speciosum* presentes nas áreas delimitadas para o estudo foram marcadas, numeradas e tomadas medidas do DAP e altura.

b) Estudos Fenológicos:

Na CGAON foram definidas dez árvores por sorteio e na ECFPn foram utilizados dez indivíduos disponíveis nas áreas de melhor acesso (Três indivíduos no ponto 1; três indivíduos no ponto 2; dois no ponto 3 e dois no ponto 4).

O acompanhamento fenológico implicou na análise de todas as fenofases (foliação, floração e frutificação) dos indivíduos. As observações foram realizadas nas duas áreas a cada 15 dias durante 12 meses consecutivos. Para a avaliação de frequência das categorias fenofásicas, foram atribuídas notas de 0 a 3, como se segue: 0- nenhuma frequência nesta categoria; 1- < 30% nesta categoria; 2- $30\% \leq e \leq 60\%$ nesta categoria; e 3- > 60% nesta categoria.

A mudança na foliação, foi considerada efetiva quando obteve-se moda das notas acima de 2. Para floração e frutificação foi considerada a moda das notas acima de 1.

3- Caracterização da guilda de visitantes das flores de cacauí:

a) Identificação e acompanhamento dos visitantes das flores de cacauí e seu período de atividade:

Na CGAON as observações dos visitantes foram realizadas no ano de 2001, nos meses de maior produção floral (julho, agosto e setembro). Em 2002 a coleta restringiu-se aos horários de maior receptividade das flores de cacauí, apenas para coleta de espécimes de Drosophilidae e Phoridae.

As inflorescências utilizadas para observação dos animais visitantes foram àquelas inseridas no caule até 2 m de altura do solo (*T. speciosum* é uma árvore que apresenta cauliflora). Foram utilizadas três árvores por visita, sorteadas e acompanhadas a cada ¼ de hora, ao longo de 24 horas, com 10 minutos de observação em cada planta.

Na ECFPn estas observações ocorreram no ano de 2000 (dezembro), 2001 (dezembro) e 2002 (julho). Não foi possível encontrar muitas árvores de cacauí com flores em todas as visitas a ECFPn, mesmo que estas visitas tenham sido realizadas mensalmente. No ano de 2000 foi possível utilizar duas árvores que apresentaram inflorescências no dia da visita, com o mesmo procedimento acima citado. Em 2001 e 2002, utilizou-se apenas uma árvore por visita que apresentou inserção de flores acima de 2 metros do solo, para esta observação foi necessário o auxílio de uma escada de 6 metros.

O comportamento de todos os invertebrados encontrados visitando as flores de cacauí, durante o período de observação, foram descritos e posteriormente classificados. Os insetos que apresentaram comportamento indicativo de polinizadores foram coletados com auxílio de aspirador manual, cuidadosamente montados e identificados em nível de espécie. Alguns indivíduos que apresentaram grãos de pólen fixados em seu corpo foram observados sob microscopia de varredura para a identificação destes grãos. Os demais insetos que não

apresentaram padrões de comportamento de polinizadores foram coletados em separado com o mesmo procedimento, montados e identificados.

Todos os animais foram depositados nas coleções de invertebrados do Museu Paraense Emílio Goeldi. A identificação foi realizada com auxílio de bibliografia, comparação com espécimes de coleções e, quando foi o caso, por especialistas. Todos os invertebrados foram identificados em nível de família e naquelas famílias de interesse, em espécie ou morfoespécie.

b) Uso dos recursos florais de cacauí:

b.1) Identificação dos insetos presentes nas flores:

Foram utilizadas 3729 flores de cacauí para verificação dos insetos presentes na ECFPn no ano de, 2001 (dezembro) e 2002 (julho). Na CGAON foram verificadas 13946 flores de cacauí, coletadas no ano de 2000 (setembro), 2001 (junho, julho e agosto) e 2002 (junho e julho). Todos os insetos presentes nestas flores foram retirados, identificados e colocados em tubos contendo álcool a 70%.

b.2) Acompanhamento da emergência dos insetos adultos em flores de cacauí:

Vinte mil quatrocentos e oitenta flores de cacauí foram utilizadas para verificação da emergência dos insetos, destas 16574 eram flores vivas e 3906 flores em decomposição. O total de 2217 flores vivas e 1512 flores em decomposição foram provenientes da ECFPn; e 14357 flores vivas e 2394 flores em decomposição da CGAON.

Estas flores foram colocadas em recipientes plásticos de 300 ml, preparados com areia estéril no fundo e tampados com tecido organza (Figura 3). Estes recipientes foram acondicionados no laboratório de criação do MPEG, a uma temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h: 12 h, acompanhados e umedecidos diariamente durante 45 dias.

Todos os dias os insetos emergentes de cada recipiente, foram retirados com auxílio de um aspirador manual, datados, identificados e colocados em tubos contendo álcool a 70%. O tempo de emergência deste insetos foi calculado a partir do dia da coleta até a data de emergência.



Figura 3: Flores de cacauí colocadas em recipientes plásticos contendo areia esterilizada no fundo e tampados com tecido organza, para verificação da emergência dos insetos adultos.

b.3) Acompanhamento da emergência dos insetos adultos em flores de cacauí separadas por categoria floral:

Do conjunto de flores coletadas na CGAON nos meses de junho (2000, 2001 e 2002), julho (2000 e 2001), agosto (2000 e 2001) e setembro (2000) foram separadas três inflorescências definidas aleatoriamente de três árvores sorteadas por visita. Na ECFPn foram coletadas todas as inflorescências presentes na planta no dia da visita, que aconteceu nos meses de julho (2002) e dezembro (2001).

Estas inflorescências foram levadas para o laboratório e separadas por categoria floral, em: botão, flor nova e flor velha. Utilizou-se neste experimento 16076 e 2337 flores de cacauí, da CGAON e ECFPn, respectivamente. Estas flores foram colocadas em recipientes (o mesmo procedimento do item b2) por categoria floral (botão; flor nova e flor velha). Da CGAON foram coletados 7422 botões; 6560 flores novas; e 2094 flores velhas. Cada recipiente recebeu entre 10 e 50 unidades florais. Na ECFPn foram obtidos 995 botões; 722 flores novas; e 620 flores velhas, o número de unidades florais por recipiente variou de 5 a 50.

4 – Avaliação da diversidade e similaridade entre as guildas de drosofilídeos:

Foi utilizado o índice de Shannon-Weaver (H') para caracterizar a diversidade de drosofilídeos encontrados visitando as flores de cacauí da ECFPn e coleção de germoplasma "Addison O'Neil". Este índice é obtido através da fórmula:

Índice de diversidade de Shannon-Weaver:

Onde, k é o número de categorias (espécies), f_i representa a proporção das observações encontradas na categoria i e n é o número total de indivíduos.

A similaridade dos drosofilídeos foi analisada utilizando o coeficiente de Jaccard que é obtido através da fórmula:

Coeficiente de Jaccard:

$$C_j = j / (a + b - j)$$

Onde j é o número de espécies em comum para as duas localidades, a e b é o total de espécies em cada localidade, respectivamente.

III. RESULTADOS

1- Caracterização das populações de *T. speciosum* nas áreas estudadas:

a) Estrutura populacional de *T. speciosum*:

A distribuição espacial de *T. speciosum* difere nas duas áreas analisadas, na ECFPn observou-se que as árvores de cacauí formam agregados, em 4 ha verificou-se 23 indivíduos bem próximos, numa distância menor que 15 metros entre eles (Figura 4a). A figura 4b representa a distribuição das árvores de cacauí na CGAON, onde as mesmas foram plantadas uniformemente em fileiras de 3 metros de distância entre si, contendo também outras espécies do gênero *Theobroma* que não foram representadas na referida figura, mas que estão em fileiras uniformes inseridas nas parcelas, aqui representadas em branco.

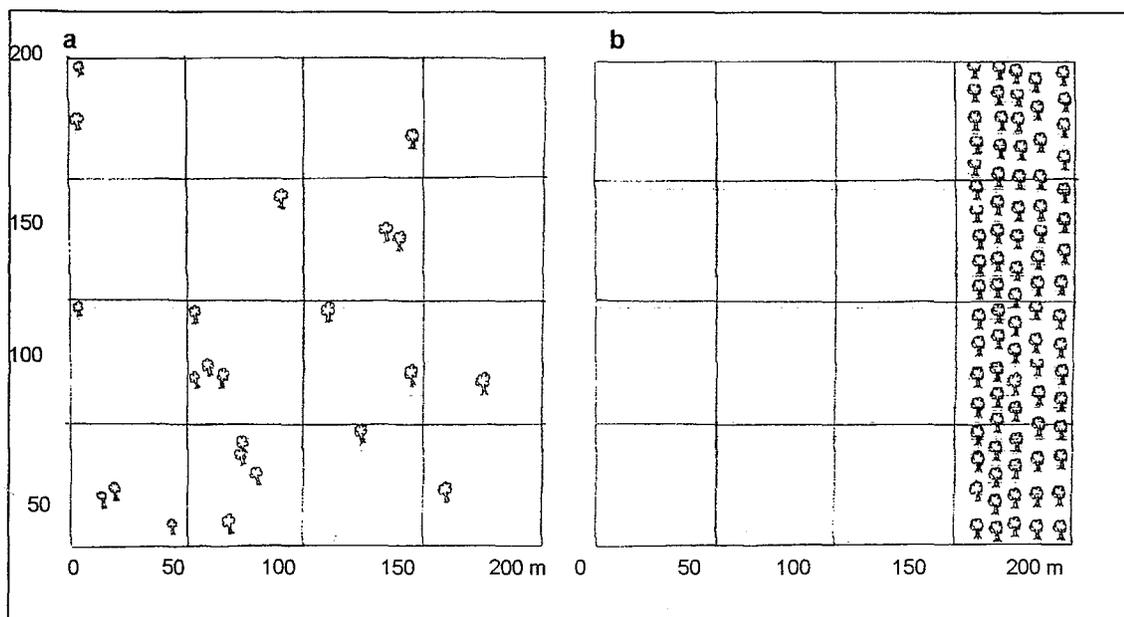


Figura 4: Distribuição espacial das árvores de cacauí (*T. speciosum*). a) Estação Científica Ferreira Penna, Caxiuanã, município de Melgaço, Pará, Brasil; b) Coleção de germoplasma “Addison O’Neil”, Belém, Pará, Brasil.

Foram mensurados 109 indivíduos na ECFPn e 206 na CGAON quanto ao DAP e altura. O DAP variou de 0,63 a 20 cm, com média de $6,35 \pm 0,41$ na ECFPn e na CGAON a média foi de $17,2 \pm 0,26$ cm com variação entre 7,63 cm a 31,51 cm (Figura 5).

A altura das plantas não variou nas duas áreas estudadas. Na ECFPn a média foi de $7,35 \pm 0,43$ e na CGAON a média foi de $7,8 \text{ m} \pm 0,33$ (Figura 6).

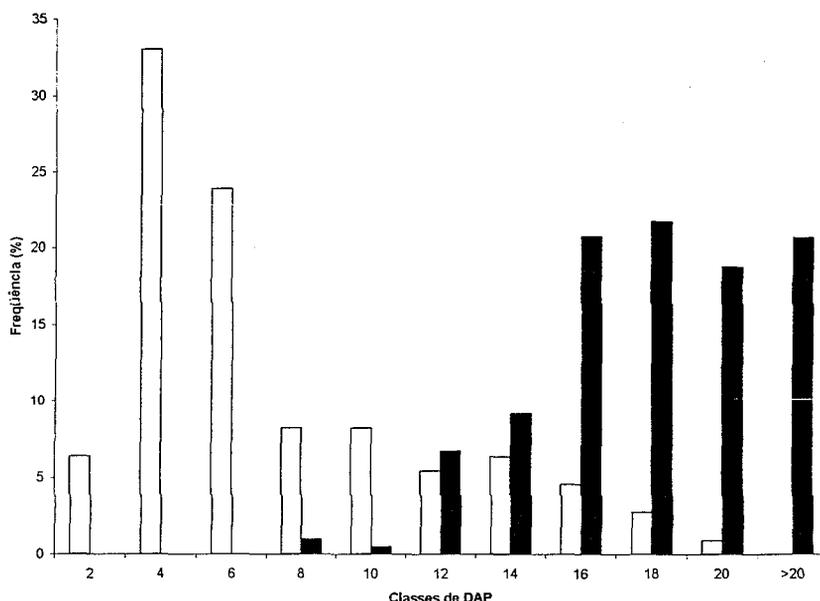


Figura 5: Classes de DAP das árvores de cacauí da Estação Científica Ferreira Penna, Caxiuana, Melgaço-Pa, em barras claras, N=109. E DAP das árvores da coleção de germoplasma “Addison O’Neil”, EMBRAPA/CPATU, Belém-Pa, em barras negras, N=206.

A distribuição etária da população de cacauí foi baseada nos valores de DAP, os valores superiores a 10 cm foi considerado como um indicativo de plantas adultas. Na ECFPn 15% das árvores de cacauí apresentaram valores superiores a 10 cm e na CGAON 99% das plantas.

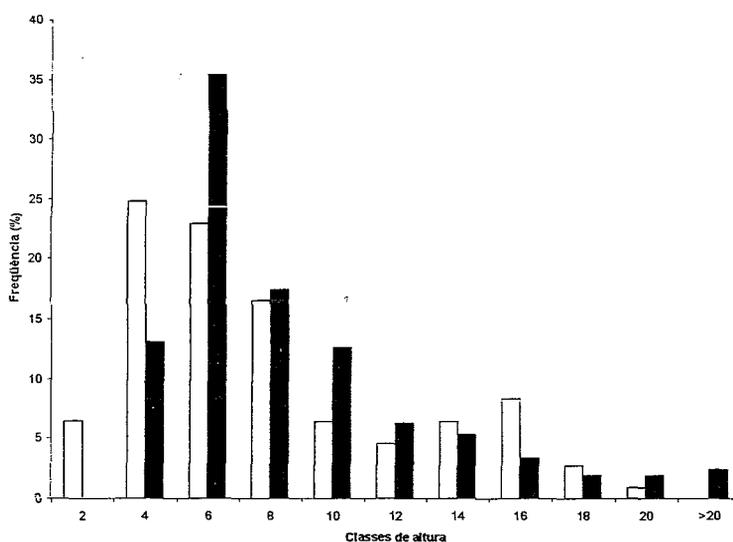


Figura 6: Classes de altura das árvores de cacauí (*T. speciosum*) da Estação Científica Ferreira Penna, Caxiuana, município de Melgaço, Pará, Brasil, em barras claras, N=109. E altura das árvores da coleção de germoplasma “Addison O’Neil”, Belém, Pará, Brasil, em barras negras, N=206.

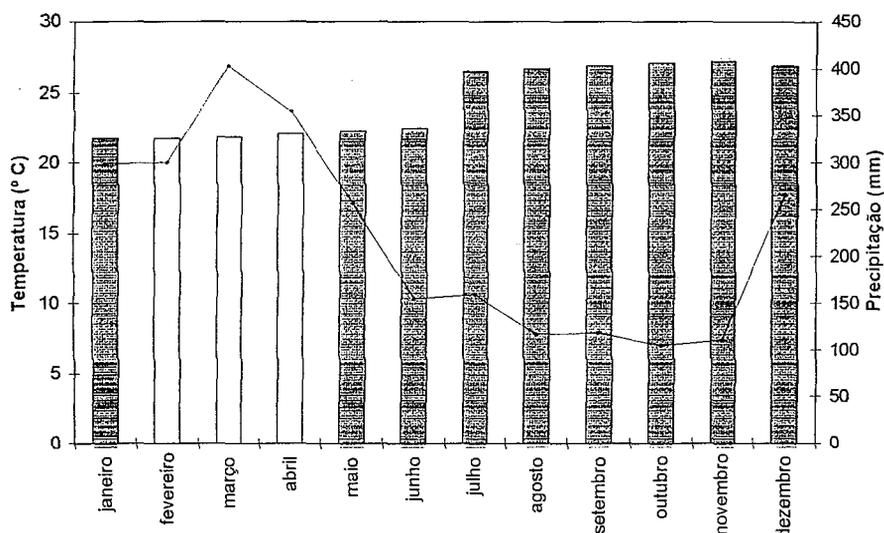
b) Estudos fenológicos:

A tabela 1 mostra o número de árvores observadas com flores, nas duas áreas estudadas, durante os doze meses de observação. Na CGAON o maior número de árvores com flores foi encontrado nos meses de agosto e setembro, coincidindo com os meses de menor precipitação, acima de 100mm, e maior temperatura, 27° C (Figura 7). Na ECFPn o

maior número de árvores com flores ocorreu também nos meses de agosto e setembro que coincidiu com o índice de menor precipitação e maior temperatura (Figura 8).

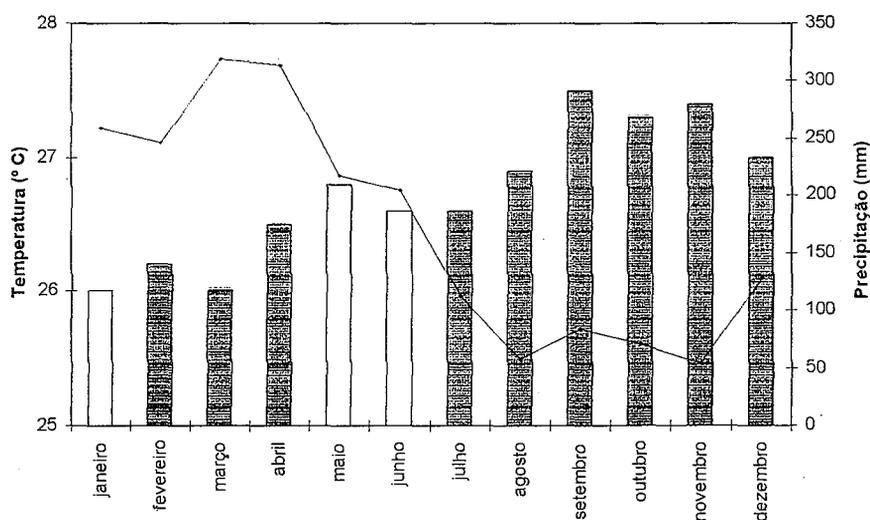
Tabela 1: Número de árvores de cacauí com flores, obtidas em 10 árvores acompanhadas ao longo de um ano de observação, na ECFPn e na CGAON.

	jan.	fev.	mar.	abr.	maio	jun.	jul.	ago.	seT.	ouT.	nov.	dez.
ECFPn	0	2	1	2	0	0	3	7	6	2	1	2
CGAON	2	0	0	0	3	3	6	10	9	7	3	1



Fonte: EMBRAPA/CPATU Meses (1996 - 2001)

Figura 7: Variação média mensal da precipitação (em linha) e da temperatura (em barras) da coleção de germoplasma "Addison O'Neil", EMBRAPA/CPATU, Belém-Pa. Em cinza os meses onde foram observadas flores entre as 10 árvores acompanhadas no estudo fenológico.



Fonte: IEFPA Meses (1996 - 2001)

Figura 8: Variação média mensal da precipitação (linha) e da temperatura (em barras) da Estação Científica Ferreira Penna, Caxiuanã, Melgaço-Pa. Em cinza os meses onde foram observadas flores entre as 10 árvores acompanhadas no estudo fenológico.

Com base na moda 2 das notas atribuídas a cada fenofase, a mudança na foliação das árvores de cacauí observadas na ECFPn, ocorreu nos meses de abril e outubro. Na CGAON nos meses de setembro, outubro e dezembro. A floração ocorreu nos meses de novembro e dezembro na ECFPn e de agosto a outubro na CGAON. Neste último a frutificação foi observada nos meses de fevereiro e novembro. Na ECFPn, nas dez árvores estudadas, não foi detectado qualquer fruto (Tabela 2). Porém observou-se frutos em uma árvore de cacauí que não foi utilizada para acompanhamento fenológico, em novembro de 2002.

Tabela 2: Indicação das fenofases de cacauí, obtidas em 10 árvores acompanhadas, ao longo de um ano de observação, com base na moda das notas atribuídas a cada fenofase. Verde representa as fenofase na ECFPn e em cinza na CGAON.

	Jan.	Fev.	Mar.	Abr.	Mai.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
Foliação				*					#	* #		#
Floração								#	#	#	*	
Frutificação		#									#	

Notas superiores a 2

Coleção de germoplasma "Addison O'Neil"

* Estação Científica Ferreira Penna

2- Caracterização da guilda de visitantes das flores de cacauí:

a) Identificação e acompanhamento dos visitantes das flores de cacauí:

As flores de cacauí foram visitadas por uma grande diversidade de animais invertebrados, predominantemente insetos. Os insetos presentes nas flores de cacauí foram classificadas de acordo com a utilização do recurso em: polinizadores, predadores e oportunistas (Tabela 3). Foi considerado polinizador aquele que buscou recurso alimentar nas flores nos horários de maior receptividade da mesma e que percorreu as partes masculinas e femininas da flor, sempre num mesmo ritual de visita (androceu depois gineceu), como no caso dos drosophilídeos e forídeos. Foi considerado oportunista, os indivíduos que utilizaram outras partes da flor (sépala e pétala) como recurso alimentar. Os predadores foram aqueles que visitaram a flor com o objetivo de consumir outros organismos ali presentes, alguns aracnídeos, coleópteros e himenópteros.

Tabela 3: Classificação do comportamento dos visitantes das flores de cacauí.

Famílias	Comportamento		
	Polinizador	Predador	Oportunista
Phoridae	X		
Drosophilidae	X		
Cecidomyiidae			X
Psychodidae			X
Curculionidae			X
Nitidulidae			X
Staphylinidae		X	
Vespidae		X	X
Apidae			X
Formicidae			X
Thripidae			X
Araneae		X	

A tabela 4 mostra, nos três meses estudados, as classes, ordens e famílias dos indivíduos visitantes das flores de cacauí da CGAON, com base na observação de 12 árvores em quatro visitas a campo, totalizando 96 horas em todo o período estudado. Foram coletados 1084 indivíduos de 19 famílias, a ordem Diptera foi a mais representativa com o maior número de famílias, pelo menos 6 identificadas. Dentre estas as famílias Cecidomyiidae e Drosophilidae foram as mais abundantes. Hymenoptera e Coleoptera foram as ordens subsequentemente representadas por, pelo menos, 3 e 4 famílias identificadas respectivamente. Considerando-se todas as famílias observadas, aquelas representadas com maior número de indivíduos foram: Formicidae e Thripidae.

A tabela 5 representa os invertebrados visitantes das flores de cacauí da ECFPn. Estes dados foram obtidos utilizando duas árvores no ano de 2000, uma árvore em 2001 e uma em 2002, totalizando 41 horas de observação. As ordens mais representativas foram: Hymenoptera e Diptera. Phoridae foi a família mais abundante da ordem Diptera, com 89 indivíduos. Entre os himenópteros a família Formicidae foi a melhor representada, com 102 indivíduos. 38% dos visitantes das flores de cacauí foram da família Vespidae, 24% da família Formicidae e 43% da família Phoridae, nos anos de 2000, 2001 e 2002, respectivamente.

Tabela 4: Número de indivíduos coletados das diferentes classes, ordens e famílias coletados visitando as flores de cacauí (*T. speciosum*) da CGAON, nos meses de julho a setembro de 2001.

Classe	Ordem	Família	julho	Agosto	Setembro	Total
Insecta	Coleoptera		6	10	2	18
		Curculionidae	3	6	1	10
		Escarabeidae		1		1
		Nitidulidae	2	3		5
		Staphylinidae	1			1
		Outros			1	1
	Collembola			2		2
	Dictyoptera	Blattidae		3	1	4
	Diptera		39	53	68	160
		Cecidomyiidae	11	31	33	75
		Ceratopogonidae		2		2
		Drosophilidae	18	8	28	54
		Lauxanidae			1	1
		Micropezidae		1		1
		Phoridae	1	1		2
		Outros	9	10	6	25
	Hemiptera			4	2	6
	Hymenoptera		9	361	292	662
		Apidae		3	2	5
		Formicidae	7	350	284	641
Vespidae			1	4	5	
outros		2	7	2	11	
Lepdoptera			1		1	
Ortoptera	Plasmatidae		2		2	
Thysanoptera	Thripidae	2	77	137	216	
Insecta Total		56	513	502	1071	

Tabela 4: Número de indivíduos coletados das diferentes classes, ordens e famílias coletados visitando as flores de cacauí (*T. speciosum*) da CGAON, nos meses de julho a setembro de 2001 (continuação).

	Araneae		1	4	1	6
		Araneidae			1	1
		Salticidae		1		1
		Thomisidae		1		1
		outros	1	2		3
	Opiliones			4		4
	Chilopoda				1	1
	Diplopoda			1		1
	outros			1		1
Total			1	10	2	13
Total Geral			57	523	504	1084

Tabela 5: Número de indivíduos coletados das diferentes classes, ordens e famílias visitantes das flores de cacauí (*T. speciosum*) da ECFPn, nos meses de julho e dezembro de 2000 a 2002.

Classe	ordem	Família	ano			Total
			2000	2001	2002	
			dezembro	dezembro	julho	
Insecta	Coleoptera		4	12	15	31
		Curculionidae		4	12	16
		Nitidulidae		2	2	4
		Staphylinidae		6	1	7
		outros	4			4
	Diptera		82	24	95	201
		Cecidomyiidae	38	7		45
		Drosophilidae	32	6	2	40
		Phoridae	4		85	89
		outros	8	11	8	27
	Hemiptera			4		5
		Dictyopharidae			1	1
	Hymenoptera		104	17	84	205
		Apidae	5			5
		Braconidae			3	3
		Formicidae	19	16	67	102
		Vespidae	74	1		75
		outros	6		14	20
	Lepdoptera				1	1
	Thysanoptera	Thripidae		8	1	9
Insecta Total		190	65	197	452	
	Araneae	Thomisidae			1	1
Total Geral			190	65	198	453

Tabela 6: Abundância dos representantes das ordens e famílias de visitantes das flores de cacauí da coleção de germoplasma “Addison O’Neil”, nos meses de julho a setembro de 2001.

Ordem	Família	0:00	1:00	2:00	3:00	4:00	5:00	6:00	7:00	8:00	9:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00	20:00	21:00	22:00	23:00	Total	
Coleoptera	Curculionidae		1						1			2	1		2	1	1		1							10	
	Escarabeidae												1														1
	Nitidulidae						2				1						1					1					5
	Staphylinidae																										1
	Outros																	1									1
Total			1			2		1		1	1	2	2		2	1	2	1	1		2					18	
Collembola								1																1		2	
Diclioptera	Blattidae	1																			2	1				4	
Diptera	Cecidomyiidae	12	1	8	7				3	1			1	1	2	2	4	3	5	3	14	3	2	2	1	75	
	Ceratopogonidae																	1					1			2	
	Drosophilidae				1			5	20	6	7	1								7	7					54	
	Lauxanidae						1																			1	
	Micropezidae										1															1	
	Phoridae											1									1					2	
Total		12	1	9	8		6	23	8	10	3	2	2	2	3	6	5	14	15	19	5	4	2	1		160	
Hemiptera		1							1		1				2					1						6	
Hymenoptera	Apidae										1	3					1									5	
	Formicidae	28	24	34	14	15	9	11	29	25	37	49	67	27	41	36	41	38	29	9	26	16	15	7	14	641	
	Vespidae														1	1	1			1	1					5	
Total		28	24	34	14	16	9	11	29	25	38	51	74	28	44	37	43	38	30	10	27	16	15	7	14	662	
Lepidoptera			1																							1	
Orthoptera	Plasmatidae					1																		1		2	
Thysanoptera	Thripidae	16		13	7	2	3	1	1	5	7	7	16	29	23	6	14	29	12	13	2	10				216	
Outros												1														1	
Insecta Total		58	27	56	29	19	14	19	55	38	56	65	94	59	71	49	65	73	57	39	52	32	20	10	15	1072	
Araneae	Araneidae																1									1	
	Salticidae							1																		1	
	Thomisidae							1																		1	
Total							1	1				1		1	1	1									3		
Opiliones																					2					4	
Outros																				1		1				2	
Total Geral		58	27	56	29	19	14	20	56	38	56	65	95	59	71	50	66	74	58	39	55	32	20	12	15	1084	

Tabela 7: Abundância dos representantes das ordens e famílias de visitantes das flores de cacauí da Estação Científica Ferreira Penna, nos meses de julho e dezembro dos anos de 2000, 2001 e 2002.

Ordem	Família	0:00	1:00	2:00	3:00	4:00	5:00	6:00	7:00	8:00	9:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	19:00	20:00	21:00	22:00	23:00	Total
Coleoptera	Curculionidae									1		5			1	2	3	2								16
	Nitidulidae									2										1						4
	Staphylinidae												3	1			1									7
	Outros						1													1						4
Total							1			3		5	3	1	1	2	4	2	2							31
Diptera	Cecidomyiidae						25			5		4									2		3	8		45
	Drosophilidae						1	6	7	2	1	3								1	7	4	2	1		40
	Phoridae						1				6	8	11	7	3	7	13	15	5	8						89
	Outros								2		4	4	4	1	1	1	1	1	2							27
Total						27	6	9	7	11	16	15	8	4	8	14	16	8	17	4	5	9			201	
Hemiptera											1		1	2												5
	Dictyopharidae						1																			1
Hymenoptera	Apidae						2	1																		5
	Braconidae										1				1											3
	Formicidae						6	14	11	5	9	17	2	11	4	4	2	1	3	3						102
	Vespidae						10	30	15			1	1				2	3	9							75
	Outros										5	6	1	3			1	1	1							20
Total						16	46	27	5	15	24	4	14	5	4	5	5	13	3						205	
Lepdoptera																	1								1	
Thysanoptera	Thripidae										1	4	2	1			1									9
Insecta Total																										
Aracnidae	Thomisidae											1														1
Aracnidae Total												1														
Total Geral						44	53	36	15	28	50	25	26	10	14	25	23	23	20	4	5	9			453	

b) Período de atividade dos visitantes das flores de cacauí:

Foram observados insetos ao longo de todo o dia, na CGAON quatro famílias apresentaram maior concentração de indivíduos em horários específicos, estas foram: Phoridae, Apidae, Nitidulidae e Drosophilidae, as duas primeiras nunca representaram mais do que 3% do total de insetos visitantes naqueles horários. Drosophilidae apresentou pico de abundância às 7:00, quando chegou a representar 36% de todos os insetos visitantes neste horário (Tabela 6).

Na ECFPn no ano de 2000 as famílias Drosophilidae e Phoridae apresentaram picos de visitaçaõ pela manhã e a tarde. No ano de 2001, as famílias Drosophilidae e Staphylinidae apresentaram maior visitaçaõ às 10 e 11 horas, respectivamente. No ano de 2002 a família Phoridae foi a mais representativa, chegando a alcançar 78% dos visitantes às 12 e 16 horas (Tabela 7).

c) Comportamento dos drosofilídeos e forídeos na visitaçaõ das flores de cacauí ao longo de um período diário:

A família Drosophilidae apresentou-se bastante diversificada, vários morfotipos foram identificados e pelo menos uma nova espécie (ver anexo 1 e 2) foi encontrada visitando as flores de cacauí. Cinco espécies de drosofilídeos: *Drosophila coffeata*; *D. medioestriata*; *D. nebulosa*; *D. neocardini* e *D. speciosa* sp. n., três grupos: Saltans (M00018 e M00020), Tripuntata (M00019) e Guarani (M00021) e 14 espécies não determinadas, foram encontrados visitando as flores de cacauí da ECFPn (Figura 9). E na CGAON foram coletadas: *Drosophila ananassae*; *D. nebulosa*; *D. polymorpha* e *D. speciosa* sp. n., dois grupos: Saltans (M00018) e Bromeliae (A01001), uma espécie do gênero *Leucophenga* (A01002) e duas outras não identificadas (Figura 10).

A espécie *Drosophila speciosa* sp. n foi a mais abundante na CGAON, mas não apresentou a mesma abundância na ECFPn, porém em ambos locais notou-se a maior concentraçaõ de sua visitaçaõ pela manhã.

Na ECFPn, 3 espécies de forídeos foram identificados visitando as flores de cacauí: *Dohrniphora* sp.; *Megaselia* sp.; *Pseudohypocera kerteszi* (Figura 11). E somente uma espécie, a *P. kerteszi*, foi encontrada na CGAON (Figura 12). Os representantes destas famílias apresentaram picos de visitaçaõ pela manhã e tarde nas duas áreas estudadas.

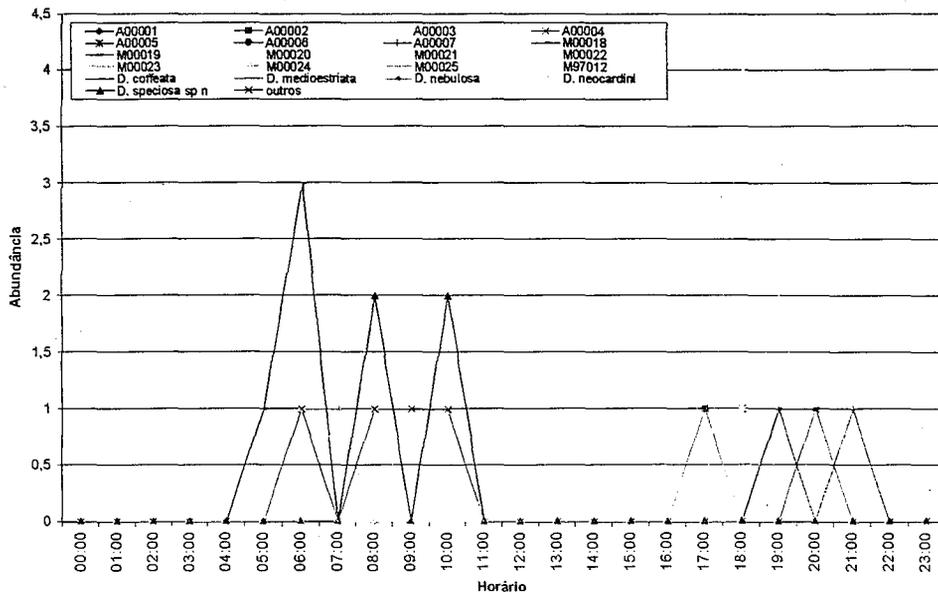


Figura 9: Abundância de drosofilídeos visitando as flores de cacauí da ECFPn, ao longo de um período diário, nos meses de julho e dezembro de 2000, 2001 e 2002

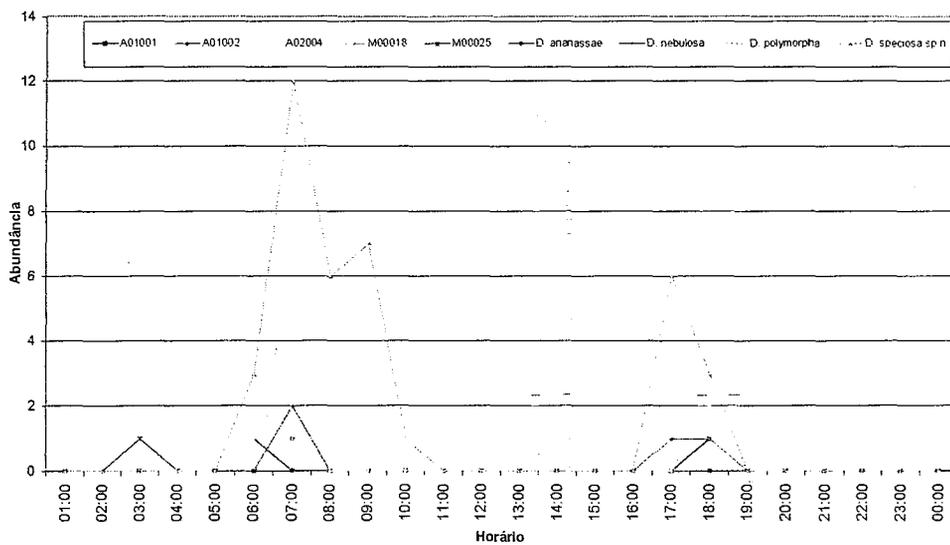


Figura 10: Abundância de drosofilídeos visitando as flores de cacauí da CGAON, ao longo de um período diário, nos meses de julho e setembro de 2001.

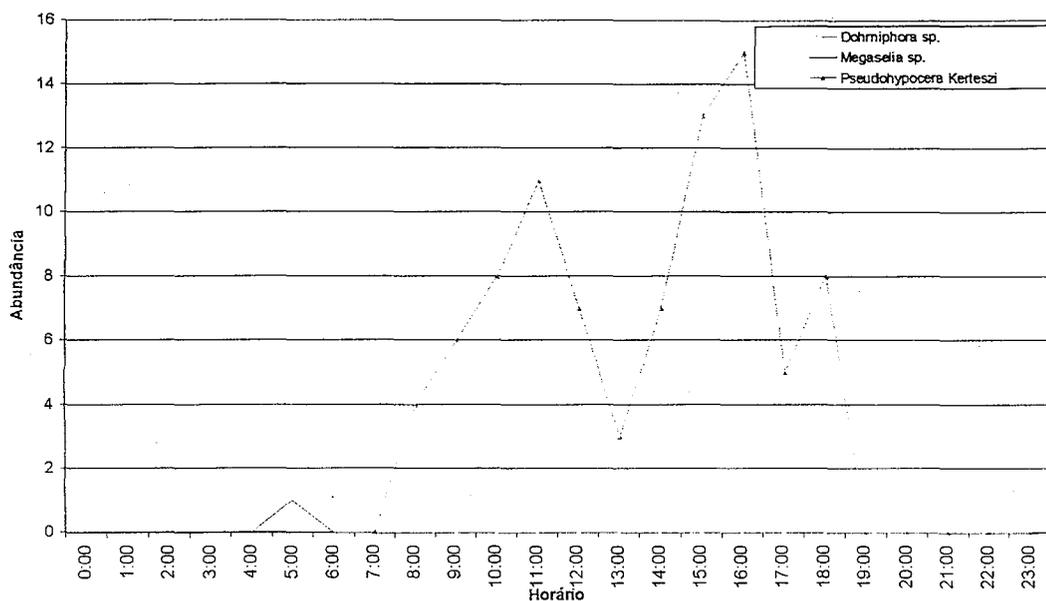


Figura 11: Abundância de forídeos visitando as flores de cacauí da ECFPn, ao longo de um período diário, nos meses de julho e dezembro de 2000, 2001 e 2002

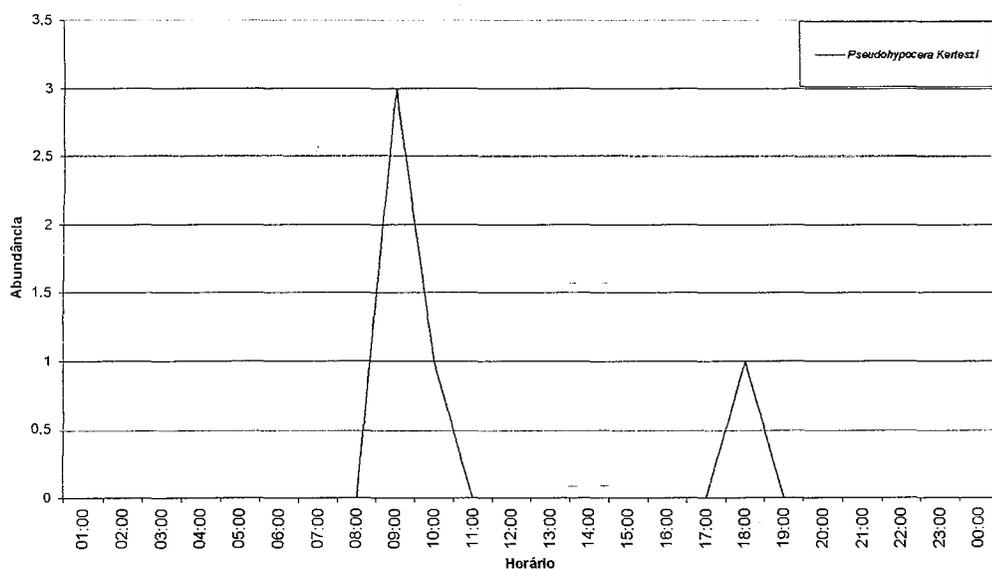


Figura 12: Abundância de forídeos visitando as flores de cacauí da CGAON, ao longo de um período diário, nos meses de julho e setembro de 2001.

Na CGAON de julho a setembro de 2002, coletou-se, das 8 às 11 h, horário em que as flores de cacauí apresentam maior receptividade, 75 drosofilídeos e 4 forídeos, todos eles visitaram o androceu e o gineceu da flor, nesta ordem (Tabela 8).

Tabela 8: Número de indivíduos de Drosophilidae e Phoridae visitando as flores de cacauí nos horário de maior receptividade destas flores. Provenientes da coleção de germoplasma “Addison O’Neil”, em coletas realizadas de julho a setembro de 2002.

Família	Espécie	8:00	9:00	10:00	11:00	TOTAL
Drosophilidae	A02007			1		1
	<i>D. ananassae</i>			1		1
	<i>D. malerkotliana</i>	1	1			2
	<i>D. polymorpha</i>	1	3	2		6
	<i>D. speciosa</i> sp n	9	32	24		65
Drosophilidae Total		11	36	28		75
Phoridae	<i>Pseudohypocera</i>		3	1		4
	<i>Kerteszi</i>					
Phoridae Total			3	1		4
Total		11	39	29		79

A figura 13 mostra a abundância dos indivíduos de Drosophilidae e Phoridae, coletados neste trabalho na CGAON, comparadas com os horários de maior receptividade das flores de cacauí ao longo de um período diário de acordo com as curvas de receptividade das flores de cacauí produzidas com base nos dados de Souza e Venturieri, 1998. Esta receptividade foi medida pela contagem das bolhas formadas na solução de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) devido a liberação de Oxigênio nesta solução, e pela visualização da quantidade de exsudato nos braços estigmáticos. As maiores abundâncias em ambas famílias coincide com o de maior receptividade floral, sendo que os drosofilídeos foram mais representativos, chegando a 85 indivíduos no horário das 6 da manhã.

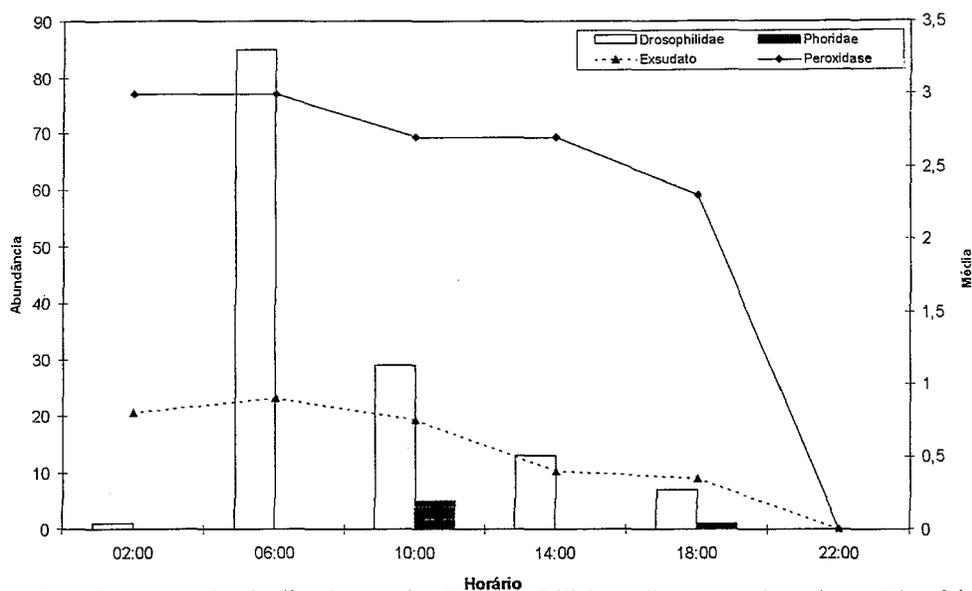


Figura 13: Número de indivíduos de Drosophilidae (barras claras) e Phoridae (barras negras) nas flores de cacauí e as curvas de receptividade destas flores ao longo de um

período diário com base nos dados de Souza & Venturieri, 1998, da coleção de germoplasma “Addison O’Neil”. Em linhas contínuas a média da reação da peroxidase e em linhas pontilhadas a média de produção de exsudato.

d) Carreamento de pólen pelos drosofilídeos e forídeos:

Os indivíduos de ambas famílias apresentaram padrões de visitação e comportamento de polinização nas flores de cacauí coincidindo com os horário de maior receptividade destas flores. Uma espécie de drosófila, *D. speciosa* sp. n. e uma espécie de forídeo, *P. kerteszi* foram observados atentamente sob microscopia de varredura, em cada parte do corpo foi averiguado a presença ou ausência de gr os de pólen. Foram detectados grãos de pólen de *T. speciosum* no mesonoto e nas pernas das duas espécies, sendo que em *P. kerteszi* também foi encontrado pólen de outras espécies de planta nas pernas anteriores, entre as cerdas. A figura 14 mostra a presença destes grãos no corpo destes insetos.

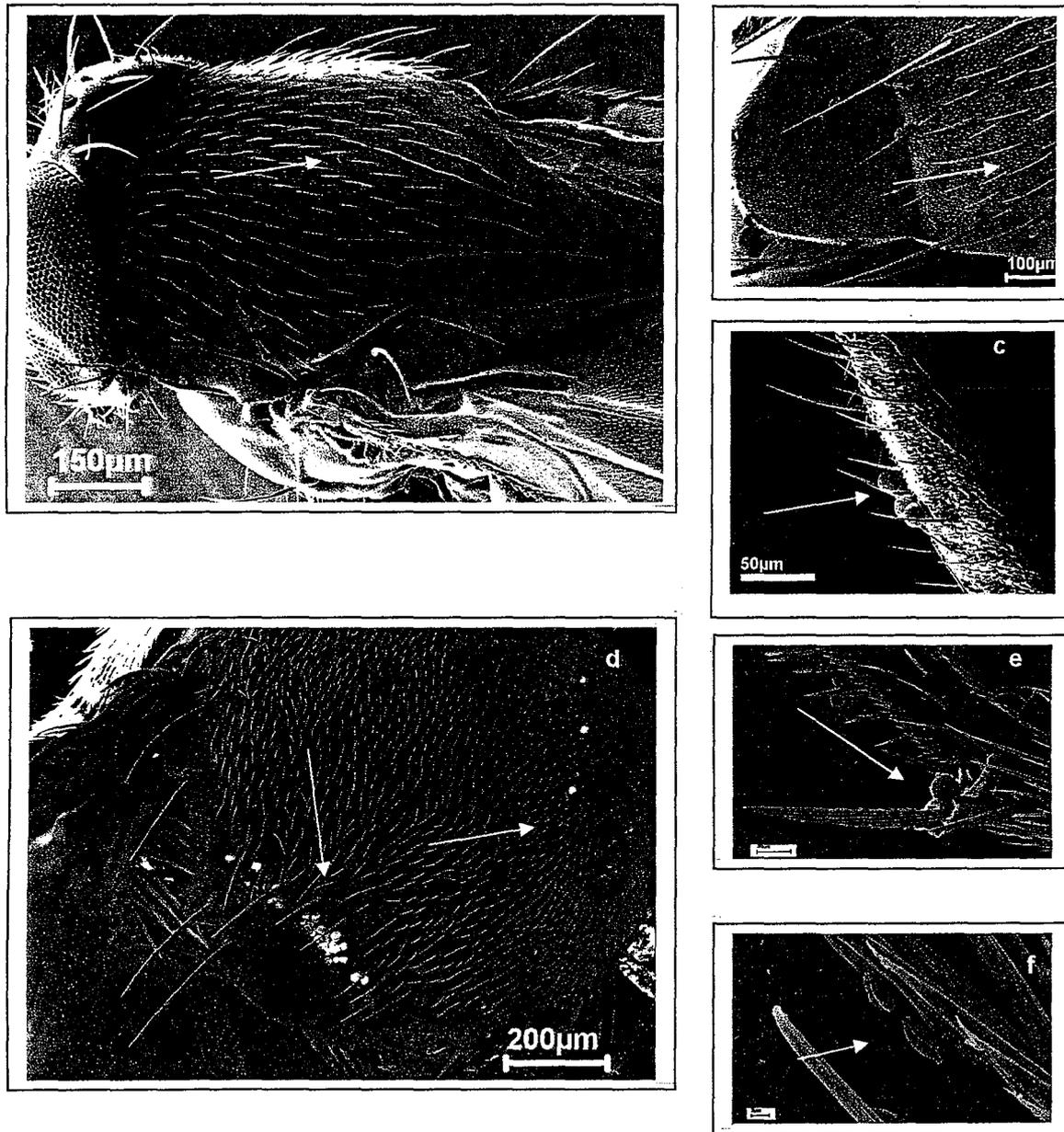


Figura 14: Grãos de pólen de *T. speciosum* distribuídos no corpo dos insetos. a) *Drosophila speciosa* sp. n., grãos de pólen no mesonoto; b) Pólen no escutelo de *D. speciosa* sp. n.; c) Pólen nas pernas de *D. speciosa* sp. n.; d) *P. kerteszi*, grãos de pólen no mesonoto; e) Pólen nas pernas de *P. kerteszi*; e f) Pólen de outra espécie de planta na perna de *P. kerteszi*.

e) Avaliação da diversidade e similaridade entre as guildas de drosofilídeos nas duas áreas de preservação:

A maior diversidade dos drosofilídeos visitantes das flores de cacauí foi encontrada na ECFPn onde em apenas 4 árvores acompanhadas por 5 dias totalizando 40 horas de observação, obteve-se 40 indivíduos de 23 espécies (5 determinadas). Enquanto que na CGAON 129 indivíduos de 9 espécies (5 determinadas) foram coletados em 12 árvores em 96 horas.

O índice de Shannon calculado foi de $H' = 1,2$ para coleção de germoplasma "Addison O'Neil" e $H' = 2,8$ para ECFPn. A similaridade faunística entre os drosofilídeos das duas áreas estudadas foi de 0,13% de acordo com o índice de Jaccard. Que refletiu a existência de apenas quatro espécies comum às duas áreas: *D. speciosa* sp. n, *D. nebulosa*, e morfotipos M00025 e M00018.

A guilda da ECFPn foi composta em sua maioria por espécies que apresentam características morfológicas provavelmente adaptativas ao uso de flores como: pilosidade e presença de cerdas modificadas nas placas do ovipositor. Enquanto que as espécies da CGAON são predominantemente saprófitas.

f) Comportamento de polinização:

Os insetos da família Drosophilidae e Phoridae além de visitarem as flores de cacauí, no horário de maior receptividade floral, carregarem pólen em seus corpos, também apresentaram comportamento característicos de polinizadores. O tamanho destes insetos propiciou melhor movimentação no aparato floral permitindo que os mesmos pudessem visitar os órgãos reprodutivos da flor de cacauí. Estes indivíduos ao primeiro contato com a flor pousavam na lígula, passavam para cógula, aonde fica localizado o androceu (circuito 1, figura 15), e posteriormente se direcionavam para o gineceu encostando o dorso coberto de grãos de pólen nos braços estigmáticos (circuito 2, figura 15). Observou-se que estes insetos se encaminhavam até a base do ovário, permitindo maior permanência dos mesmos no gineceu, possibilitando o desprendimento dos grãos de pólen no estigma. Estes indivíduos foram encontrados alimentando-se de substâncias na base da cógula. Alguns drosofilídeos também foram observados copulando nas flores de cacauí.

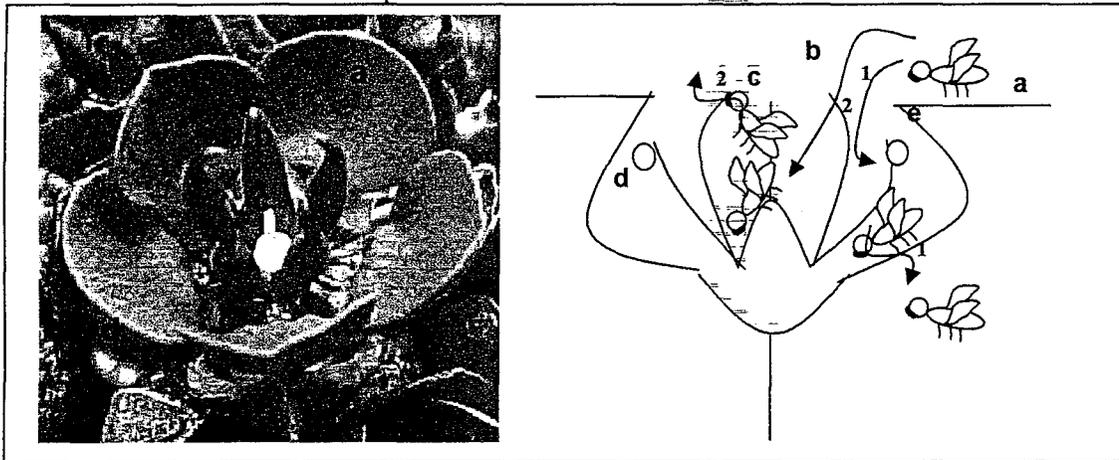


Figura 15: Flor de *Theobroma speciosum* e diagrama floral apresentando o caminho percorrido pelos insetos. a: lígula; b: estaminódios; c: ginéceu (braços estigmáticos e ovário); d: cógula; e: androceu (anteras). Circuito 1, visita ao androceu. Circuito 2, visita ao gineceu.

g) Uso dos recursos florais de cacauí (*T. speciosum*) pelos insetos:

g.1) Identificação dos invertebrados presentes nas flores:

Na CGAON a maioria dos invertebrados retirados de dentro das flores foram representantes das famílias Formicidae (70,6 %), Curculionidae (12,2%) e Thripidae (8,6%), os outros invertebrados foram pouco representados. Na ECFPn a família Formicidae também foi a melhor representada (64,71%), sendo que entre os coleópteros a família Staphylinidae foi a mais abundante, seguidas de nitidulídeos (5,7%), para os demais a frequência não chegou a 1% dos animais nestas flores (Tabela 9 e 10).

Tabela 9: Invertebrados retirados em laboratório, provenientes das flores de cacauí da CGAON. N=1335.

Ordens	FAMÍLIAS	FREQÜÊNCIA
	Curculionidae	12,2
	NITIDULIDAE	2,0
	Staphylinidae	0,8
Coleoptera		15,0
Collembola		0,1
Dermaptera		0,1
Dictyoptera	Blattidae	0,2
	Drosophilidae	0,9
	Outros	0,5
Diptera		1,4
Endriophthalma		0,2
Hemiptera		0,5
	Formicidae	70,6
	Outros	2,8
Hymenoptera		73,4
Thysanoptera	Thripidae	8,6
		0,2
	SALTICIDAE	
		0,3
	SCYTODIDAE	
	Thomisidae	0,1
Araneae		0,5

Tabela 10: Invertebrados retirados em laboratório, provenientes das flores de cacauí da ECFPn. N=562

Ordens	Famílias	Frequência
Coleoptera	Curculionidae	1,43
	Nitidulidae	5,70
	Staphylinidae	8,02
	Outros	0,36
		15,51
Collembola	Entomobrydae	0,36
Diptera	Cecidomyiidae	0,89
	Drosophilidae	0,89
	Phoridae	0,18
	Outros	0,18
		2,14
Hemiptera		3,03
Hymenoptera	Formicidae	64,71
	Outros	0,18
		64,88
Thysanoptera	Thripidae	13,73
Araneae	Ctenidae	0,18
Endriophthalma		0,18

g.2) Observação da emergência dos insetos adultos em flores de cacauí:

Na CGAON foram coletadas 16751 flores, 25,67% (4300 flores) deste total produziram insetos. 950 indivíduos a partir de flores vivas e 1641 de flores em decomposição.

A ordem Diptera foi a melhor representada, com 1282 indivíduos da família Psychodidae que somente emergiram a partir de flores em decomposição. Os 623 indivíduos da família Cecidomyiidae emergiram na maioria em flores vivas e os 551 drosofilídeos, distribuíram-se da seguinte maneira: 317 de flores vivas e 240 de flores em decomposição (Tabela 11). As espécies de drosofilídeos emergentes das flores vivas foram *D. speciosa* sp. n e um indivíduo de *D. malerkotliana* e nas flores em decomposição as espécies *D. melanogaster* e *D. polymorpha*, sendo que *D. speciosa* sp. n também foi encontrada emergindo de flores em decomposição. Os resultados de emergência a partir de flores da ECFPn foram menos representativos do que na CGAON, provavelmente em função das dificuldades encontradas de manipulação e transporte do material.

Na ECFPn obtiveram-se 354 indivíduos emergentes a partir de 1477 flores, do total de 3729 coletadas, a ordem Coleoptera foi a mais numerosa, com 312 indivíduos, a maioria oriundos de flores vivas, a família Curculionidae correspondeu a 89% dos indivíduos emergentes. Na ordem Diptera a família Drosophilidae correspondeu a 21% dos indivíduos emergentes, representados por 4 indivíduos de *D. speciosa* sp. n emergidos tanto de flores vivas quanto em decomposição (Tabela 12).

Tabela 11: Insetos emergentes das flores de cacauí, provenientes da coleção de germoplasma "Addison O'Neil".

Ordem	Família	2000			2001			2002			Total
		flor viva	Flor em Decomposição	total	Flor Viva	flor em decomposição	total	flor viva	Flor em decomposição	total	
Coleoptera	Nitidulidae		1	1	1	14	15	1	2	3	19
	Outros					1	1				1
	Staphylinidae	1	1	2	2	9	11				13
Total		1	2	3	3	24	27	1	2	3	33
Diptera	Cecidomyiidae	226	13	239	261	4	265	95	26	121	625
	Ceratopogonidae				1		1				1
	Drosophilidae	73	136	209	198	95	293	46	9	55	557
	Outros	1	19	20	5	14	19		2	2	41
	Phoridae					3	3				3
	Psychodidae		1276	1276		6	6				1282
Total		294	1442	1736	465	122	587	141	37	178	2501
Hymenoptera		5	3	8	28		28				36
Lepdoptera		8	7	15		2	2	4		4	21
Total Geral		308	1454	1762	496	148	644	146	39	185	2591

Tabela 12: Insetos emergentes das flores de cacauí, provenientes da Estação Científica Ferreira Penna.

Ordem	família	2001			2002			Total
		flor viva	Flor em decomposição	total	flor viva	Flor em decomposição	total	
Coleoptera	Curculionidae	60	38	98	198	5	203	301
	Nitidulidae					7	7	7
	Staphylinidae	4		4				4
Total		64	38	102	198	12	210	312
Diptera	Cecidomyiidae				1		1	1
	Drosophilidae		2	2	2		2	4
	outros	6	7	13		1	1	14
Total		6	9	15	3	1	4	19
Hymenoptera		1		1				1
Lepdoptera		3		3				3
Total Geral		74	47	121	201	13	214	335

g.3) Tempo de emergência dos insetos no laboratório:

A tabela 13 apresenta o tempo de desenvolvimento em laboratório, para os diversos grupos emergentes das flores de *T. speciosum* provenientes da CGAON e da ECFPn.

Na ECFPn os representantes da família Curculionidae levaram até 23 dias para completar seu desenvolvimento, seguidos da família Nitidulidae com até 22 dias. Na família Cecidomyiidae e Staphylinidae somente um indivíduo emergiu das flores de cacauí, com 23 e 16 dias respectivamente. *Drosophila speciosa* sp. n foi a única espécie de drosofilídeos que emergiu das flores de cacauí, com no máximo 12 dias de desenvolvimento.

Nas flores de cacauí da CGAON os indivíduos da família Cecidomyiidae apresentaram maior tempo de desenvolvimento, com até 32 dias, posteriormente as famílias Staphylinidae e Psychodidae, com tempo de desenvolvimento de 18 e 13 dias, respectivamente. Três espécimes da família Phoridae, *Megaselia* sp., levaram 11 dias para se desenvolverem nestas

flores. Na família Drosophilidae as espécies *Drosophila malerkotiana* e *D. melanogaster* desenvolveram-se com até 10 dias; a maioria dos indivíduos de *D. speciosa* sp. n. teve seu tempo de emergência variando entre 8 e 10 dias e somente dois indivíduos desenvolveram-se com 25 dias. Os demais drosofilídeos emergiram com até 13 dias de laboratório.

Tabela 13: Tempo mínimo e máximo de emergência dos insetos, provenientes da ECFPn e coleção de germoplasma “Addison O’Neil”, contadas a partir do dia da coleta das flores até o dia da última emergência.

Famílias	espécies	ECFPn	Coleção de germoplasma
Cecidomyiidae		23	2-32
Ceratopogonidae		-	12
Drosophilidae	<i>Drosophila speciosa</i> sp. n.	9-12	6-25
	<i>D. malerkotiana</i>		10
	<i>D. melanogaster</i>		10
	<i>D. polymorpha</i>		7-8
	A02001		10-12
	A02003		11-12
	A02004		12-13
	A02005		8-12
	A02006		8
Phoridae		-	11
Psychodidae		-	6-13
Nitidulidae		15-22	7-11
Curculionidae		16-23	-
Staphylinidae		16	10-18

g.4) Acompanhamento da emergência dos insetos adultos em flores de cacauí separadas por categoria floral:

A emergência dos insetos a partir das flores separadas por categoria floral estão apresentadas na tabela 14. A maioria destes insetos, em ambas áreas de estudo, originaram-se dos botões. Em flores novas houve menor número de indivíduos que emergiram das flores da ECFPn em relação a outra área estudada.

Na CGAON, os drosofilídeos foram observados originando-se predominantemente de flores novas, 302 indivíduos, sendo 245 de *Drosophila speciosa* sp. n. Os insetos da família Cecidomyiidae predominaram nos botões, 371 indivíduos e os forídeos emergiram de flores velhas, 3 indivíduos, todos *Megaselia* sp.; 26 coleópteros e 7 lepdópteros completam a lista dos emergentes das flores velhas e a maioria dos himenópteros emergiram dos botões (Tabela 15).

Na ECFPn a maioria dos indivíduos que emergiram das flores de cacauí foram representantes da ordem Coleoptera, seguidos da ordem Diptera. A categoria floral botão foi a que apresentou maior número de indivíduos emergentes (255 curculionídeos). Dois indivíduos da espécie *D. speciosa* sp. n. foram encontrados, um emergindo dos botões e um de flores novas (Tabela 16).

Tabela 14: Estimativas do número de indivíduos emergentes por cada 100 unidades florais das diferentes categorias florais de *T. speciosum*, provenientes da CGAON e ECFPn. Considerando-se o conjunto dos emergentes.

Categoria floral	indivíduos emergentes	
	Coleção de germoplasma	ECFPn
Botão	48,85	42,90
Flor nova	19,24	4,09
Flor velha	21,30	19,18

Tabela 15: Estimativa do número de indivíduos emergentes por cada 100 unidades florais das diferentes categorias florais de *T. speciosum*, provenientes da CGAON. Considerando-se cada táxon.

Ordem	Familia	espécie	Botão (n=825)	Flor nova (n=1720)	Flor velha (n=1080)	
Coleoptera				0,29	2,41	
		Nitidulidae		0,12	1,48	
		Outros			0,09	
		Staphylinidae		0,17	0,83	
Diptera			45,33	18,66	18,24	
		Cecidomyiidae	44,97	0,76	3,15	
		Ceratopogonidae		0,06		
		Drosophilidae	A02001		0,12	0,09
			A02003			0,18
			A02004		0,12	
			A02005		0,06	0,09
				0,36	17,15	12,13
			<i>Drosophila speciosa</i> sp n		0,06	
			<i>Drosophila malerkotliana</i>			
			<i>Drosophila polymorpha</i>			0,09
		Phoridae	<i>Megaselia</i> sp.			0,28
	Psychodidae				0,56	
	Outros			0,29	1,57	
Hymenoptera			3,52			
Lepdoptera				0,29	0,65	
Total Geral			48,85	19,24	21,30	

Tabela 16: Estimativa do número de indivíduos emergentes por cada 100 unidades florais das diferentes categorias florais de *T. speciosum*, provenientes da ECFPn. Considerando-se cada táxon.

Ordem	Família	Espécie	Botão (n=620)	flor nova (n=220)	flor velha (n=245)
Coleoptera			41,77	1,36	17,55
	Curculionidae		41,13	1,36	17,55
	Staphylinidae		0,65		
Diptera			0,81	1,82	1,63
	Cecidomyiidae			0,45	
	Drosophilidae	<i>Drosophila speciosa</i> sp n	0,16	0,45	
	Outros		0,65	0,90	1,63
Hymenoptera			0,16		
Lepdoptera			0,16	0,90	
Total Geral			42,90	4,09	19,18

IV. DISCUSSÃO

1 – Conservação de *Theobroma speciosum* (cacauí):

O gênero *Theobroma* é considerado como de origem neotropical, com dispersão natural em florestas úmidas estendendo-se da bacia Amazônica até o Sul do México entre as Latitudes 18° N e 15° S. *Theobroma speciosum* distribui-se desde o estado do Maranhão até Cururupu no Acre e Madre de Dios no oeste da Bolívia e Ucayale River no Peru (Cuatrecasas, 1964).

Para Ducke (1953), todos os "cacaueiros" (incluindo todas as espécies amazônicas de *Theobroma* e mais *H. mariae* e *H. camargoana*) fazem parte do sub-bosque da mata pluvial, das terras não inundáveis (terra firme) ou periodicamente inundáveis pelas cheias de rios e lagos (várzea) onde ocupam de preferência a parte raramente ou pouco alagável (restinga). Na "terra firme", a maioria prefere margens de riacho e outros lugares úmidos, entretanto, *T. speciosum* e *T. sylvestre* habitam terras relativamente secas. Nenhuma espécie é encontrada em "campos" naturais (savana) ou nas campinas arenosas com húmus preto dispersos na floresta, nem na "caatinga amazônica" (mata que ocorre na margem do Rio Negro). Segundo Almeida et al (1993) espécies de sub-bosque tem condições de baixa luminosidade o que reduz sensivelmente a sua densidade.

Todas as espécies amazônicas do gênero *Theobroma* produzem frutos comestíveis, cujas polpas são usadas no fabrico de sucos, sorvetes, geléias, doces e licores (Venturieri, 1994). O cacau (*T. cacao*) é que tem atualmente maior expressão econômica, por ser a base da indústria chocolateira. No entanto *T. speciosum* (cacauí) poderá contribuir para o sustento desta indústria chocolateira por ter sementes que também podem ser usadas para fabricação de chocolate (ainda que de qualidade inferior). Portanto o conhecimento da biologia reprodutiva desta espécie poderá contribuir para experimentos direcionados a formação de híbridos capazes de produzir mais sementes ou ao menos maior resistência à doenças, que hoje tem diminuído as plantações de cacau.

O cacauí é uma planta auto-incompatível (Souza & Venturieri, 1998) possui flores hermafroditas agrupadas em buquet florais, constituídas de botões, flores novas e velhas, estas flores apresentam disposições variadas. Em média cada buquet contém 250 flores (Cuatrecasas, 1964). O agrupamento de muitas flores pode ser considerado um aspecto evolutivo para compensar o tamanho individual de cada flor, otimizando a competição dos polinizadores por flores mais vistosas e coloridas. A frequência em que ocorrem essas espécies hermafroditas na floresta tropical, parece estar relacionada com um sistema floral propício para sua sobrevivência (Almeida et al, 1993).

As flores de cacauí apresentam mudanças na coloração de suas estruturas florais ao longo do dia, pela manhã quando as flores completam sua abertura apresentam pétalas e sépalas com tons de vermelho mais intenso e conforme as flores envelhecem esta coloração tende a escurecer. O odor característico de limão é percebido com mais intensidade no horário das 10 horas da manhã (Cuatrecasas, 1964; Souza & Venturieri, 1998). Estas características servem como atrativo para variados grupos de invertebrados, que visitam as flores no horário em que as mesmas estão mais receptivas e acabam atraindo além dos polinizadores outros invertebrados que não estão relacionados com a polinização. Por outro lado o aglomerado de flores destas inflorescências também funciona como abrigo, o que pode explicar a presença de grupos como quilópodos e diplópodos.

Se por um lado há uma grande variedade de organismos freqüentando estas flores por outro há mecanismos seletivos específicos que servem como atrativo para seus polinizadores, como os nectários florais que se encontram na base da cógula (pélata modificada) (Young,

1984), esta estrutura protege as anteras e somente pequenos insetos conseguem penetrar e acabam ficando sujos de grãos de pólen. Além disto existem barreiras físicas entre o gineceu e androceu que impedem outros visitantes de percorrerem estas estruturas, Endress (1994) classificou este tipo floral como flor armadilha.

Flores de cacauí podem estar intrinsecamente relacionadas com as espécies de drosofilídeos e forídeos, pois estas flores atraem insetos pelo odor característico de suas flores além de apresentar barreiras físicas de modo que somente estes dois grupos de insetos conseguem percorrer ambas as partes, o que é essencial para efetivar a polinização. Esse tipo de estrutura floral é um indicativo de que há uma associação especializada no processo de polinização que somente os insetos capazes de entrar e sair desta estrutura é que poderão ser capazes de efetivar a polinização.

Comparando-se as populações das duas áreas de estudo, as árvores de cacauí não diferiram em altura, mas em diâmetro, provavelmente por que estas árvores num sistema natural disputam nutrientes com outras espécies de plantas, enquanto que em sistemas artificiais o homem se encarrega desta nutrição, através de adubos, maior irradiação solar e podas frequentes. Propiciando desta forma maior produção de flores e frutos, o que é de se esperar de uma plantação, principalmente aquelas de importância econômica.

Na área de plantação, assim como em ambiente natural a floração de cacauí ocorreu nos meses de menor pluviosidade e temperatura variável de 20° a 28° C. A frutificação só foi observada na CGAON, ocorrendo nos meses de maior pluviosidade, o que já era esperado, visto que o padrão de sazonalidade em florestas tropicais interfere na fenologia de floração e frutificação da planta (O'Brien 1993 apud Pires-O'Brien 1994). O fato de não terem sido observados frutos na ECFpn se dá provavelmente devido à atuação de dispersores, visto que esta planta permanece com seus frutos fixos no caule até o apodrecimento, caso estes não sejam retirados por dispersores, e foi exatamente o que aconteceu na CGAON, todos os frutos de cacauí observados durante os 12 meses de acompanhamento fenológico permaneceram na planta até o apodrecimento dos mesmos.

Os dados deste trabalho mostram que as populações de *T. speciosum* diferem nas duas áreas estudadas, quanto a dados de frequência de jovens e adultos e dispersão dos frutos, o que pode estar relacionado com a nutrição do solo e a presença de outros animais em áreas naturais.

As árvores de cacauí foram observadas na Estação Científica Ferreira Penna com distribuição espacial do tipo agregada, na escala avaliada. Baseado nos valores de diâmetro do caule e altura da planta podemos dizer que as árvores jovens formam este agregado, provavelmente por causa de animais que retiram o fruto para alimento e assim conseguem fazer a dispersão das sementes bem próximas da árvore adulta. Em *T. cacao* essa dispersão pode ocorrer por meio de duas espécies de macacos, o macaco prego (*Cebus apella*) que conduz mais frutos do que come, promovendo desta forma a colonização em outros habitats e o *Saimiri sciureus*, que comumente se alimenta no próprio local (Bates, 1979 apud Almeida, 1996). Os dispersores de cacauí não são conhecidos. Em plantações, se o sistema de preservação não for eficaz não poderemos observar esta distribuição, devido à ausência ou baixa frequência deste dispersores, como no caso da área da CGAON quando todos os indivíduos presentes foram adultos. Esta ausência de jovens de *T. speciosum* na área de preservação *ex situ* demonstra naturalmente o comprometimento do futuro desta população.

Na conservação, a tarefa atual mais difícil é conseguir reunir o máximo de relações ecológicas num determinado sistema de preservação, para manter o correto equilíbrio entre utilização do recurso e manutenção do mesmo. Porém podemos perceber que num sistema de preservação *in situ* pode-se conservar a maioria das interações ecológicas existentes naquele sistema o que nem sempre é possível em preservações *ex situ*. No entanto se ainda pudermos

conservar espécies através do manejo de seus habitats em áreas protegidas, com capacidade para receber populações viáveis a longo prazo, devemos sim optar por este tipo de preservação.

Para tornar sistemas de preservação *ex situ* mais eficientes deve-se levar em consideração todos os organismos que fazem parte do sistema da planta como os predadores, parasitas, polinizadores e dispersores de sementes. Mantendo os processos ecológicos essenciais para a manutenção da diversidade genética, promovendo desta forma a sustentabilidade das espécies e do ecossistema (Sperllberg, 1997).

2 - Os visitantes das flores de cacauí:

O cacauí apresentou grande diversidade de invertebrados visitando suas flores, com finalidades diversas como: alimentação, abrigo, reprodução, desenvolvimento e polinização, em ambas as áreas estudadas. Como se segue abaixo:

Ordem Coleoptera: Foram observados pelo menos três famílias de coleópteros comuns às duas áreas estudadas. A família Curculionidae foi a mais abundante nas duas áreas. Estes insetos visitaram as flores de cacauí em horários variados e não apresentaram comportamento de polinizador. Estes insetos também foram observados dentro das flores e emergindo dos botões, levando até 23 dias para completar seu desenvolvimento nestes botões. Sendo que na CGAON os curculionídeos não foram observados nascendo das flores de cacauí. Os nitidulídeos foram observados em menor quantidade visitando e emergindo das flores em torno de 22 dias. Estes insetos são conhecidos por hábitos saprófitos e por utilizarem recursos efêmeros, sejam folhas, flores ou frutos, e neste trabalho *T. speciosum* foi acrescida como mais uma espécie de planta utilizada como fonte alimentar para larvas e adultos destes coleópteros.

Os insetos da família Staphylinidae foram pouco observados visitando ou emergindo das flores, mas quando se observou os insetos dentro das flores, o que foi realizado em laboratório, este número aumentou, provavelmente este aumento está relacionado com a disponibilidade de recurso alimentar dentro destas flores, como ovos e larvas de outros insetos, já que estes insetos são predadores.

Ordem Collembola: Somente dois indivíduos foram coletados na CGAON e que não foram observados visitando as flores de cacauí, provavelmente estavam no corpo de outros insetos que foram capturados.

Ordem Hemiptera: Estes indivíduos foram encontrados somente nos pedúnculos florais, nas duas áreas estudadas. Sem importância na polinização.

Ordem Hymenoptera: Os formicídeos em todos os horários estavam presentes nas flores de cacauí, percorrendo todas as partes florais, e algumas formigas com grãos de pólen pelo corpo. Provavelmente devido o arranjo floral propiciar abrigo para estes insetos. As formigas não apresentaram nenhuma importância para polinização desta espécie.

Os representantes das famílias Apidae e Vespidae foram observados visitando as flores de cacauí pela manhã, mas sempre na cógula aonde estão localizadas as anteras. Não foram observados visitando o estigma em nenhuma ocasião. Estes insetos foram classificados como predadores e oportunistas, pois estão visitando as flores nos horários em que a mesma se encontra receptiva, mas esta visita se restringe apenas ao objetivo de pilhar os grãos de pólen e no caso de algumas vespas preda outros animais. Outros himenópteros que emergiram destas flores podem ser considerados insetos parasitas de dípteros ou de outros insetos.

Ordem Lepidoptera e Ortoptera: Foram os menos freqüentes, sendo que os ortópteros somente foram encontrados nas flores de cacauí da CGAON. Ambos visitaram as

flores no início da noite. Estes insetos não estão sendo atraídos pela síndrome floral, apenas estão utilizando os recursos disponíveis nas flores para sua alimentação.

Ordem Thysanoptera: Foram abundantes nas duas áreas estudadas, não apresentaram padrões de visitação e em sua maioria foram encontrados nos botões. Estes insetos são conhecidos como pragas nas plantações pois os mesmos se alimentam de pólen, néctar e outros líquidos florais. Sabe-se que os grãos de pólen são ricos em proteínas o que pode ser importante para a fertilidade destes adultos, que segundo Kirk (1984) vários trips podem comer em torno de 100 grãos de pólen em 15 minutos.

Outras ordens: Estes incluem aracnídeos, diplópodos, quilópodos e opiliones que foram em maioria observados a noite. Todos escondidos entre as flores, exceto os opiliones que percorriam as flores em busca de alimento. Devido a forma em que as flores de cacauí estão arrumadas, a penetração de vários invertebrados que podem utilizar estas flores como abrigo é inevitável.

Ordem Diptera: Nos dois locais estudados as famílias Cecidomyiidae, Drosophilidae e Phoridae sempre estiveram presentes nas flores de cacauí, sendo que os indivíduos da família Cecidomyiidae e Phoridae foram os mais representativos, na CGAON e na ECFPn, respectivamente. Destes, apenas os forídeos, na ECFP não foram observados emergindo das flores. Os insetos da família Psychodidae foram observados emergindo das flores de cacauí coletadas somente na CGAON.

Os cecidomiídeos sempre foram encontrados visitando os botões florais e também a maioria emergiram dos mesmos. Os insetos da família Psychodidae foram observados emergindo de flores em decomposição retiradas da inflorescência e flores obtidas do solo. Fato interessante de se observar pois estas flores oferecem recursos essenciais para o desenvolvimento de fungos e bactérias que se proliferam em flores em decomposição propiciando recursos alimentares para vários organismos.

Os drosofilídeos e forídeos sempre visitaram as flores novas, estes insetos percorriam o androceu e gineceu, nesta ordem. Esta visita no androceu provavelmente está relacionada com os nectários florais localizados na base da cógula, pétala modificada que protege as anteras, que segundo Young (1984) servem como atrativo para os polinizadores.

Tanto drosofilídeos quanto forídeos freqüentaram a flor pela manhã e pela tarde, nas duas áreas estudadas. Alguns drosofilídeos e uma espécie de forídeo foram observados emergindo destas flores. Isto comprova que a síndrome floral de cacauí funciona, os insetos são atraídos pelas flores no horário em que elas estão receptivas, utilizam as flores de forma variadas e dependendo da rotina destes insetos, os mesmos também retornam à flor em outros horários, como é o caso dos drosofilídeos que são diurnos e apresentam padrões característicos de visitação pela manhã e tarde. Já os forídeos são atraídos pelas flores e permanecem por lá até o entardecer.

Megaselia sp. e Dohrniphora sp. foram os forídeos identificados como polinizadores das espécies *Herrania purpurea*, *H. nitida* e *H. albiflora* (Sterculiaceae), gênero próximo de *Theobroma*, todas altamente especializadas para visitação de pequenos insetos, que conseguem penetrar as estruturas florais, que são em forma de armadilha (barreiras físicas entre os órgãos reprodutivos). Os forídeos visitaram as flores logo que as mesmas abriram, provavelmente devido à visualização dos nectários florais que aparecem quando a flor está receptiva, por produzirem grande quantidade de exsudato e também devido exalarem odor característico (Young, 1984). Uma outra espécie de forídeo, *Megaselia sakaiiae* foi indicada como polinizadora de *Aristolochia inflata*, Aristolochiaceae, que além de polinizá-la também utiliza o recurso flor para oviposição, estas flores apresentam barreiras físicas entre os órgãos reprodutivos e que atraem seus polinizadores pelo odor característico de suas flores. A família Aristolochiaceae é conhecida por ter como polinizadores moscas saprófagas das

famílias Anthomyiidae, Chloropidae, Milichiidae, Phoridae, Sarcophagidae e Syrphidae e mais recentemente Drosophilidae (Sakai, 2002).

A grande diversidade dos visitantes das flores de cacauí foi representada pelos drosofilídeos, desde diminutos insetos a mais volumosos e a maioria bem pilosos, isto poderá estar estreitamente relacionado com a aderência de grãos de pólen em seu corpo facilitando o processo da polinização. Alguns drosofilídeos já foram indicados como eficientes polinizadores de outras espécies de *Theobroma*, como por exemplo o cacau, que em decorrência da estrutura morfológicas destes insetos facilitou o processo de transporte dos grãos de pólen de uma planta a outra (Massaux et al 1976 apud Lachaise & Tsacas, 1983).

No gênero *Drosophila* muitas espécies têm sido encontradas em flores, a maioria delas nos trópicos, provavelmente por causa de longos períodos de floração e diversidade florística (Heed, 1960). Pelo menos seis grupos foram identificados nestas flores, saltans, tripuntata, guarani, bromeliae, cardini, repleta, assim como um representante do gênero *Leucophenga*, todos estes grupos de espécies são caracterizados como polívoros, utilizando principalmente frutos e flores em decomposição. Dentre estes, o único que é citado como antofílico é o grupo bromeliae (Brncic, 1983).

O grupo bromeliae é atualmente composto por quatro espécies (*Drosophila florum*, *D. bromelioides*, *D. bromeliae* e *D. aguape*) e uma nova espécie (*D. speciosa* sp. n) (artigo submetido) está sendo proposta para o grupo. Além disso duas outras espécies ainda não identificadas encontradas neste estudo serão possivelmente associadas ao grupo.

Neste trabalho, *D. speciosa* sp. n foi encontrada vivendo nas flores de *T. speciosum* (Sterculiaceae) nas duas áreas estudadas, sendo que na CGAON foi mais abundante. Esta espécie certamente é uma das polinizadoras de cacauí.

A literatura informa que *Drosophila bromelioides*, utiliza o recurso flor de pelo menos 14 espécies de várias famílias de plantas (Brncic, 1983; Heed 1960; Pipkin, 1966). Outras espécies de drosofilídeos têm sido indicadas como polinizadoras. Sakai (2002) identificou *Drosophila aff. bromelioides* e *D. aff. florum* do grupo bromeliae, como polinizadoras de *Aristolochia maxima* (Aristolochiaceae) que é uma planta auto-incompatível e provavelmente atraem seus polinizadores pelo odor de suas flores, estas moscas ocasionalmente utilizam-nas como substrato de oviposição, sendo consideradas por vários autores como generalistas, vivendo em flores de várias espécies de plantas incluindo *Datura* (Solanaceae) e *Ipomea* (Convolvulaceae) (Paterson & Stones, 1952).

3 – Utilização dos recursos florais pelos drosofilídeos:

As flores são consideradas recursos efêmeros, sendo um tipo de substrato temporalmente limitado, dificultando a sua utilização pelos insetos. As espécies de drosófilas antofílicas apresentam características adaptativas relacionadas à floração das plantas (Brncic, 1983). Em se tratando de flores de cacauí, este recurso fica mais limitado, pois o tempo de cada flor que se abre, dura em torno de 24 horas e a “janela de oviposição” dos drosofilídeos tende a se enquadrar neste tempo. Alguns drosofilídeos levaram até 13 dias para emergirem destas flores e a maioria dos espécimes de *D. speciosa* sp. n levaram entre 8 e 10 dias. Lembrando que o processo de desenvolvimento destes insetos só se concluem quando as flores são não-polinizadas e eliminadas pela planta. No laboratório a espécie *D. speciosa* sp. n vem sendo criada a um tempo médio de desenvolvimento em torno de 7 dias (observação pessoal).

Os drosofilídeos desenvolvem-se em variados tipos de substrato, neste trabalho foi observado o desenvolvimento destes insetos em flores vivas e algumas emergindo de flores em decomposição. As espécies *D. melanogaster* e *D. polymorpha* foram encontradas emergindo somente de flores em decomposição. Estas espécies são saprófitas generalistas e

necessitam dos microorganismos (leveduras e bactérias) existentes neste tipo de substrato para sobreviverem (Carson, 1971). Este também é o caso de *D. malerkotliana*, uma espécie invasora do grupo melanogaster, cujo fato de um único indivíduo ter sido encontrado emergindo de flores vivas é ocasional e reforça a idéia de que a mesma utiliza variados recursos para sua sobrevivência. *D. speciosa* sp. n foi encontrada emergindo tanto de flores vivas como em decomposição e provavelmente está utilizando o pólen e exsudatos florais como recursos alimentares. Os drosofilídeos em sua maioria foram encontrados emergindo das flores novas, corroborando com a idéia de que são atraídos pelos recursos florais produzidos para atrair polinizadores.

O grau de especificidade na utilização de recursos florais ainda não está completamente esclarecido para muitas espécies de drosofilídeos, mas as moscas que compartilham deste substrato apresentam uma série de características adaptativas, relacionadas ao curto espaço de tempo em que estes recursos estão disponíveis como fonte nutricional (Brncic, 1983). Drosofilídeos que utilizam flores como substrato apresentam características adaptativas necessárias para oviposição neste substrato, como o grupo flavopilosa que apresenta cerdas modificadas nas placas do ovipositor que se assemelham a fortes espinhos. Wheeler et al. (1962) sugerem que estas cerdas são relacionadas com hábitos reprodutivos e alimentares. A maioria dos drosofilídeos associada às flores de cacauí apresentaram estas características.

Val & Marques (1996) observaram estas cerdas, como também larvas provavelmente conectadas ao tronco traqueal abdominal principal (sic) das fêmeas de *Drosophila aguape*. Segundo estes autores larviparidade é comum em moscas que utilizam flores durante o desenvolvimento larval, e deve ser uma característica adaptativa para utilização destes recursos efêmeros. Como *D. speciosa* sp. n apresentou cerdas modificadas nas placas do ovipositor e utiliza as flores de cacauí para alimentação e oviposição, é provável que estas sejam também características adaptativas para o uso deste recurso. Nos últimos anos, diversos trabalhos mostram a necessidade de se estudar os recursos utilizados por drosofilídeos, para entender melhor a estrutura populacional de diferentes espécies (Shorrocks, 1982). Este trabalho é um indicativo de que há grande diversidade de drosofilídeos e de interações que ainda precisam ser estudadas, como as 21 espécies encontradas neste trabalho, ainda não determinadas, e que de alguma forma utilizam flores de cacauí como recurso para sua sobrevivência.

4 – Similaridade e diversidade da guilda de polinizadores entre as áreas de preservação:

Pela abundância, comportamento nas flores e coincidência nos horário de receptividade, características morfológicas necessárias para carreamento de pólen e tamanho apropriado para penetração nas flores de cacauí, fica claro que os drosofilídeos são os principais polinizadores de *T. speciosum*. Portanto é de fundamental importância comparar estas guildas entre os locais de preservação para buscar compreender as mudanças de padrão observado e a possível consequência sobre a polinização, reprodução e conservação de *T. speciosum*.

Levando em consideração que o esforço amostral na área da ECFPn foi menor, devido a problemas na localização das árvores com flores nas visitas a campo, mesmo assim este local apresentou maior diversidade ($H' = 2,8$) de drosofilídeos e pouca similaridade, apenas quatro espécies em comum, com a área de preservação *ex situ*.

Em habitats naturais, a manutenção da diversidade e das funções ecológicas propiciam benefícios para o ambiente, enquanto que em locais alterados, a tendência é a diminuição desta diversidade, interferindo nos processos ecológicos que envolvem principalmente as interações entre animais e planta, podendo levar à diminuição ou até mesmo à perda da espécie polinizada. Neste trabalho foi analisada a polinização da espécie *T. speciosum* e observou-se que apesar da drástica alteração na composição da guilda de polinizadores não houve comprometimento na sua polinização, provavelmente devido à presença comum de *D. speciosa* sp. n em ambas as áreas, mas há indícios de que o processo de dispersão dos frutos pode estar comprometido o que leva a crer que no futuro, o processo de polinização também poderá vir a ser prejudicado.

V. CONCLUSÕES

1. A fenologia de *Theobroma speciosum* seguiu o padrão geral das plantas de sub-bosque de uma área tropical e não apresentou diferenças importantes entre as populações estudadas. Foi notável a ausência de elementos jovens e subadultos na população de *T. speciosum* da área de preservação *ex situ*, isto mostra falha no “turn over” populacional, demonstrando fragilidade no sistema estabelecido.
2. As inflorescências de *T. speciosum* são utilizadas por uma grande diversidade de invertebrados. A ocorrência de vários estágios florais, numa só inflorescência, amplifica sua utilização por estes organismos com finalidades diversas: alimentação, abrigo e local de reprodução.
3. Os visitantes das flores de *T. speciosum* podem ser classificados da seguinte maneira: oportunistas, que se alimentam de pólen e/ou tecidos vegetais como os trips, cecidomiídeos, curculionídeos, nitidulídeos, vespídeos, apídeos e formicídeos; os predadores de outros insetos como os estafilínídeos e vespídeos; e os polinizadores que utilizam as flores como fonte alimentar e acabam polinizando-as como os forídeos e drosofilídeos.
4. Drosofilídeos são indicados como polinizadores de *T. speciosum*, com a possibilidade da participação de alguns forídeos.
5. *T. speciosum* pode ser considerado uma nova planta hospedeira para drosofilídeos antofílicos.
6. *D. speciosa* sp. n., reconhecida a partir deste trabalho, é indicada como uma das espécies polinizadoras de cacauí. O benefício para o adulto pela recompensa do pólen ou outras substâncias florais, ficou bem estabelecido. A vantagem reprodutiva parece ser um benefício adicional, mas que precisa ser melhor elucidado já que as fêmeas só terão sucesso reprodutivo em flores não polinizadas.
7. A diferença na composição faunística da guilda de polinizadores das flores de cacauí nas duas áreas analisadas é evidente. Na área de preservação *ex situ* além da menor diversidade, observou-se espécies de drosofilídeos que não estão relacionadas à flores, são moscas oportunistas e algumas invasoras, isso mostra a perda da diversidade e o prejuízo das alterações do ambiente em relação à área de preservação *in situ*.
8. A guilda de drosofilídeos foi considerada mais diversa na área de preservação *in situ*, sendo predominantemente composta de espécies mais especializadas no uso de flores.
9. Quatro espécies foram comuns às duas áreas de preservação, dentre elas *D. speciosa* sp. n., que tornou-se dominante na área de preservação *ex situ*.
10. O sucesso de estratégias de preservação dependem de um planejamento que leve em consideração todos os organismos que fazem parte do sistema de vida da planta, como: os predadores, parasitas, polinizadores e dispersores de sementes. Mantendo os processos ecológicos essenciais para a manutenção da diversidade genética. No caso em estudo o sistema de polinização, apesar de profundamente alterado ainda apresenta sinais de viabilidade, o mesmo talvez não possa ser dito em relação à dispersão e recrutamento que deveriam ser objeto de novos estudos.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDISON, G. & TAVARES, R. Observações sobre as espécies do gênero *Theobroma* que ocorrem na Amazônia. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte**, Belém, n. 25, 1951.
- ALMEIDA, C. M. V. C. Aspectos ecológicos e evolutivos do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) da Amazônia Brasileira. **Antrópica** n. 8, v. 1, p. 1-14, 1996.
- ALMEIDA, S. S. Diversidade Florística de uma comunidade arbórea na Estação Científica Ferreira Penna, em Caxiuanã (Pará). **Boletim do Museu Paraense Emílio Göeldi - Botânica**, n. 1, v. 9, p. 93-128, 1993.
- BAUM, D. A. The comparative pollination and floral biology of baobabs (*Adansonia-Bombacaceae*). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, n.2, v. 82, 1995.
- BRNCIC, D. Ecology of flower breeding *Drosophila*. p. 333-382. In: M. Ashburner; H. L. Carson, H. L. & J. N. Thompson, Jr. (eds.), **The Genetics and Biology of *Drosophila***, Nova Iorque, Academic, v. 3d., 1983.
- CARSON, H. L. **The ecology of *Drosophila* breeding sites**. In: "Harold L. Lyon Arboretum Lecture" 2:1-27, Honolulu, University of Hawaii, 1971.
- CUATRECASAS, J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contribution from the United States National Herbarium**, v. 35, p.379-614, 1964.
- DIDHAM, R.K.; GHAZOUL, J.; STORK, N. E. & DAVIS, A J. Insects in fragmented forests: a functional approach tree. **Elsevier Science**, v. 11, n. 6, 1996.
- DUCKE, A. As espécies brasileiras do gênero *Theobroma* L. **Boletim técnico**, n. 8, 89p, 1953.
- ENDRESS, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge Tropical Biology series, 511p, 1994.
- JEFFRIES, M. **Biodiversity and Conservation**. USA: Routledge, 208p, 1997.
- HEED, W. B.; CARSON, H. L. & CARSON, M. S. A list of flowers utilized by drosophilids in the Bogotá region of Colombia. ***Drosophila* Information Service** v. 34, p. 84-85, 1960.
- KIRK, W. D. J. Pollen-feeding in thrips (Insecta: Thysanoptera). **Journal Zoological**, v. 204, p. 107-117, 1984.
- LACHAISE, D. & TSACA, L. Breeding sites in tropical African *Drosophilids*. In: ASHBURNER, M. **The genetics and biology of *Drosophila***. v. 3d., p. 221-332, London: Academic Press, 1983.
- LACHAISE, D.; TSACAS, L. & COUTURIER, G. The *Drosophilidae* associated with tropical African figs. **Evolution** v. 36, p. 141-151, 1982.
- LISBOA, P. L. & FERRAZ, M. das G. Estação Científica Ferreira Penna. **Ciência e Desenvolvimento Sustentável na Amazônia**. Belém:MPEG, 151p, 1999.
- MALLET, J. The genetics of biological diversity: from varieties to species. In: GASTON, K. J. **Biodiversity. A biology of numbers and difference**. Oxford: Blackwell Science, p. 13-53, 1996.

GLOWKA, L. **A guide to the convention on Biological diversity**, IUCN. Gland and Cambridge, 1994.

OHANA, F. M.; BRABO, L. B. & VENTURIERI, G. A. Ecologia da polinização de cacauí (*Theobroma speciosum*). Projeto: Biologia aplicada a domesticação de fruteiras amazônicas do gênero *Theobroma*. In: **Primeiro relatório**. Belém, 105p, 1998.

OKADA, T. The oriental drosophilids breeding in flowers. **Kontyû**, Tokio, v. 43, n.3, p. 356-363, 1975.

PATTERSON, J. T. & STONE, W. S. Evolution in the genus *Drosophila*., **MacMillan**, Nova Iorque, 1952

PIRES-O'BRIEN, M. J. Phenology of tropical trees from Jari, lower Amazon, II. Influence of genetics and the environment. **Boletim do Museu Paraense Emílio Göeldi - Botânica**, v. 10, n. 1, p. 57-67, 1994.

POSNETTE, A. F. Pollination of cacao in Trinidad. **Tropical Agriculture** v. 21, p. 116-118, 1944.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & CURTIS, H. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara, 724p, 1978.

SAKAI, S. *Aristolochia* spp. (Aristolochiaceae) pollinated by flies breeding on decomposing flowers in Panama. **American Journal of Botany** v. 89, n. 3, p. 527-534, 2002.

SHORROCKS, B. The breeding sites of temperate woodland *Drosophila*, p. 385-428. In: M. Ashburner; H. L. Carson & J. N. Thompson, Jr. (eds.), **The Genetics and Biology of Drosophila**, v. 3b. Nova Iorque, Academic, 1982.

SOUZA, M. S. de & VENTURIERI, G.A. Floral phenology and breeding system of cacauhy (*Theobroma speciosum* Willdenow – Sterculiaceae). Projeto: Biologia aplicada a domesticação de fruteiras amazônicas do gênero *Theobroma*. In: **Primeiro relatório**. Belém, 105p, 1998.

SOULE, M. E. **Conservation biology: The science of searcity and diversity**. Sunderland: Sinauer Associates, 584p, 1986.

SPELLERBERG, I. F. **Conservation biology**. England: Longman group limited, 242p., 1997.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. & PERES C. A. Effects of habitat fragmentation on plant guild struture in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biological Conservation** v.91, p. 119-127, 1999.

VAL, F. C. & MARQUES, M. D. Drosophilidae (Diptera) from the Pantanal of Mato Grosso (Brazil), with the description of a new species belonging to the *bromeliae* group of the genus *Drosophila*. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 39, n. 11, p. 223-230, 1996.

VENTURIERI, G. C., MAUÉS, M. M. & MIYANAGA, R. Polinização do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*, Sterculiaceae): Um caso de cantarofilia em uma fruteira amazônica. **Seminário Internacional sobre pimenta do reino e cupuaçu**, Belém, Pará. Anais: EMBRAPA Amazônia Oriental/JICA , 440p, 1997.

VENTURIERI, G. A. & SILVA, M. B. Fenologia floral do cacau-jacaré (*Herrania mariaae* - Sterculiaceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Göeldi - Botânica**, v. 13, n. 1, p. 31-47, 1995.

VENTURIERI, G. A. **Floral biology of cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann)**. PhD Thesis, Univ. of Reading, UK, 211p, 1994.

VILELA, C. R. & PEREIRA, M. A. Q. R. Breeding sites of neotropical Drosophilidae (Diptera). I. Living flowers of *Cestrum schlechtendalii* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Entomologia** v. 36, n. 2, p. 475-482, 1992.

WHEELER, M. R.; TAKADA, H & BRNCIC, D. The *flavopilosa* species group of *Drosophila*. **The University of Texas Publication** v. 6205, p. 395-413, 1962.

WILSON, E. O. **Diversidade da vida**. São Paulo: Schwarcz, 447 p, 1994.

YOUNG, A M. Mechanism of pollination by Phoridae (Diptera) in some *Herrania* species (Sterculiaceae) in Costa Rica. **Proc. Entomol. Soc. Wash.** v.86, n. 3, p. 503-518, 1984.

YOUNG, A. M.; SCHALLER, M. & STRAND, M. A. Floral nectaries and trichomes in relation to pollination in some species of *Theobroma* and *Herrania* (Sterculiaceae). **American Journal of Botany**, v.71, p. 466-480, 1984.

HIBRIDIZAÇÃO ENTRE CUPUAÇU (*T. GRANDIFLORUM*) e CACAU (*THEOBROMA CACAO*) - STERCULIACEAE UTILIZANDO MISTURA DE PÓLEN¹.

Giorgini Augusto Venturieri²
Giorgio Cristino Venturieri³

RESUMO: cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Wild. ex Spreng.) Schum) e o Cacau (*Theobroma cacao* L.) são duas espécies amazônicas de grande importância econômica. Devido ao intenso ataque, em ambas as espécies, da doença Vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e outros patógenos que diminuem a produtividade, faz-se necessária a busca por variedades resistentes. A formação de híbridos através de polinizações controladas entre estas duas espécies tem sido uma estratégia utilizada para transferir genes de resistência entre elas. Trabalhos anteriores em que foi tentada a hibridação entre cupuaçu e cacau, sugerem que o aborto de frutos híbridos tenha sido devido ao baixo número de sementes que eram insuficientes para manter o desenvolvimento do fruto até a sua maturidade. Sugerem ainda que um maior número de sementes "acessórias" poderia ser conseguido com a adição de pólen compatível em mistura com o pólen da espécie a hibridar. No presente trabalho, flores de cupuaçu (duas plantas) tiveram seus estigmas polinizados com pólen de cacau em mistura com o pólen de cupuaçu comprovadamente compatível, mas não houve pegamento dos frutos. O experimento indicou que a adição do pólen de cacau ao pólen compatível de cupuaçu dificultou o pegamento, sugerindo que o sistema de incompatibilidade em ambas as espécies tenham as mesmas bases fisiológicas.

Palavras chaves: Hibridação interespecífica; polinização artificial; polinização manual

¹ Estudos financiados pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq)/ Programa do Trópico Úmido (PTU) (proc. n.º 46.99915/00-5)

² Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC/CCB-BEG, 88.040-900, Florianópolis - SC, Brasil. e-mail: giorgini@ccb.ufsc.br

³ Embrapa Amazônia Oriental, Caixa. Postal 48, CEP: 66.017-970, Belém, PA, giorgio@cpatu.embrapa.br.

I - INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), são duas espécies economicamente importantes para a região Amazônica. O cacau, por ser a base da indústria chocolateira, possui importância econômica mundial. O cupuaçu, além de possuir importância regional, começa a ser exportado e participar de um seleto mercado de frutas exóticas tropicais. Atualmente, sua polpa é basicamente usada na fabricação de sorvetes, sucos e geleias, além de uma infinidade de doces caseiros. As sementes já vem sendo usadas na fabricação de um produto análogo ao chocolate (Venturieri & Aguiar, 1988).

A produção de cacau vem declinando devido ao ataque de doenças. As principais são a “vassoura-de-bruxa” (*Crinipellis perniciosa*) na América do Sul e o “inchaço-dos-brotos” (“swollen shoot”), de origem virótica, na África (Addisson & Tavares, 1951 e 1952; Martinson., 1966). Devido a esta queda de produção, buscam-se alternativas para a melhoria da quantidade e qualidade das amêndoas. Uma possível alternativa consiste na realização de cruzamentos interespecíficos entre estas duas espécies de *Theobroma*, para a obtenção de híbridos viáveis que apresentem resistência às doenças mencionadas.

Híbridos entre cacau e cupuaçu foram obtidos anteriormente (ver revisão em Barbosa & Venturieri, 2003). Brabo *et al.* (1999) sugere que o crescimento dos frutos híbridos estaria sendo comprometido pelo baixo número de sementes. Para a solução do problema, sugeriu que o pólen de parentais de cacau compatíveis devessem ser usados em mistura com o de cupuaçu. Híbridos entre cacau e cupuaçu aplicando as sugestões feitas pela referida autora foram feitos por Barbosa & Venturieri (2003) que conseguiram um maior número de sementes por frutos que Brabo *et al.* (1999) mais ainda insuficientes para assegurarem o seu desenvolvimento até a maturidade. No presente trabalho é avaliado o pegamento de frutos de cupuaçu polinizados com mistura de pólen compatível de cupuaçu em mistura com pólen de cacau ou seja uma versão recíproca da tentativa de hibridação feita por Barbosa & Venturieri (2003).

II - MATERIAL E MÉTODOS

Os cruzamentos foram feitos entre dezembro/2000 a janeiro/2001, em plantas com no mínimo 11 anos de idade, localizadas na residência do Sr. Heráclito Martins Ribeiro Jr. na cidade de Silva Jardim - RJ.

a) Teste de compatibilidade entre parentais:

Uma série de polinizações controladas, envolvendo três espécimens de cupuaçu (Gr1; Gr2 e Gr 3), e dois espécimens de cacau (Ca1 e Ca2) foi feita avaliar a compatibilidade entre os parentais dentro de cada espécie. Para cada par de cruzamento foram feitas 14 polinizações. Como parâmetro de avaliação observou-se o pegamento dos frutos após 14 dias das flores polinizadas, ou seja frutos efetivamente pegos e que estivessem em pleno desenvolvimento.

b) Cruzamentos com mistura de pólen:

Uma vez definida as árvores compatíveis de cupuaçuzeiros, nova série de polinizações foi efetivada com o pólen compatível em mistura com o pólen de cacau. As polinizações foram feitas durante o período de maior receptividade da espécie recebedora de pólen - manhã para o cacau (Free, 1993) e a tarde para o cupuaçu (Venturieri, 1994). As polinizações foram efetivadas nos moldes propostos por Venturieri & Ribeiro Filho (1995) ou seja, foram retiradas de duas a três sépalas e a parte superior de alguns estaminódios até que o gineceu ficasse exposto. Em seguida foi extraída a cogula (parte da pétala em forma de capuz típico das flores do gênero *Theobroma*) da flor de cacau ou cupuaçu para que o estame com as anteras ficasse exposto. As polinizações foram feitas com o cuidado para que a antera contendo os grãos de pólen não fosse tocada. Uma vez retirado o estame, este era levado até a flor receptora de pólen e suas anteras passadas debaixo para cima sobre os braços estigmáticos a fim de que se depositasse uma quantidade suficiente de grãos de pólen.

No caso das polinizações com mistura de pólen, foi realizada primeiramente a cobertura do pistilo da flor de cupuaçu com pólen compatível da mesma espécie e em seguida repetido o processo com pólen da flor de cacau.

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

As polinizações efetivadas estão sumarizadas na tabela 1. Uma das plantas de cacau testadas (Ca1) era auto- incompatível e intercompatível com a Ca2. A outra planta (Ca2) não pode ser autopolinizada por falta de flores. As plantas de cupuaçu eram todas auto- incompatíveis mas intercompatíveis em diferentes níveis, sendo as que mostram maior número de frutos pegos foram a ♀Gr1 x ♂Gr2 e a ♀Gr3 x ♂Gr2. Por isso usadas em novos cruzamentos, acrescido do pólen de cacau da planta Ca1. Como resultado não houve pegamento de frutos, ou seja a adição do pólen de cacau inviabilizou o pegamento dos frutos anteriormente conseguidos sem a mistura. O cruzamento em mistura de pólen da planta Ca2 combinado com pólen de Gr1 ou Gr2 ou Gr3 sobre o pistilo da Ca1 (já conhecida como incompatível com Ca1) também não gerou fruto. O insucesso em ambas as misturas sugere que o sistema de incompatibilidade em ambas as espécies sejam análogos e que a incompatibilidade da planta feminina, com pelo menos um dos componente da mistura de pólen, seja suficiente para inviabilizar o pegamento do fruto.

III - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ADDISON, G. O'N. & TAVARES, R. M. 1951. Observações sobre as espécies do gênero *Theobroma* que ocorrem na Amazônia. Bol. Tec. do Inst. Agron. do Norte. 25: 1-41.
- ADDISON, G. O'N. & TAVARES, R. M. 1952. Hybridation and grafting in species of *Theobroma* which occur in Amazonia. Evolution 6: 380-386.
- BRABO, L. B.; VENTURIERI, G.A.; POTIGUARA, R.V. 1999. Hibridização entre cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Wild. Ex Spreng) Schum), através de polinização artificial. In: Venturieri, G. A. e colaboradores. Biologia Aplicada à Domesticação de Fruteiras Amazônicas do Gênero *Theobroma* - Segundo Relatório, CNPq/Programa de Trópico Úmido - PUT. 79 pag. datil. Belém, PA.
- BARBOSA, G. VENTURIERI, G.A. Hibridização entre cacau (*Theobroma cacao*) e o cupuaçu (*T. grandiflorum*) - Sterculiaceae utilizando mistura de pólen. In: Venturieri, G. C. e colaboradores. Biologia Aplicada ao uso Econômico do Gênero *Theobroma* - Relatório, CNPq/Programa de Trópico Úmido - PUT. ... pag. datil. Belém, PA.
- FREE, J. B. 1993. **Insect pollination of crops** (2nd ed.), 684 p. Academic Press, London.
- MARTINSON, V.A. 1966. Hybridization of Cacao and *Theobroma grandiflorum*. **The Journal of heredity** 57: 134-136.

- VENTURIERI, G. A. 1994. Floral biology of cupuassu (*Theobroma grandiflorum* (Willdenow ex Sprengel) Schumann). **Ph.D. thesis**, The University of Reading, Reading, UK.
- VENTURIERI, G. A. & AGUIAR, J. P. L. 1988. Composição do chocolate de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Acta Amazônica** 18 (1/2): 3-8.
- VENTURIERI, G. A. & RIBEIRO FILHO, A. A. 1995. A polinização manual do cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* ((Willdenow ex Sprengel) Schumann)]. **Acta Amazônica**. 25(3/4):181-192.

Tabela 1: Cruzamentos envolvendo cupuaçu (*T. grandiflorum*) e cacau (*T. cacao*), usando pólen puro e em mistura. Quando o progenitor feminino era o cacau, as polinizações foram efetuadas pela manhã. Quando era o cupuaçu o progenitor feminino, a tarde.

		masculino								
		Ca1	Ca2	Gr1	Gr2	Gr3	Ca1+Gr2	Ca2+Gr1	Ca2+Gr2	Ca2+Gr3
feminino	Ca1	-----	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----
		-----	-----	-----	-----	-----		-----	-----	-----
	Gr1			-----	++++ - -	++ - - - -	-----			
				-----	-----	-----	-----			
	Gr2			+ - - - - -	- - - - - -	+ - - - - -				
				-----	-----	-----				
	Gr3			+ - - - - -	+++ - - - -	- - - - - -	-----			
				-----	-----	-----	-----			

HIBRIDIZAÇÃO ENTRE CACAU (*THEOBROMA CACAO*) E O CUPUAÇU (*T. GRANDIFLORUM*) - STERCULIACEAE UTILIZANDO MISTURA DE PÓLEN) - II¹.

Gunther Barbosa²
Giorgini Augusto Venturieri³

RESUMO: Cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Wild. ex Spreng.) Schum) são duas espécies amazônicas de grande importância econômica. Devido ao intenso ataque da doença Vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*) e outros patógenos que diminuem a produtividade, faz-se necessária a busca por variedades resistentes. A formação de híbridos através de polinizações controladas entre estas duas espécies foi a estratégia utilizada para transferir genes de resistência entre elas. Flores de cacau tiveram seus estigmas polinizados com pólen de cacau; com pólen de cupuaçu e com uma mistura de pólen de cacau e cupuaçu. Foram utilizadas três árvores de cupuaçu e duas de cacau como doadores de pólen. Como receptores de pólen, foram usadas três árvores de cacau. Foram realizadas ao todo 202 polinizações: 126 com mistura de pólen de cacau e cupuaçu sobre o cacau; 61 exclusivamente de cupuaçu sobre cacau e 15 entre cacau x cacau como controle para o pegamentos e desenvolvimento de frutos. Frutos de cacau com sementes híbridas com *T. grandiflorum* já haviam sido obtidos em trabalhos anteriores, mas foram abortados, atribuído ao baixo número de sementes que continha. O objetivo das polinizações com mistura de pólen foi o de aumentar o número de sementes por fruto para assegurar a sua manutenção evitando o aborto. Entre as polinizações efetuadas, as que receberam pólen puro, todas foram abortadas antes de atingirem 14 dias. As realizadas com mistura de pólen, apresentaram 9 frutos (7,1 %) com mais de 14 dias, mas que também posteriormente abortaram. Destes frutos foram tomados o número de sementes e comprimento, tendo o maior atingido um comprimento de 6,2 cm e 23 sementes. O experimento indicou que havia problema de compatibilidade entre os parentais envolvidos e que a técnica utilizada é eficaz para evitar o aborto dos frutos. Presume-se que, se a mistura de pólen for feita com pólen de cacau previamente conhecido como compatível, poderão ser formados híbrido com relativa facilidade. A utilização de marcadores genéticos para identificar os possíveis híbridos não será necessária, pois a germinação hipógea (característica do cupuaçu dominante sobre o cacau que tem germinação epígea) manifesta-se nos híbridos.

Palavras chaves: *Hibridação interespecífica; polinização artificial; polinização manual*

¹ Estudos financiados pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq)/ Programa do Trópico Úmido (PTU) (proc. n.º 63.00.13/95-0 e 46.99915/00-5)

² Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC/CCA - Pós graduação RGV, 88.040-900, Florianópolis - SC Brasil. e-mail: gunther_cca@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC/CCB-BEG, 88.040-900, Florianópolis - SC, Brasil. e-mail: giorgini@ccb.ufsc.br

I - INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao*) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), são duas espécies economicamente importantes para a região Amazônica. O cacau, por ser a base da indústria chocolateira, possui importância econômica mundial. O cupuaçu, além de possuir importância regional, começa a ser exportado e participar de um seleto mercado de frutas exóticas tropicais. Atualmente, sua polpa é basicamente usada na fabricação de sorvetes, sucos e geleias, além de uma infinidade de doces caseiros. A comercialização do fruto *in natura* e da polpa congelada vem mostrando o crescimento no mercado nacional e internacional (Lima, 1995). A utilização de sementes ainda é insipiente, mas dela pode-se fazer chocolate e extrair uma gordura de alta digestibilidade que pode ser usada na fabricação de margarinas e de cremes para a pele (Berbert, 1981; Venturieri & Aguiar, 1988).

Todas as espécies amazônicas do gênero *Theobroma* produzem frutos comestíveis, cujas sementes pode-se fazer chocolate. Porém, a única cultivada para esse fim é *T. cacao* (Ducke, 1953; Venturieri & Aguiar, 1988).

A produção de cacau vem declinando devido ao ataque de doenças. As principais são a “vassoura-de-bruxa” (*Crinipellis perniciosa*) na América do Sul e o “inchaço-dos-brotos” (“swollen shoot”), de origem virótica, na África (Addison & Tavares, 1951; Martinson, 1966; 1972). Devido a esta queda de produção, buscam-se alternativas para a melhoria da quantidade e qualidade das amêndoas. Uma possível alternativa consiste na realização de cruzamentos interespecíficos entre estas duas espécies de *Theobroma*, para a obtenção de híbridos viáveis que apresentem resistência às doenças mencionadas.

Híbridos entre cacau e cupuaçu foram obtidos anteriormente por Addison & Tavares (1951, 1952), porém as mudas eram frágeis e não ultrapassaram 15 cm de altura. Entretanto, Martinson (1966) relata a obtenção de tal híbrido com plantas que se desenvolveram satisfatoriamente e tinham as seguintes características: cotilédone rosa (semelhante ao do cupuaçu), germinação epigea (como a do cacau), folíolos rosa claro (característica intermediária entre as duas espécies) com margem denteada (como no cupuaçu). Os cotilédones permaneciam fechados durante a germinação e a razão entre o

comprimento e a largura da folha aproximava-se de 48 mm, demonstrando proximidade maior com o cacau nesta característica.

Brabo *et al.* (1999) obteve 6 frutos híbridos de cacau e cupuaçu, usando somente pólen de cupuaçu sem mistura, porém todos estes frutos foram abortados antes de atingirem a maturidade. O fruto maior apresentou 4,1 cm de comprimento e contava com 16 sementes, contrastando com uma média estimada por Cuatrecasas (1964) de aproximadamente 36 sementes por fruto de cacau normal.

Neste trabalho, Brabo *et al.* (1999) sugere que o crescimento dos frutos híbridos estaria sendo comprometido pelo baixo número de sementes. Para a solução do problema, sugeriu que o pólen de parentais de cacau compatíveis devessem ser usados em mistura com o de cupuaçu, para aumentar o número de sementes por fruto para assegurar a continuidade do seu desenvolvimento. No presente estudo é tentada a obtenção de híbridos entre cacau e cupuaçu aplicando as sugestões feitas pela referida autora.

II - MATERIAL E MÉTODOS

a) Seleção dos parentais:

Uma série de polinizações controladas, envolvendo diversos pares da mesma espécie conseguidos entre 7 árvores diferentes/espécie, foi feita para selecionar os parentais mais compatíveis dentro de cada espécie. Como parâmetro de avaliação observou-se o período de abscisão das flores e o pegamento dos frutos. Como pegamento, entende-se toda a polinização que tenha gerado fruto.

Esta pré seleção foi feita por ter-se a expectativa de que os grãos de pólen compatíveis, quando em mistura com os da espécie a hibridar, serviriam para gerar "sementes acessórias" que assegurariam o desenvolvimento do fruto até a sua maturidade e com eles, as eventuais sementes híbridas. Desta avaliação preliminar, foram selecionadas, como parentais masculinos para doadores de pólen, três árvores de cupuaçu oriundas, do "Experimento de Consorciação entre Seringueiras e Cupuaçu" localizadas na Faculdade de Ciências Agrárias - FCAP, e duas árvores de cacau localizadas no "Cacau do Casemiro", do Campus da Universidade Federal do Pará. As árvores de cupuaçu foram identificadas como **gr1**, **gr2** e **gr5**, e as de cacau identificadas como **ca4**, **ca6** e **ca7**. Estas árvores foram selecionadas por terem apresentado, na média, o maior tempo que conseguiram permanecer com os frutos na árvore, embora em nenhuma delas tenha sido conseguido fruto maduro.

Usando apenas estes parentais, sempre que possível, foram feitas polinizações envolvendo mistura de pólen da espécie a hibridar com alopólen da espécie materna.

b) Cruzamentos:

Três tratamentos foram realizados, onde observaram-se as diferentes taxas de pegamento e desenvolvimento dos frutos. O primeiro tratamento consistiu unicamente da polinização manual entre cacau x cacau, onde o produto resultante serviu como testemunha para os demais cruzamentos; o segundo, consistiu na transferência simultânea de pólen de cacau + cupuaçu x cacau; e o terceiro tratamento consistiu na polinização simples de cupuaçu x cacau. Este último tratamento, teve como objetivo, além da obtenção de sementes híbridas, o servir como testemunha para os cruzamentos com mistura de pólen e repetir a metodologia empregada nos experimentos de Brabo *et al.* (1999), Martinson (1966) e Addison & Tavares (1951, 1952). Todos os tratamentos foram realizados simultaneamente em cada uma das três árvores de cacau.

Foram realizadas 202 polinizações aleatórias observando-se pegamentos e período de abscisão após 24, 48, 72 e mais de 72 horas, juntamente com os frutos que apresentaram desenvolvimento por período igual ou superior a 14 dias. Foram polinizadas flores de cacau em pré antese, ou seja, botões que não apresentavam abertura total, seguindo os

moldes propostos por Venturieri & Ribeiro Filho (1995). Foram retiradas de duas a três sépalas e a parte superior de alguns estaminódios até que o gineceu ficasse exposto. Em seguida foi extraída a cogula (parte da pétala em forma de cápuz típico das flores do gênero *Theobroma*) da flor de cacau ou cupuaçu para que o estames com as anteras ficassem expostos. As polinizações foram feitas com o cuidado para que a antera, contendo os grãos de pólen, não fosse tocada. Uma vez retirado o estame, este era levado até a flor receptora de pólen e passado debaixo para cima sobre os braços estigmáticos a fim de que se depositasse uma quantidade suficiente de grãos de pólen.

No caso das polinizações com mistura de pólen, foi realizada primeiramente a cobertura do pistilo da flor de cacau com pólen da flor de cupuaçu e logo em seguida foi repetido o processo com pólen da flor de cacau.

c) Manejo:

Adubação do cacaueiro: Para o prolongamento do período floral, as árvores do "Cacaual do Casemiro" foram adubadas com NPK + micronutrientes (Yorim). O fertilizante foi aplicado em cobertura na projeção da copa em quantidades que variaram de 950 a 1450g proporcional ao porte da árvore .

Controle das saúvas: Para combate da saúva (*Atta sexeden*), foi utilizada a isca granulada Mirex-S, tendo como base o N-etil perfluorooctano sulfonamida (Sulfluramida 70/30). Este controle se fez necessário porque tais insetos predavam as flores, comiam as etiquetas e as linhas de marcação usadas.

d. Contagem das sementes:

Com auxílio de uma pinça e estilete sob uma lupa estereoscópica os frutos abortados tiveram as suas sementes previamente separadas da placenta e depois contadas.

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Polinizações, Pegamentos e Abscissões:

a) Cruzamentos Cacau x Cacau:

Dos 15 cruzamentos realizados (tabela 1) nenhum fruto atingiu a maturidade, embora tenham sido observados frutos derivados de polinização aberta, o que atesta a fecundidade nas árvores. Logo, os parentais escolhidos eram incompatíveis.

Tabela 1: Período médio de abscisão das flores provenientes de cruzamentos cacau x cacau.

Cacau x cacau	Total	Abscisão 24 horas	Abscisão 48 horas	Abscisão 72 horas	Abscisão +72 horas	14 dias ou mais
N.º	15	1	6	8	0	0
%	100	6,66	40	53,33	0	0

b) Cruzamentos Cacau x Cupuaçu:

Dos 61 cruzamentos realizados, ou as flores sofreram abscisão ou os frutos degeneraram-se antes de 14 dias com estágio de desenvolvimento insuficiente para se fazer a contagem das sementes ou tentar-se a germinação (tabela 2).

Tabela 2: Período médio de abscisão das flores de cacau polinizadas com pólen de cupuaçu.

Cacau x cupuaçu	Total	Abscisão 24 horas	Abscisão 48 horas	Abscisão 72 horas	Abscisão +72 horas	14 dias ou mais
N.º	61	18	10	19	14	0
%	100	29,5	16,39	31,15	22,95	0

Cruzamentos Cacau x Cupuaçu + Cacau:

Dos tratamentos efetuados foi o que melhores resultados apresentou. Foram obtidos 9 frutos com mais de 14 dias provenientes de 126 cruzamentos com o maior período de permanência na planta (tabela 3), mas todos degeneraram-se sem atingir a maturidade. O comprimento e número de sementes estão dispostos na tabela 4.

Tabela 3: Período de abscisão das flores de cacau polinizadas com mistura de pólen.

Cacau + cupuaçu x cacau	Total	Abscisão 24 horas	Abscisão 48 horas	Abscisão 72 horas	Abscisão +72 horas	14 dias ou mais
N.º	126	40	29	26	22	9
%	100	31,74	23,02	20,65	17,46	7,14

Tabela 4: Dados biométricos dos frutos com abscisão após o período de 14 dias.

Parentais:	Comprimento (mm)	N.º de sementes
ca 6 x gr1+ ca 7	14,5	5
ca 6 x gr2+ ca 4	29,4	11
ca 6 x gr2+ ca 4	29,7	14
ca 6 x gr2+ ca 4	26,2	20
ca 6 x gr5+ ca 4	33,4	25
ca 7 x gr1+ ca4	18,6	15
ca 7 x gr1+ ca4	26,5	16
ca 7 x gr1+ ca 4	20,6	15
ca 7 x gr2+ ca 4	61,9	23
Médias	29	16

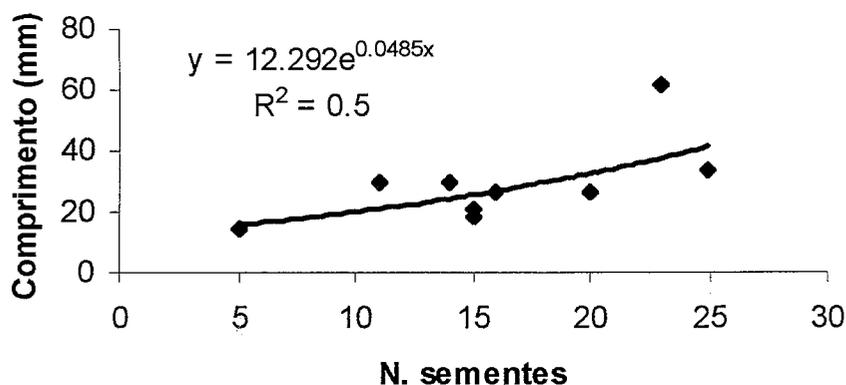


Figura 3: Relação entre o número de sementes e o tamanho do frutos obtidos com mistura de auto e alopólem.

Neste tratamento, embora tendo-se obtido uma média de 16 sementes/fruto; máx. 25; min. 5, e este tenha sido consideravelmente superior ao obtido por Brabo *et al.* (1999) através da simples hibridação de cacau x cupuaçu, (média 4,4 sementes/fruto; máx. 16, min. 2), ainda não foi atingido o número mínimo necessário para assegurar o pegamento dos frutos (sugerido por Brabo *et al.* para o cacau como mãe como entre 35 a 40 sementes).

Assim como observado por Brabo *et al.* (1999), o tamanho dos frutos obtidos é diretamente proporcional ao número de sementes que continham (figura 3), corroborando a hipótese de que, para serem obtidos frutos maiores capazes de chegarem a maturidade, um maior número de semente por fruto deverá ser provocado. Esta constatação aumenta as expectativas de se obter sucesso nos cruzamentos usando mistura de pólen de cacau e cupuaçu e que tal expectativa poderá ser maior se o pólen de cacau usado na mistura for realmente de variedades compatíveis entre si, o que não ocorreu no presente trabalho. Para novos trabalhos, sugere-se fazer novos cruzamentos com mistura de pólen, em que os parentais da mesma espécie sejam necessariamente compatíveis.

III - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ADDISON, G. O'N. & TAVARES, R. M. 1951. Observações sobre as espécies do gênero *Theobroma* que ocorrem na Amazônia. Bol. Tec. do Inst. Agron. do Norte. 25: 1-41.
- ADDISON, G. O'N. & TAVARES, R. M. 1952. Hybridation and grafting in species of *Theobroma* which occur in Amazonia. Evolution 6: 380-386.
- BERBERT, P. F. R. 1981. Determinação do teor, ácidos graxos e características físicas das gorduras das sementes de *Theobroma grandiflorum* L. e do *Theobroma bicolor* L. e comparação com a gordura do *Theobroma cacao* L., **Revista Theobroma** 11(2):91-98.
- BRABO, L. B.; VENTURIERI, G.A.; POTIGUARA, R.V. 1999. Hibridização entre cacau (*Theobroma cacao* L.) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Wild. Ex Spreng) Schum), através de polinização artificial. In: Venturieri, G. A. e colaboradores. Biologia Aplicada à Domesticação de Fruteiras Amazônicas do Gênero *Theobroma* - Segundo Relatório, CNPq/Programa de Trópico Úmido - PUT. 79 pag. datil. Belém, PA.
- CUATRECASAS, J. 1964. **Cacao and its alliens: a taxonomic revision of the genus *Theobroma***. Contribution from the United States National Herbarium 35: 379-614.
- DUCKE, A. 1953. As espécies brasileiras do gênero *Theobroma*. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte. n° . 28**, Belém, p. 1-89.
- LIMA, H. C. Informe sobre a Amazônia Ocidental do Brasil. In: Memórias de la Mesa Redonda sobre microempresas agroindustriales como factor de desarrollo sostenible de la region amazonica. 1995.- **Tratado de Cooperacion Amazonica (TCA)**. - Lima/Peru.. p. 83-107.
- MARTINSON, V.A. 1966. Hybridization of Cacao and *Theobroma grandiflorum*. **The Journal of heredity** 57: 134-136.
- MARTINSON, V.A. 1972. Embryological studies on hybridization between *Theobroma Cacao* and *Theobroma grandiflora*. **Canadian Journal of Botany**. 50: 2117-2124.
- VENTURIERI, G. A. & RIBEIRO FILHO, A. A. 1995. A polinização manual do cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* ((Willdenow ex Sprengel) Schumann)]. **Acta Amazônica**. 25(3/4):181-192.

VENTURIERI, G. A. & AGUIAR, J. P. L. 1988. Composição do chocolate de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Acta Amazônica** 18 (1/2): 3-8.

PROTO - EXPERIMENTOS EM CULTURA DE TECIDOS DE ESPÉCIES AMAZÔNICAS DO GÊNERO *THEOBROMA*¹

Giorgini Augusto Venturieri²

Gunther Barbosa³

Fabiano José Pickscius⁴

Giorgio Cristino Venturieri⁵

RESUMO: O cacau e o cupuaçu são espécies afins pertencentes ao gênero *Theobroma* e de interesse comercial, a primeira ao nível mundial e a segunda ao nível regional. A tentativa de hibridação entre espécies é uma estratégia reconhecida para o agrupamento de características de interesse agrônomo em novas variedades. No gênero *Theobroma* poderia vir a ser útil na melhoria da qualidade da amêndoa, quantidade de polpa e resistência à doença (como a “Vassoura de Bruxa” (*Crinipellis perniciosa*)). No presente trabalho são relatados proto-experimentos executados para gerarem indicadores de como proceder para com as técnicas de biotecnologia que culminassem em protocolos para: desinfecção de tecidos que pudessem servir de explantes; resgate de embriões e germinação de sementes em condições assépticas de algumas espécies deste gênero. Os explantes retirados de pedúnculos e ramos foram totalmente contaminados. Os retirados das sementes foram contaminados em média 20,7%. Ações auxiliares como tratamento fitossanitário das plantas matrizes e exposição à luz U.V., melhoraram o sistema de desinfecção de explantes de folha. Quando aplicadas, a porcentagem de infecção caiu de 97,5% para 4,7%. O desenvolvimento da parte aérea de alguns embriões resgatados aparenta ser um problema e variável em função da espécie. A retirada da testa da semente abreviou o tempo de germinação mas não influenciou na porcentagem de contaminação.

Palavras-chave: explantes, desinfecção, resgate de embrião, germinação

INTRODUÇÃO

A América tropical possui 22 espécies de *Theobroma*, das quais 8 ocorrem na Amazônia e 7 delas ocorrem no estado do Pará. O gênero foi dividido em 6 seções (*Andropetalum*, *Glossopetalum*, *Oreanthes*, *Rhytidocarpus*, *Telmatocarpus* e *Theobroma*) (CUATRECASAS, 1964). No gênero *Theobroma* há duas espécies importantes economicamente, o cacau (*T. cacao*) do qual as sementes são a base para a indústria de chocolate, e o cupuaçu (*T. grandiflorum*), um fruto bastante usado na região amazônica para a fabricação de doces, sorvetes, sucos e, mais recentemente, chocolate

¹ - Estudos financiados pelo Conselho Nacional de pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq)/ Programa do Trópico Úmido (PTU) (proc. n° 469915/00-5).

² - Professor da Universidade Federal do de Santa Catarina UFSCC/CCB-BEG, Campus de Trindade, 88.040-900. Florianópolis -SC, Brasil.

³ - Instituto Nacional de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais- IBAMA /RN Rua Alexandrino de Alencar, nº1.399 Tirol 59.015-350 - Natal - RN/ Estudante do curso de Mestrado em Recursos Genéticos da Universidade Federal de Santa Catarina -CCA/Recursos Genéticos, Cx. Postal 88.040-900. Florianópolis -SC, Brasil.

⁴ - Alunos do curso de graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Universitário de Trindade, 88.040-900 Florianópolis SC, Brasil. E-mail hvhb@uol.com.br.

⁵ Eng. Agrônomo., D.Sc. da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa. Postal 48, CEP: 66.095-100, Belém, PA, giorgio@cpatu.embrapa.br.

(VENTURIERI, 1993). Com sementes de outras espécies de *Theobroma* (*T. camargoanum*, *T. bicolor*, *T. microcarpum*) também pode-se preparar chocolate, mas não são explorados comercialmente (DUCKE, 1953; LE COINT, 1934; PESCE, 1941).

A Amazônia possui a mais alta biodiversidade do gênero *Theobroma*, o que é muito importante para a criação de híbridos e seleção de novas variedades com rendimentos mais altos e resistência a doenças. O modo mais simples para transferir genes entre espécies é através da hibridização clássica (transferindo grãos de pólen de uma espécie para o estigma de outra). Hibridização entre espécies do gênero *Theobroma* já foi tentada com algum sucesso. Em *Glossopetalum* há 3 espécies (*T. subincanum*, *T. obovatum* e *T. grandiflorum*) que cruzam entre si (ADDISON & TAVARES, 1951). Híbridos entre Seções foram obtidos em 1966 entre *T. grandiflorum* (Seção *Glossopetalum*) e *T. cacao* (Seção *Theobroma*) (MARTINSON, 1966; CRIG NEWSLETTER, 1990); e entre as Seções *Glossopetalum* e *Andropetalum* (*T. angustifolium* x *T. mammosum*; e *T. simiarum* x *T. mammosum*) (CUATRECASAS, 1964). Híbridos adultos entre cacau e cupuaçu foram obtidos na Malásia, que demonstraram aparente resistentes à doença "inchaço dos brotos" (MARTINSON, 1966; CRIG NEWSLETTER, 1990). No Brasil foi experimentado com objetivo semelhante, mas para a doença "Vassoura-de-Bruxa" (*Crinipellis pernicioso*). Embora mudas tenham sido obtidas, elas eram frágeis e raramente passavam de 15 cm (ADDISON & TAVARES, 1951) e não foram encontrados os adultos destes híbridos (SILVA *et al.* - em preparação).

A hibridação entre espécies afins é um fato comum na natureza tendo muitas espécies úteis derivadas deste processo. Quando a hibridação é seguida de poliplidização, a fertilidade usualmente é recuperada. Como exemplos mais conhecidos tem-se o trigo (*Triticum aestivum*) que é um alohexaplóide ($2n = 6x = 42$) derivado do cruzamento das espécies *T. monococcum*, *Aegilops speltoides* e *Aegilops aquarrosa*, e o algodão sul-americano (alotetraplóide $2n = 26$, com genoma de uma espécie asiática (*G. herbaceum*) com uma americana (*G. raimondi* do Peru).

O processo de hibridação interespecífica tem sido bastante explorado com fins agronômicos com inúmeros cultigens já formados. Mais recentemente, ferramentas biotecnológicas, como resgate de embriões híbridos seguido de poliploidizações induzidas e a fusão de protoplastos, tem facilitado a formação de híbridos que antes não foram conseguidos por vias sexuada. No entanto, para se chegar a este ponto, vários protocolos precisam ser desenvolvidos e ajustados. Precisa-se de um processo eficiente de desinfecção dos tecidos que servirão de explantes; protocolos para a geração de calos, cultivos celulares, fusão de protoplastos, regeneração de plântulas a partir destas células e finalmente da sua aclimação *ex vitro*. A averiguação dos genomas obtidos geralmente é mais fácil, mas também desprende uma boa carga de trabalho.

No presente trabalho são relatados proto-experimentos executados para gerarem indicadores de como proceder para com as técnicas de biotecnologia que culminassem em protocolos para: desinfecção de tecidos que pudessem servir de explantes; resgate de embriões e germinação de sementes em condições assépticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedência do material: Frutos completamente desenvolvidos, porém não completamente maduros e ainda portando o pedúnculo e um pedaço de ramo, das espécies: cacau (*T. cacao*; matrizes CA-1, CA -2 e CA -3, procedentes do experimento JICA - competição de progênes); cupuaçu (*T. grandiflorum*; matrizes GR 215; GR 624 e GR 1047, procedentes do experimento JICA - competição de clones) e cacauí (*T. speciosum*

matrizes SEC 31X, SEC 44Z, SEC 48X, procedentes da coleção "Addison O'Neil"). Todas as matrizes estão localizadas na EMBRAPA - Amazonia Oriental em Belém - PA. Os frutos foram coletados em 16/10/2001 e envolvidos em papel jornal, mantidos em sacos plásticos e transportados para Florianópolis - SC. No dia seguinte, os sacos plásticos foram abertos e mantidos à temperatura ambiente dentro de laboratório por 4 dias quando foram então usados.

Proto-experimento 1: Obtenção e desinfecção dos explantes

Frutos com o pedúnculo e pedaços de ramo aderidos a eles foram inicialmente esterilizado por imersão em Etanol 95^oGL (1 min.) seguido de imersão, por 20 minutos, em solução de "Q-boa" a 40% (produto comercial com 2,5% de hipocorito de sódio), mais 3 gotas de detergente de uso doméstico.

As sementes extraídas do fruto foram despulpadas dentro do fluxo laminar e re-imersas em uma nova solução de hipoclorito na mesma concentração e tempo já citados. As sementes foram dissecadas e sub-divididas em tegumento, cotilédone e embrião. Todos os explantes foram enxaguadas 3 vezes em água deionizada estéril por 1 minuto em cada vez.

Os experimentos foram iniciados variando o tipo de explante usado sob um mesmo processo de desinfecção. Os explantes foram: a) Segmentos de casca (exceto cacauí) retirados dos ramos (aprox. 0,3 x 0,5 cm) aderidos a parte do câmbio, b) Segmentos de casca retirado dos pedúnculos (aprox. 0,3 x 0,5 cm) aderidos a parte do câmbio; Segmentos retirados das sementes ou seja c) tegumento (aprox. 0,2 x 0,5 cm), d) cotilédone (aprox. 0,5 x 0,5 cm) e f) embrião (destacado dos cotilédones e cortado longitudinalmente).

Os explantes, foram postos para desenvolver em condições estéreis em meio de cultura LPM (macro, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos do meio) (Von Arnold & Erikson, 1981) acrescido de água de coco (50 ml/l), glucose (20 g/l); 2-4 D (2 mg/l) combinado com BAP nas concentrações de 0; 1 e 2 mg/l x três tipos de tecido (efeito dos hormônios foi avaliado em trabalho relatado a parte). Como gelificante usou-se gelrite a 2,2 g/l. O pH usado foi 5,8 medido antes da autoclavagem. Para cada tratamento, foram utilizados 2 frascos, com capacidade para 500 ml, cada um contendo 40 ml de meio. Em cada frasco foram, colocados 5 explantes (repetições). De cada tecido foram avaliada a contaminação de 100 explantes. As culturas foram mantidas no escuro, em estufa D. B. O. à temperatura de 26 ± 2 °C. No dia 22/11/2001, 33 dias após a colocação nos meios de cultura, o índice de contaminação foi avaliado.

Proto-experimento 2: Desinfecção com luz UV de explantes derivados de folhas de cacau.

Folhas jovens de cacau (já completamente verdes, ainda tenras e próximas de atingirem o seu tamanho máximo) foram colhidas de plantas das progênes derivadas das matrizes CA1, CA2 e CA3 mencionadas anteriormente. Todas as plantas estavam sendo cultivadas em casa de vegetação coberta com plástico leitoso "Northene" com bloqueio de 70% da luz incidente. Imediatamente após a colheita foram esterilizado por imersão em Etanol 96 GL (5 segundos) seguido de imersão, por 10 minutos, em solução de "Q-boa" a 30% (produto comercial com 2,5% de hipocorito de sódio), mais 3 gotas de detergente de uso doméstico. Em seguida foram lavadas em água destilada e autoclavada. Cada folha foi recordada em pedaços de aprox. 1 cm², todos mantendo um pedaço da nervura central. Os explantes foram então colocados em meio de cultura feito com adubo foliar Hyponex (6,5-6-19) 2 g/l, açúcar-de-cana 20 g/l; ágar 6 g/l; peptona 1g/l; carvão ativado 1 g/l e batata liqüefeita 67 g/l com pH de 5,8 medido antes da autoclavagem. Os explantes foram postos

em potes de 500 ml contendo aproximadamente 40 ml de meio. Cada pote recebeu 5 explantes/pote x 15 potes/ tratamento. Metade deles foram expostos a luz U.V. por 15 minutos e a outra metade mantida como testemunha. Sete dias após, foi avaliado o número de explante contaminado por pote. A comparação de médias foi feita pelo teste de *t* de Student usando o pacote estatístico Bioestat 3.0 (Ayres *et al.*, 2003).

Proto-experimento 3: Desinfecção com luz UV de explantes derivados de folhas de cacau e de cupuaçu.

O presente experimento é similar ao anterior, com as seguintes modificações. As Plantas matrizes receberam um tratamento profilático com a aplicação quinzenal do fungicida Dithane (2g/l) combinado a aplicação de inseticida Malathion (2 ml/l). Para os explantes foram usadas, no caso do cacau, as mesmas plantas já citadas. Para o cupuaçu foram usadas plantas derivadas das matrizes GR 1047; GR 624 e GR 215. Todos os explantes, após o corte, foram postos em uma placa de petri com água autoclavada e submetidos a 15 de exposição à luz U.V.. Como agente gelificante do meio, ao invés de usar ágar, usou-se o "gelrite" 2,2 g/l por ser transparente e por isto facilitar a visualização de eventuais contaminações. Os explantes foram postos em tubos de ensaio de 25 x 2,5 cm contendo aproximadamente 12 ml de meio. Cada tubo recebeu 1 explante e foram cultivados em estufa D. B. O. sem luz e com temperatura de 26+/-2 °C. Sete dias após, foi avaliado o número de explantes contaminados. A comparação de médias foi feita pelo teste de Qui-quadrado de contingência (com correção de Yate) usando o pacote estatístico Bioestat 3.0 (Ayres *et al.*, 2003).

Proto-experimento 4: Resgate de embriões

Sementes semi-maduras de cacauí (*T. speciosum*); cacao (*T. cacao*) e de do híbrido (*T. obovatum* x *T. subincanum*;) desinfetadas do modo descrito anteriormente, tiveram os seus cotilédones retirados e os embriões postos em tubos de ensaio com o meio B5 (Ganborg *et al.*, 1989) adicionado de Benzamidine - BA em três concentrações (0; 1e 2 mg/l) em ágar 6,5 g/l e a um pH de 5,8 medido antes da autoclavagem.

Proto-experimento 5: Germinação de sementes in vitro

Com a intenção de avaliar se a manutenção da testa das sementes poderia interferir no processo de germinação na contaminação, sementes da espécie de *T. sylvestre* (N=20) e dos híbridos de *T. obovatum* x *T. subincanum* (N=12) e *T. grandiflorum* X *T. obovatum* (N= 16) foram postas para germinar *in vitro* . Metade das sementes foram postas para germinar com testa e a outra metade sem a testa. A percentagem de germinação foi avaliada no 5^o, 10^o e 15^o dias após o início do experimento. O índice de contaminação foi também avaliado no 5^o dia.

Resultados e Discussões:

Proto-experimento 1: Obtenção e desinfecção dos explantes.

A porcentagem de contaminação por tecido está apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Percentagem de contaminação de explantes de 3 espécies de Theobroma.

Espécie	Tecido do explante	% de contaminação
Cacau	Casca dos ramos	100
	Casca dos pedúnculos	100
	Embrião	15
	Tegumento	20
	Cotilédone	11
Cupuaçu	Casca dos ramos	100
	Casca dos pedúnculos	100
	Embrião	18
	Tegumento	0
	Cotilédone	26
Cacaúí	Casca dos ramos	---
	Casca dos pedúnculos	---
	Embrião	31
	Tegumento	40
	Cotilédone	25
Média por tecido	Casca dos ramos	100
	Casca dos pedúnculos	100
	Embrião	21.33
	Tegumento	20.00
	Cotilédone	20.67
Média dos explantes retirados de sementes		20.67

Os explantes retirados dos ramos e pedúnculos mostraram-se fortemente contaminados com total ineficácia do tratamento aplicado. O tempo que estes tecidos ficaram fora da planta matriz pode ter facilitado o ataque de microorganismos. Outros agravantes, é que estes tecidos são porosos e ficam geralmente cobertos por ritidoma (cacau) e ritidoma e pelos (cupuaçu) que dificulta a penetração uniforme do desinfetante. A clonagem de tecidos somáticos é importante quando se deseja reproduzir as características genéticas de uma matriz. Os ramos e pedúnculos supostamente prestariam bem para este fim, mas limpeza deste material dá indícios de que será difícil. Como alternativa sugere-se o uso de outros tecidos como folhas jovens e brotos, que poderia receber tratamentos profiláticos e proteção até a colheita (testado a seguir para folhas).

Os explantes retirados das sementes foram contaminados em média 20,7% com valores quase que idênticos entre tecidos. Embora seja uma percentagem ainda alta, se for considerado o estresse e tempo de exposição sofrido pelo material, pode-se considerar os índices como razoavelmente bons. Logo, para estes tecidos o sistema de desinfecção foi adequado.

Proto-experimento 2: Desinfecção com luz UV de explantes derivados de folhas de cacau.

A exposição dos explantes à luz U.V., embora tenha diminuído o índice de contaminação, não mostrou-se estatisticamente diferente da testemunha ($p= 0.48$) (figura 1). Em ambos os tratamentos em alguns explantes, parte das bordas, onde foram feitos os cortes, mostraram-se mortas (figura 2), indicando que o tratamento aplicado tenha chegado no limite de tolerância dos tecidos. Mesmo assim, a percentagem de contaminação em ambos os tratamentos foi muito alta mostrando que a busca por novos tratamentos mais eficientes deva ser continuada. Para melhorar o processo, sugere-se expor os explantes à luz U.V. antes de serem inoculados nos meios de cultura e cultivá-los em tubos de ensaio individualmente. Os que estivessem livres de contaminação seriam então aproveitados em experimentos posteriores. Ações auxiliares como tratamento fitossanitário das plantas matrizes, poderia melhorar o sistema desinfecção. Estas sugestões foram aplicadas no proto-experimento seguinte.

Proto-experimento 3: Desinfecção com luz UV de explantes derivados de folhas de cacau e de cupuaçu.

Os dados encontram-se na tabela 2:

Tabela 2: Número de explantes contaminados por espécie. O número de explantes não contaminados foi significativamente superior quando comparado aos contaminados (Qui-quadrado de contingência $p = 0,02$; GL = 1)

Espécie	Explantes	
	Contaminados	Não contaminados
Cacau	9	106
Cupuaçu	0	84
Total	9 (4,7%)	190 (95,3%)

Embora o processo de desinfecção tenha sido o mesmo adotado anteriormente, com a adoção das indicações do proto-experimento anterior, os resultados foram consideravelmente melhores. Obteve-se uma média de contaminação de 4,7% (tabela 2) contra 97,5% do experimento anterior (figura 1). Atribui-se tal sucesso a profilaxia feita nas plantas matrizes e uma melhor exposição dos explantes à luz U.V.. A estratégia de se fazer a inoculação individualizada por tubo de ensaio facilitou a visualização dos eventuais explantes contaminados e o seu aproveitamento em experimentos posteriores. Quando as folhas usadas foram muito tenras os tecidos ficaram amarronzados e inviabilizaram o explante (figura 3).

Proto-experimento 4: Resgate de embriões.

Os dados obtidos estão na tabela 3. As contaminações neste caso foram altas (1/3 dos embriões inoculados), e pode ser atribuído ao longo período que os frutos ficaram no laboratório para serem trabalhados de (16 a 25/06/2001).

Embora seja os números não permitam aplicar testes estatísticos, nota-se a efetividade do fitohormônio BA na formação de calos, mais freqüentes que na testemunha (figura 4a). A formação de calos neste embriões abre a possibilidade de virem a ser usados na organogênese de plântulas efetivamente híbridas, que se forem conseguidas, por certo serão raras. A formação de clones ainda nesta fase diminuiria o seu risco de perda e poderia facilitar a sua poliploidização.

O desenvolvimento da parte aérea de alguns destes embriões (figura 4 b) aparenta ser um problema e variável em função da espécie. Quando transferidos para um vaso com

terriço, apenas um deles sobreviveu (*T. obovatum* X *T. subincanum*), mas mostrou um crescimento extremamente lento e sucumbiu cerca de um ano depois. Logo, há necessidade de estudos complementares para melhorar o desenvolvimento dos embriões resgatados para que possam ser aclimatados com maior êxito. Sugere-se a aplicação de um esquema de adubação de alta performance para desenvolver mais a planta até que pudesse ser enxertada sobre outra que lhe desse mais vigor.

Tabela 3: Observações sobre os embriões resgatados.

Embriões inoculados	Dosagem do hormônio BA		
	0 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
<i>T. speciosum</i>	4	4	3
<i>T. obovatum</i> X <i>T. subincanum</i>	6	6	5
<i>T. cacao</i>	4	4	3
Contaminações			
	0 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
<i>T. speciosum</i>	2	1	3
<i>T. obovatum</i> X <i>T. subincanum</i>	0	5	2
<i>T. cacao</i>	1	0	0
Formaram calos / N embriões			
	0 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
<i>T. speciosum</i>	0/2	2/3	0/0
<i>T. obovatum</i> X <i>T. subincanum</i>	0/6	1/1	3/3
<i>T. cacao</i>	1/3	4/4	3/3
Desenvolveram a parte aérea/ N embriões			
	0 mg/l	1 mg/l	2 mg/l
<i>T. speciosum</i>	0/2	2/3	0/0
<i>T. obovatum</i> X <i>T. subincanum</i>	2/6	0/1	1/3
<i>T. cacao</i>	3/3	3/4	1/3

Proto-experimento 5: Germinação de sementes in vitro

A germinação de sementes in vitro é excelente (figura 5). A retirada da testa abreviou a germinação (figura 6), embora pelo teste de Qui quadrado (contingência) não tenha demonstrado diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,53$; GL = 2).

A porcentagem de contaminação é mostrada na figura 7. Pelo teste de t não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,85$; GL = 4)

Desta forma conclui-se a retirada da testa da semente, embora tenha dado fortes indícios de que abrevia o tempo de germinação, esta não influenciou no processo de contaminação.

BIBLIOGRAFIA

- ADDISON, G. O. & TAVARES, R. M., 1951. Observações sobre as espécies do gênero *Theobroma*, que ocorrem na Amazônia. Bol. Tecn. Inst. Agron. Norte. Belém, 25, 20pp. il.
- AYRES, M.; AYRES, M.A. Jr.; Ayres, D.L.; Santos, A. S. dos 2003. *BIOESTAT 3.0. Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Sociedade Civil Mamirauá/ MCT - CNPQ, 291 p.
- CRIG NEWSLETTER 1990. Interspecific hybridization. CRIG Newsletter nº 6 - April, Cocoa Research Institute, Tafo Ghana.
- CUATRECASAS, J. 1964. Cacao and its allies; a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Contr. United States Nat. Herb., Washington 35 (6): 375-614.
- DUCKE, A. 1953. As espécies brasileiras do gênero *Theobroma* L.. *Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte*, nº 28, Belém, Pará, Brasil, p. 1-24.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. & OJIMA, K. 1986 Plant Cell Cultures 1. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158
- LE COINTE, P. 1934. *Árvores e plantas úteis da Amazônia*. Belém. Livraria Clássica, p. 145-46 (Amazônia Brasileira, 3).
- MARTINSON, V. A. 1966. Hibridization of Cacao and *Theobroma grandiflorum*. *The Journal of Heredity* 57: 134-136.
- PESCE, C. 1941. Oleaginosas da Amazônia. Of. Graf. da Rev. da Veterinária. Belém, p. 100-2.
- SILVA *et al.* - Biosistemática das espécies brasileiras do gênero *Theobroma* utilizando marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares. Em preparação.
- VON ARNOLD, S. & ERIKSSON, T. 1981. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Canadian Journal of Botany*, 59:870-874.
- VENTURIERI, G. A. 1993. *Cupuaçu: a espécie, sua cultura, usos e processamentos*. Clube do Cupu. Belém, 108 pp.

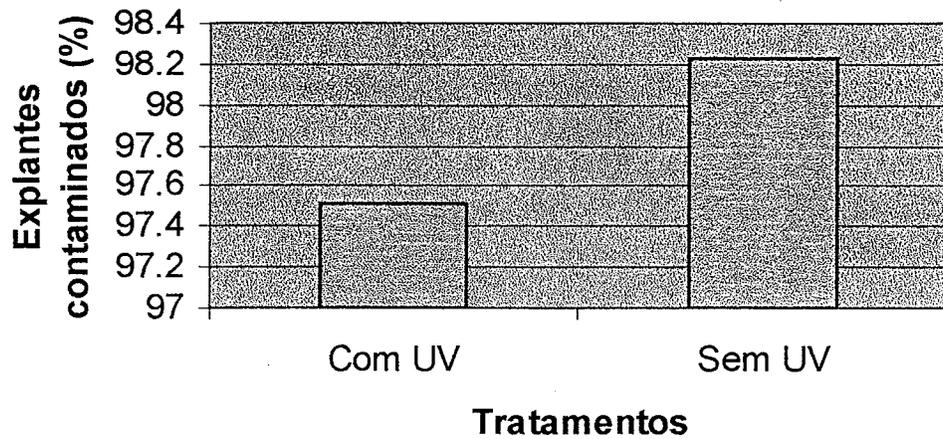


Figura 1: Porcentagem de explantes de folha de cacau contaminados.



Figura 2: Explantes de folhas de cacaueiro com parte danificada atribuída à severidade do sistema de desinfecção aplicado. Notar alguns calos sendo formados.



Figura 3: Explantes de folhas de cupuaçu. As duas a esquerda da foto foram derivadas de folhas excessivamente tenras e não resistiram ao tratamento de desinfecção.

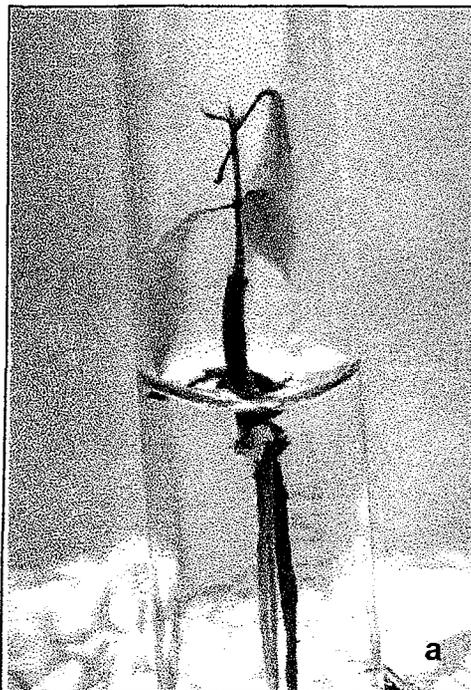


Figura 4: a) Embrião resgatado de *T. cacao*. Notar a formação de calos na cicatriz dos cotilédones. b) *T. cacao* x *T. obovatum*. Embrião com desenvolvimento muito deficiente.



Figura 5: Sementes de *T. cacao* germinadas in vitro.

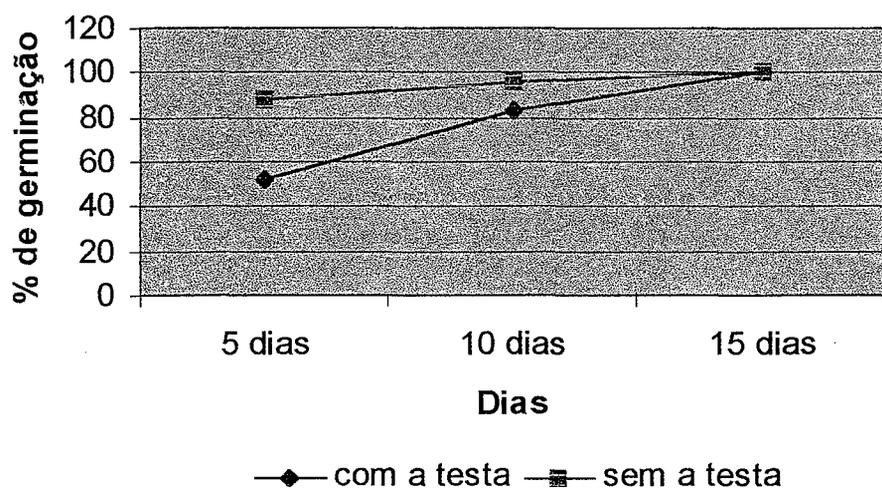


Figura 6: Porcentagem de germinação de sementes de *T. sylvestre* e dos híbridos de *T. obovatum* x *T. subincanum* e *T. grandiflorum* X *T. obovatum* com e sem a testa. Figura construída com base nos valores médios (N=20).

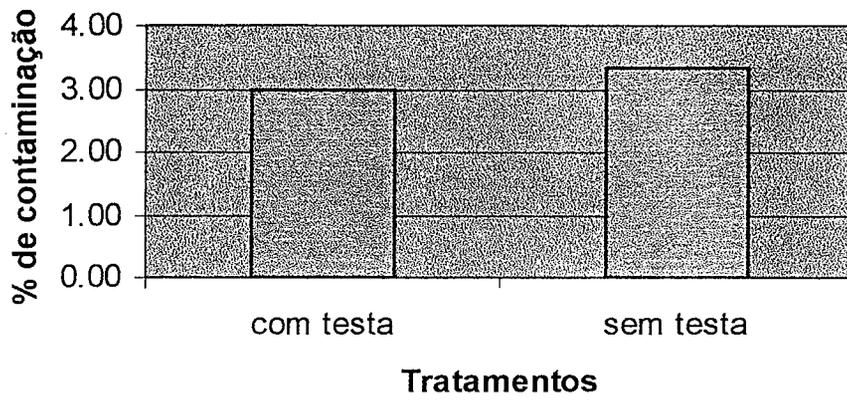


Figura 7: Porcentagem de contaminação de sementes com e sem testa. Dados médios para as espécies estudadas.

CALOGÊNESE DO HÍBRIDO *THEOBROMA GRANDIFLORUM* X *T. OBOVATUM* (STERCULIACEAE)¹

Giorgini Augusto Venturieri²
Giorgio Cristino Venturieri³

RESUMO: O declínio da cacauicultura na amazônia tem sido causado pela doença Vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*). Um híbrido interespecífico do mesmo gênero, (*Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum*), tem demonstrando resistência a esta doença. Avaliou-se a calogêneses deste híbrido com a finalidade de sua propagação massiva. Os explantes usados (tegumento, cotilédone e embrião) foram postos para desenvolver em condições estéreis em meio de cultura LPM mais água de coco (50 ml/l), glucose (20 g/l), 2,4 - D (2mg/l); Thidiazuron - TDZ nas concentrações de 0; 5 e 10 µg/l, carvão ativado (2 g/l) em gelrite (2 g/l) a um pH de 5,8. Cada concentração de TDZ x três tipos de tecido foi considerado um tratamento. As culturas foram mantidas no escuro, à temperatura de 22 ± 2 °C. Os tecidos não mostraram diferenças significativas quanto a proporção de recobrimento por calos ($p = 0,1392$) embora notou-se que nos cotilédones tenha sido maior. A dosagem de TDZ nitidamente não influenciou na cobertura de calos ($p = 0,9442$). Quanto a frequência, os tecidos mostraram diferentes capacidades de desenvolver calos ($p = 0,0232$) sem mostrar-se influenciados pela dosagem de TDZ ($p = 0,6635$). Os explantes de cotilédones foram os que formaram calos em maior frequência. Há uma leve tendência de que quanto menor a dosagem de TDZ maior a frequência de calos obtidos. Não foi constatada interação entre tipo de calo/frasco x dosagem de TDZ ($p = 0,3169$).

Palavras - chave: cupuaçu híbrido; cultura-de-tecido, Vassoura-de-bruxa, micropropagação

¹Estudos financiados pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq)/ Programa do Trópico Úmido (PTU) (proc. n° 469915/00-5).

²Professor Doutor da Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, 88.040-900, Florianópolis - SC, Brasil, giorgini@ccb.ufsc.br

³Eng. Agrônomo., D.Sc. da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa. Postal 48, CEP: 66.095-100, Belém, PA, giorgio@cpatu.embrapa.br.

CALOGÊNESIS OF *THEOBROMA GRANDIFLORUM* X *T. OBOVATUM* HIBRID (STERCULIACEAE)

ABSTRACT: Decline of cocoa plantations in Amazonia has been attributed to the Witches-broom-disease (*Crinipellis perniciosa*). An interspecific hybrid, (*Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum*), has demonstrated resistance against this disease. Calogenesis of this hybrid was evaluated, aiming for its mass propagation. The used explants (tegument, cotyledons and embryos) were developed in sterile conditions in LPm media plus coconut milk (50 ml/l); glucose (20 g/l); 2,4 - D (2mg/l); Thidiazuron - TDZ at concentrations of 0; 5 e 10 µg/l; and activated charcoal (2 g/l) in gelrite (2 g/l) at a pH of 5,8. Each concentration of TDZ x three kinds explants was considered a treatment and were kept in the dark at a temperature of 22 ± 2 °C. Explants did not show significant differences in the proportion of callus recovery ($p = 0,1392$) although cotyledons did have the highest value. TDZ level did not influence callus recovery ($p = 0,9442$). Different explants did not result in different frequencies of callus development ($p = 0,0232$) and were not been influenced by the doses of TDZ ($p = 0,6635$). Cotyledon explants displayed the highest values for frequency of callus. There was also a slight trend that lower levels of TDZ resulted in higher frequencies of callus. There was no interaction between kind of callus/flasks x doses of TDZ ($p = 0,3169$).

Key words: cupuassu hybrid, tissue-culture, witches-broom-disease, micropropagation

INTRODUÇÃO:

O cacau possui importância econômica mundial, pois sua amêndoa é matéria para fabricação de chocolate. Tem também uma grande importância social, pois é uma cultura que utiliza muita mão-de-obra. O declínio da produção cacauceira brasileira tem sido causado pela doença Vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa*), e está induzindo a um grande êxodo rural no Sul da Bahia e na Amazônia. Embora estejam sendo feitos esforços para a obtenção de variedades de cacau resistentes a esta doença, outras espécies e híbridos interespecíficos do mesmo gênero poderiam ser testados e explorados como análogos ao cacau e que exibissem alguma resistência a doença. Um híbrido, o de *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum*, feito por Addison & Tavares (1951, 1952), vem demonstrando alguma resistência à doença Vassoura-de-bruxa, no entanto, restam apenas 5 das matrizes originais, na hoje nomeada coleção "Addison O'Neill", pertencente a EMBRAPA - Amazônia Oriental em Belém - PA, Brasil, com grande risco de virem a ser perdidas. A propagação deste híbrido, por métodos massivos como a propagação *in vitro*, poderia propiciar a formação de estandes para futuros testes agrônômicos e diminuir o risco de perda de tal material genético.

A formação de calos em um explante, ou seja calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por orogênese ou embriogênese somática. É útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações.

Das 8 espécies amazônicas de *Theobroma*, a propagação *in vitro* de apenas duas delas tem sido avaliada. Para *T. cacao* tem-se feito consideráveis esforços para estabelecer um método de propagação baseado em cultura de tecidos. Porém, a sua recalcitrância *in vitro* e a grande influência do genótipo na sua eficiência dificultou a obtenção de um eficiente sistema de micropropagação via organogênese ou desenvolvimento de gemas

axilares (Orchard *et al.*, 1979; Passey & Jones, 1983; Blake & Maxwell, 1984; Janick & Whipkey, 1985; Dufour & Dublin, 1985; Legrand & Mississo, 1986; Bertrand, 1987; Flynn *et al.*, 1990; Figueira *et al.*, 1991; Figueira & Janick, 1994; Tan & Furtek, 2003). Um eficiente sistema de propagação foi desenvolvido por Li *et al.* (1998) com procedimentos para estimular a embriogênese somática e a regeneração de plantas a partir de tecidos florais (estaminódios), pela utilização de 3 etapas no cultivo (indução de calos, desenvolvimento de embriões e regeneração de plantas) em combinação com o uso da citocinina sintética TDZ (Thidiazuron) e da auxina sintética 2,4-D. Os resultados de Li *et al.* (1998) foram os mais promissores, com 100% dos estaminódios cultivados do genótipo Sca6-1 produzindo, em média, 45 embriões somáticos por estaminódio. Estaminódios de vários outros genótipos foram testados (num total de 19 genótipos) e todos foram responsivos às condições de cultura, em taxas que variaram de 1 a 100 % de eficiência, cada qual produzindo em média de 1 a 46 embriões. Mais de 270 plantas, derivadas de embriões somáticos de seis desses genótipos, foram estabelecidas com sucesso em casa de vegetação. Esses resultados demonstraram, uma maior aproximação da utilização no futuro, de embriões somáticos obtidos em laboratório na propagação clonal de cacauzeiros. Uma outra espécie de *Theobroma* estudada foi o cupuaçu (*T. grandiflorum*), que vem tomando importância para a indústria de sucos e como um possível sucedâneo para o cacau (Venturieri, 1993). Embriões imaturos desta espécie foram retirados de sementes e cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D (1mg/l) e água de coco (10 ml/l) tendo sido obtido calos (Velho *et al.* 1988). Segmentos de eixo embrionário e de cotilédones foram cultivados em meio MS 1/2 + 2,4-D (1; 2; 4 e 8 mg/l); sais do MS 1/1 (SIGMA) acrescido de ANA (3mg/l); sais do N6 (SIGMA) 4g/l + 2,4-D (0; 2 ;4 mg/l) e ANA (0; 3; 5 mg/l); sais do N6 (SIGMA) acrescido somente de ANA (3mg/l). Calos brancos e brilhantes foram observados nos explantes testado no meio MS + 2,4-D (1 e 2 mg/l). A combinação de ANA (3 mg/l) e 2,4-D (2mg/l) promoveram a formação de calos brancos e raízes mas não foram obtidas plântulas (Ferreira *et al.* 2001).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a calogênese de 3 diferentes tecidos obtidos da semente do híbrido *T. grandiflorum* x *T. obovatum* como o primeiro estágio para a obtenção de plântulas *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos completamente desenvolvidos, porém não completamente maduros e ainda portando o pedúnculo e um pedaço de ramo, provenientes da matriz GO-1 da coleção "Addison O'Neil" pertencente a EMBRAPA - Amazonia Oriental em Belém - PA, foram coletados em 16/10/2001. Os frutos foram envolvidos em papel jornal, mantidos em sacos plásticos e transportados para Florianópolis - SC. No dia seguinte, os sacos plásticos foram abertos e mantidos à temperatura ambiente dentro de laboratório por 4 dias quando foram então usados. Para a obtenção dos explantes, o fruto foi inicialmente esterilizado por imersão em Etanol 95% (1 min.) seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 40:60 v/v do produto comercial com 2,5% de cloro ativo: água, mais 3 gotas de detergente de uso doméstico (20 min.). As sementes foram extraídas do fruto e despolpadas dentro do fluxo laminar e re-imersas em uma nova solução de hipoclorito na mesma concentração no tempo já citados. Foram então enxaguadas 3 vezes em água deionizada estéril por 1 minuto em cada vez. Os explantes, (tegumento, cotilédone e embrião) retirados das sementes, foram postos para desenvolver em condições estéreis em meio de cultura LPm (macro, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos do meio) (Von Arnold & Erikson, 1981)

acrescido de água de coco (50 ml/l), glucose (20 g/l); 2-4D (2mg/l) mais Thidiazuron - TDZ nas concentrações de 0; 5 e 10 µg/l em gelrite (2 g/l) mais carvão ativado (2 g/l) e a um pH de 5,8. Cada concentração de TDZ x três tipos de tecido foi considerado um tratamento. Para cada tratamento, foram utilizados 2 frascos, com capacidade para 500 ml, cada um contendo 40 ml de meio. Em cada frasco foram colocados 5 explantes (considerados como repetições). As culturas foram mantidas no escuro, à temperatura de 22 ± 2 °C. No dia 22/11/2001, 33 dias após a colocação nos meios de cultura, a emissão de calos foi avaliada subjetivamente pela sua presença/ausência e extensão. Para esta última, foram atribuídas notas que variaram de 0 a 100 de acordo com a proporção de calo sobre a área exposta do explante (acima do meio de cultura), p. ex. Nota 0 = sem emissão de calo; 50= emissão moderada de calos correspondendo a aproximadamente 1/2 da região exposta; 100= a emissão em 100% da área exposta. A qualidade do calo também foi avaliado subjetivamente atribuindo-se nota de 1 a 3 sendo: 1 calos amarelados, translúcidos formando uma superfície lisa; 2 = calos amarelados, levemente opacos e friáveis; 3 = Calos brancos, opacos, brilhantes e friáveis.

Para as análises estatísticas, os dados em proporção foram transformados para o arco seno da raiz de p , onde p = a proporção (Sokal & Rohlf, 1981), exceção feita para a análise de interação, onde foi usado o número absoluto de calos responsivos. Os dados foram inicialmente submetidos a análise de variância onde foi comparado o tipo de tecido x dosagem de TDZ (ANOVA dois critérios). Em uma segunda etapa, o tecido com maior resposta foi avaliado para tipo de calo observado x dosagem de TDZ e interação (ANOVA fatorial). A comparação de médias foi feita pelo teste de t de Student usando o pacote estatístico Bioestat (Ayres *et al.*, 1998). Os calos gerados pelo melhor tratamento foram transferidos para um outro meio para a proliferação dos calos (MPC) com a mesma constituição anterior, exceto os hormônios que foram a Kinetina - KIN nas concentrações de 1, 2 e 3 mg/l combinado com Ácido Naftaleno Acético - ANA 0,01 e 0,1 mg/l. Gráficos e tabelas foram elaborados usando a frequência de calos (em porcentagem) obtidos por tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação de calos iniciou-se ao longo da segunda semana de cultivo, a partir de pontos que se expandiam, e recobriam a superfície do explante (Figura 1).

Considerando a proporção de recobrimento entre os diferentes tecidos testados, embora os cotilédones tenham mostrado média mais elevada, as diferenças não foram significativas estatisticamente ($p= 0,1392$). Quanto a dosagem de TDZ esta nitidamente não influenciou na cobertura de calos ($p= 0,9442$) (Tabela 1).

Quanto a frequência de explantes responsivos, os tecidos mostraram diferentes capacidades de desenvolver calos ($p= 0,0232$) mas não se mostraram influenciados pela dosagem de TDZ ($p= 0,6635$). Os explantes de embrião e de tegumento tiveram os valores mais baixos. Os explantes de cotilédones foram os que formaram calos em maior frequência (Figura 2).

Em termos de frequência de calos, independente do tecido e do tipo de calo, a dosagem de TDZ 5 µg/l foi o que provocou a melhor resposta para esse experimento (Tabela 2) mas este dado é incompleto pois o tipo de calo é fortemente associado a sua capacidade embriogênica. Analisando apenas o tecido cotilédone para a variável proporção da cobertura de calo por dosagem de TDZ notou-se que não houveram diferenças

estatisticamente significativas tanto para tipo de calo ($p= 0,0553$) como para dosagem de TDZ ($p= 0,5848$) (Tabela 2). No entanto, os valores de p para ambos os fatores foram muito próximos do limite significativo de 5%, o que possivelmente poderia indicar evidências de que a presença de TDZ tenha influenciado mais na formação de calos do tipo 2, o que poderia ser melhor evidenciado em uma amostragem maior. Quanto a frequência de calos responsivos, houve diferença significativa entre tipos de calos ($p = 0,0117$) sendo o do tipo 2 o de maior frequência e estatisticamente diferente dos demais. As frequências de calos do tipo 1 e 3 foram equivalentes estatisticamente (Figura 3). Quanto a dosagem de TDZ, esta não influenciou significativamente ($p= 0,1123$) embora haja indicadores de que quanto menor a dosagem de TDZ maior a frequência de calos obtidos (Figura 3).

Não foi constatada interação entre tipo de calo/frasco x dosagem de TDZ ($p= 0,3169$). Especificamente para os calos do tipo 3, que são os considerados o de maior interesse por serem os de maior chance de tornarem-se embriogênicos, não foi constatada qualquer relação com a aplicação de TDZ (Figura 3).

O experimento indica que o TDZ não produziu melhoras na indução de calos desejáveis para virem a ser aproveitados para a organogênese ou embriogênese somática do híbrido de *T. grandiflorum* x *T. obovatum* como observado para o cacau por Li *et al.* (1998), logo a resposta ao TDZ não parece poder ser estendida para outras espécies do gênero. Os experimentos de Velho *et al.* (1988) e Ferreira *et al.* (2001), mostraram que o cupuaçu não tem apresentado dificuldades para gerar calos usando-se o meio MS com a adição de baixas concentrações de 2,4 - D sendo a eficiência na emissão de calos aumentada pela adição de ANA. Como o cupuaçu é uma das espécies progenitoras do híbrido estudado pode ser que ANA venha a provocar um maior crescimento de calos no híbrido *T. grandiflorum* x *T. obovatum*.

A avaliação do efeito de ANA e KIN foi prejudicado por elevado índice de contaminação. Em dois frascos remanescentes e não contaminados, um contendo de ANA 0,01 mg/l e KIN 1 mg/l, e outro contendo ANA 0,1 mg/l e KIN 3 mg/l, houve a formação de embriões somáticos (Figura 4).

Como indicadores para uma segunda fase de experimentos, sugere-se novamente o uso de cotilédones como explante, mas para a formação de calos uma outra fonte de auxina ao invés de TDZ. Para a proliferação de calos, sugere-se repetir o experimento com uso de ANA e KIN por terem dando indícios da sua efetividade na formação de embriões somáticos.

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos aos estagiários: Adriana Tomazi pela profícua ajuda na instalação dos experimentos; Fabiano José Pickscius, Daniel Enriquez Hidalgo e Cassia Garrido durante as avaliações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addison, G. O'N.; Tavares, R. M. 1951. Observações sobre as espécies do gênero *Theobroma* que ocorrem na Amazônia. *Bol. Tec. do Inst. Agron. do Norte*, 25: 1-41
- Addison, G. O'N.; Tavares, R. M. 1952. Hybridation and grafting in species of *Theobroma* which occur in Amazonia. *Evolution*, 6: 380-386
- Ayres, M.; Ayres, M.A. Jr.; Ayres, D.L.; Santos, A. S. dos 1998. *BIOESTAT. Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências Biológicas e Médicas*. Sociedade Civil Mamirauá/MCT - CNPQ, 193 p.

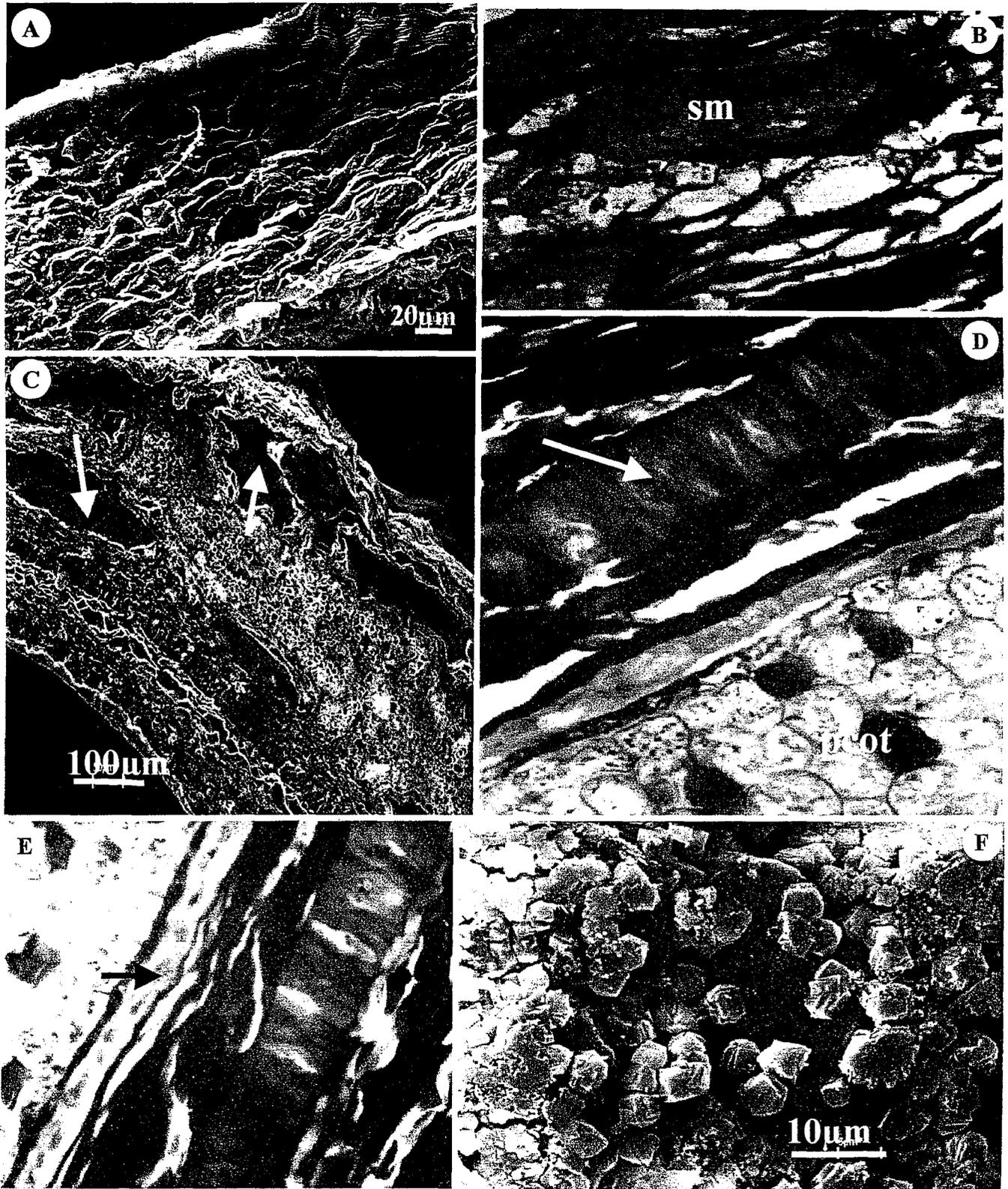


Figura 16- *T. subincanum*. A-superfície da epiderme externa do tegumento externo MEV; B- saco de mucilagem (sm) no parênquima do tegumento externo (200x); C-sacos de mucilagem (seta) MEV; D-camada de células esclerificadas (seta) e parênquima cotiledonar (pcot) 400x; E- epiderme interna do tegumento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

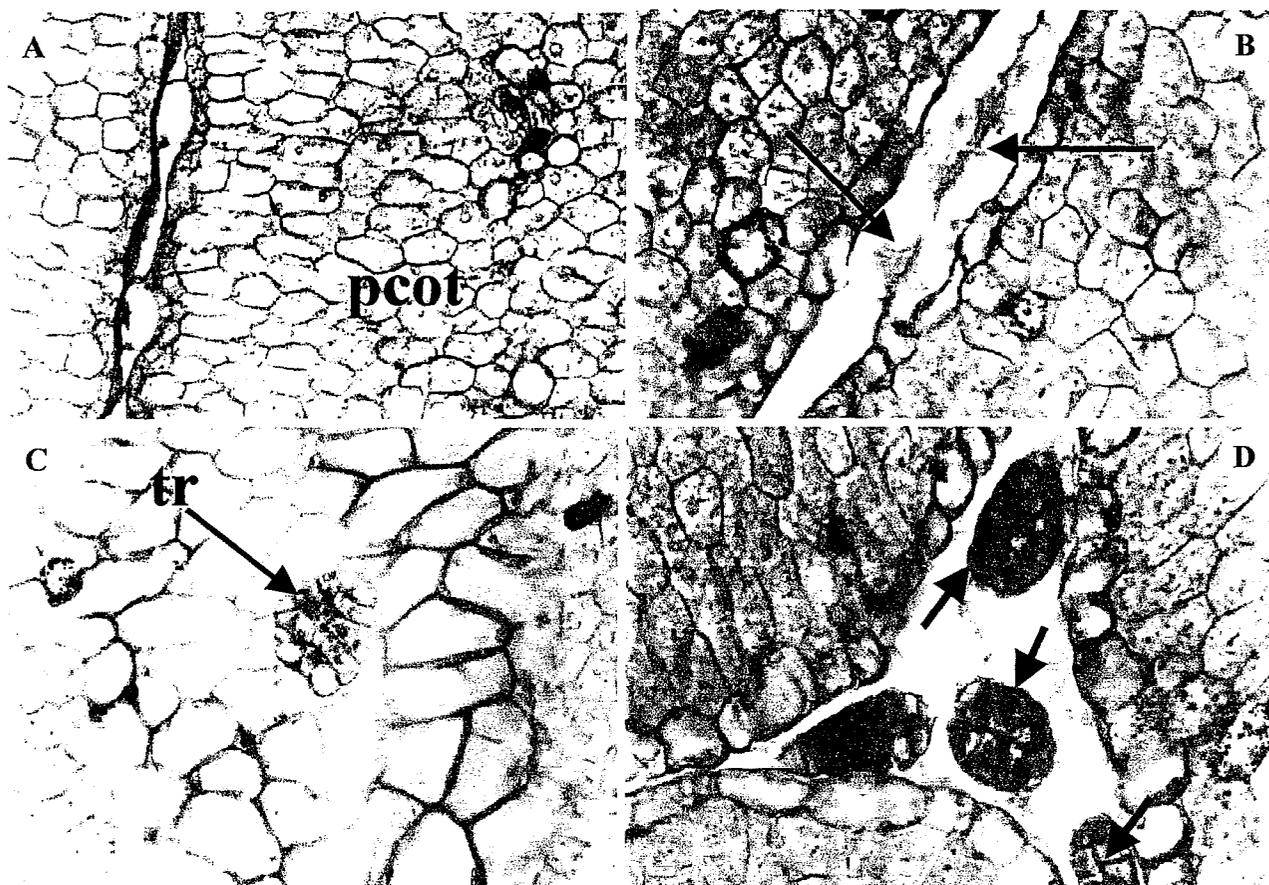


Figura 17- *T. subincanum*. **A**-parênquima cotiledonar (200x); **B**-drusas na epiderme cotiledonar (seta preta) (200x); **C**- tricomas (tr) glandulares na epiderme cotiledonar (400x); **D**-tricomas (tr) glandulares com formação de haste (seta) (400x).

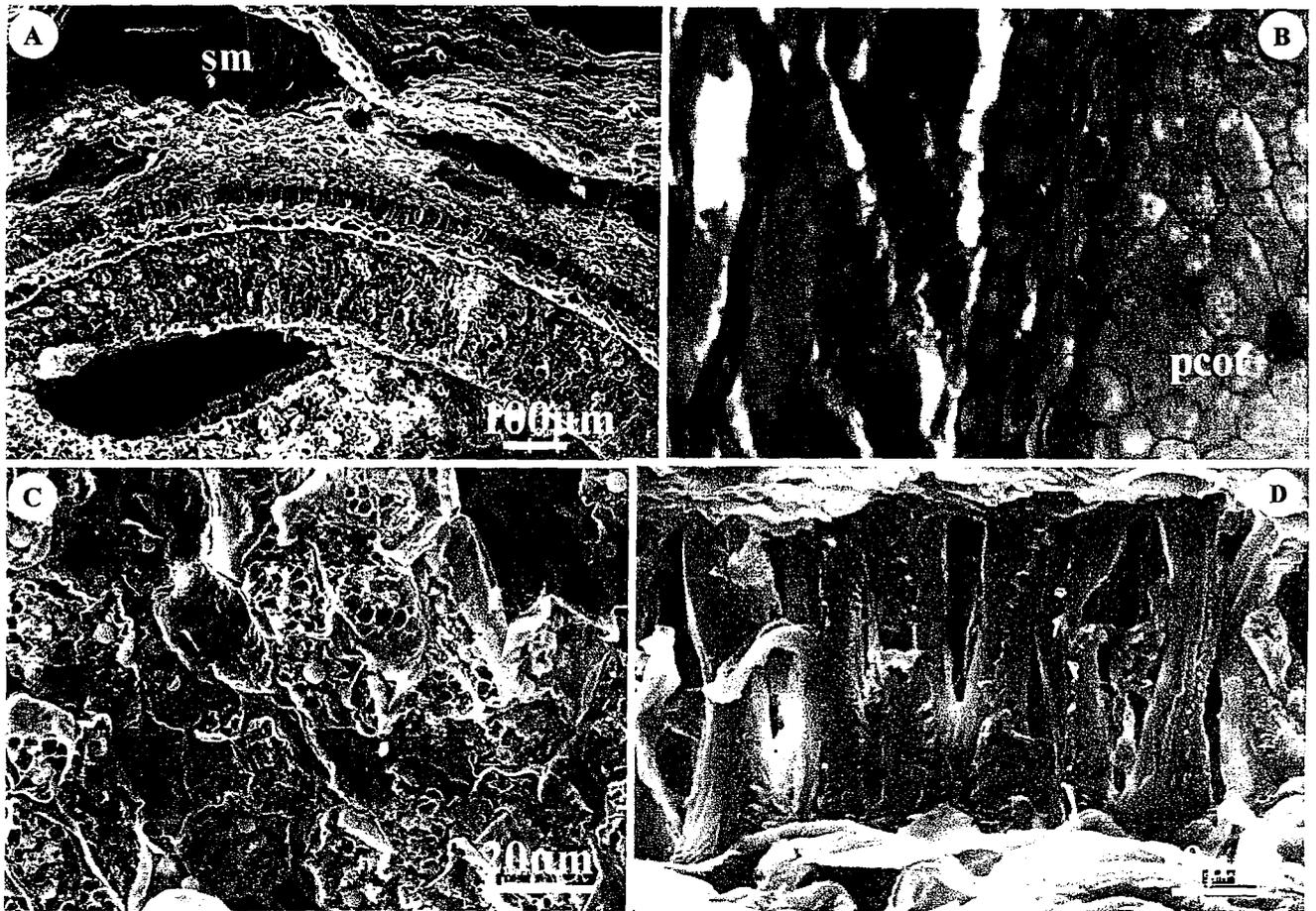


Figura 18- *T. obovatum* x *T. subincanum* **A**-sacos de mucilagem (sm), camada de células esclerificadas (seta) MEV; **B**-células do parênquima cotiledonar (pcot) (200x); **C**-células do parênquima cotiledonar evidenciando grãos de amido (seta) MEV; **D**-camada de células esclerificadas (seta) MEV.

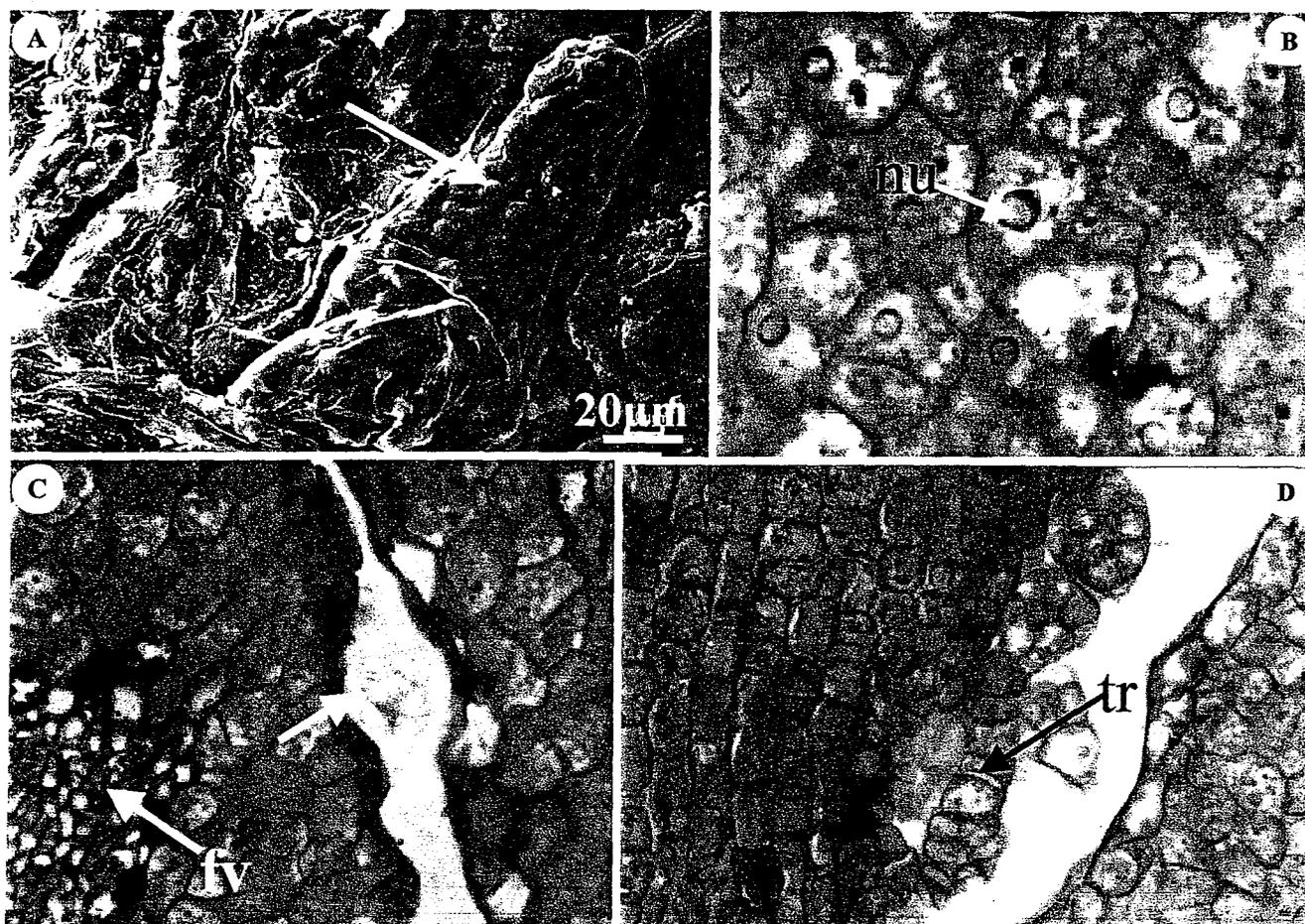


Figura 19 - *T.obovatum* x *T.subincanum*. **A**-estruturas de reserva encontradas no eixo hipocótilo-radícula (seta) MEV; **B**-células do parênquima cotiledonar com núcleos evidentes (seta) (400x); **C**-drusas entre a epiderme cotiledonar (seta menor) e feixes vasculares (fv) (400x); **D**-tricomas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

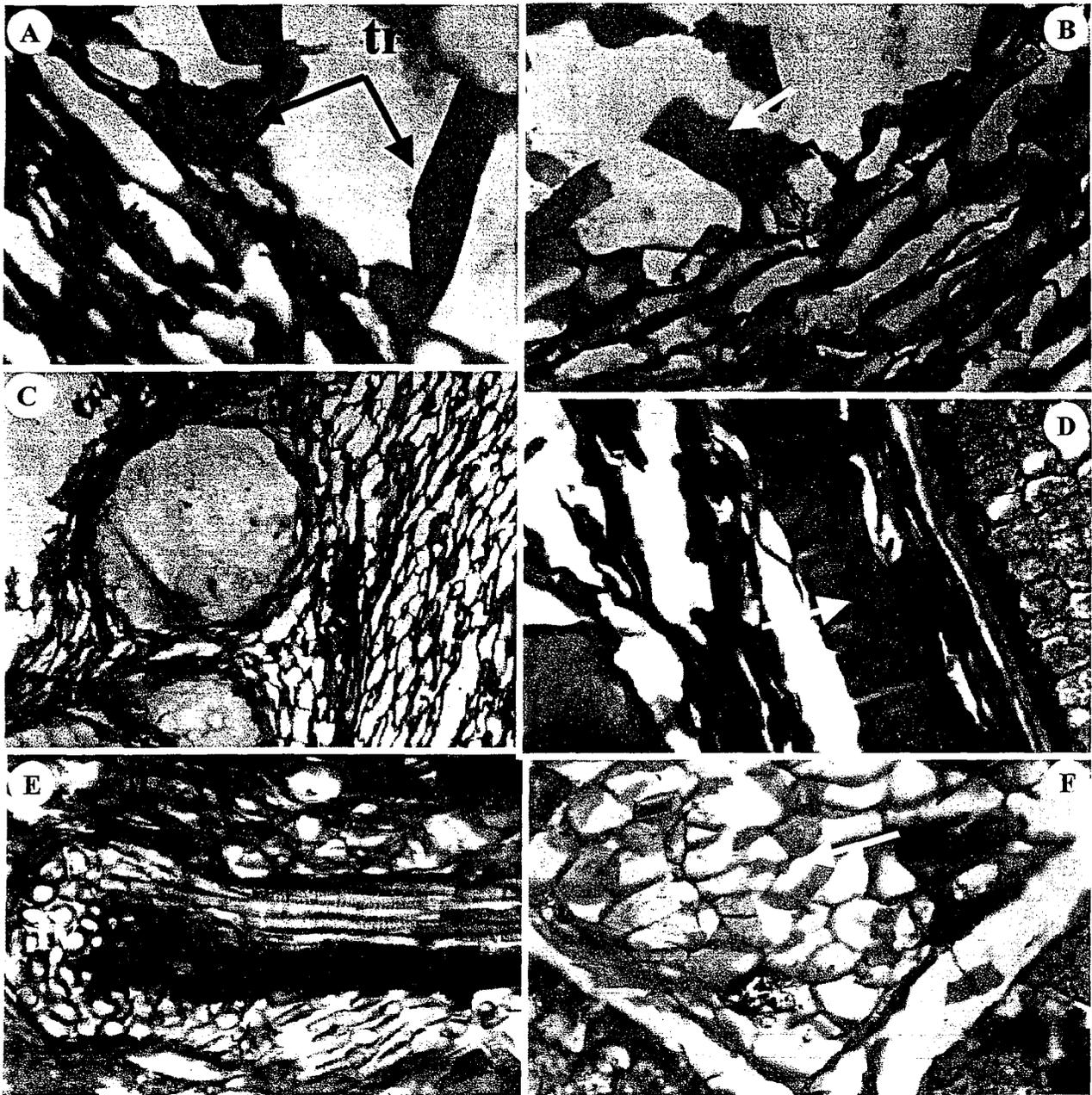


Figura 20- *T. grandiflorum* x *T. subincanum*. **A**-tricoma (tr) na epiderme externa (400x); **B**- detalhe do tricoma na epiderme externa (seta) (400x); **C**-idioblastos no tegumento externo (100x); **D**-células esclerificadas (seta) (400x); **E**- feixes vasculares em secção longitudinal (fv) no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

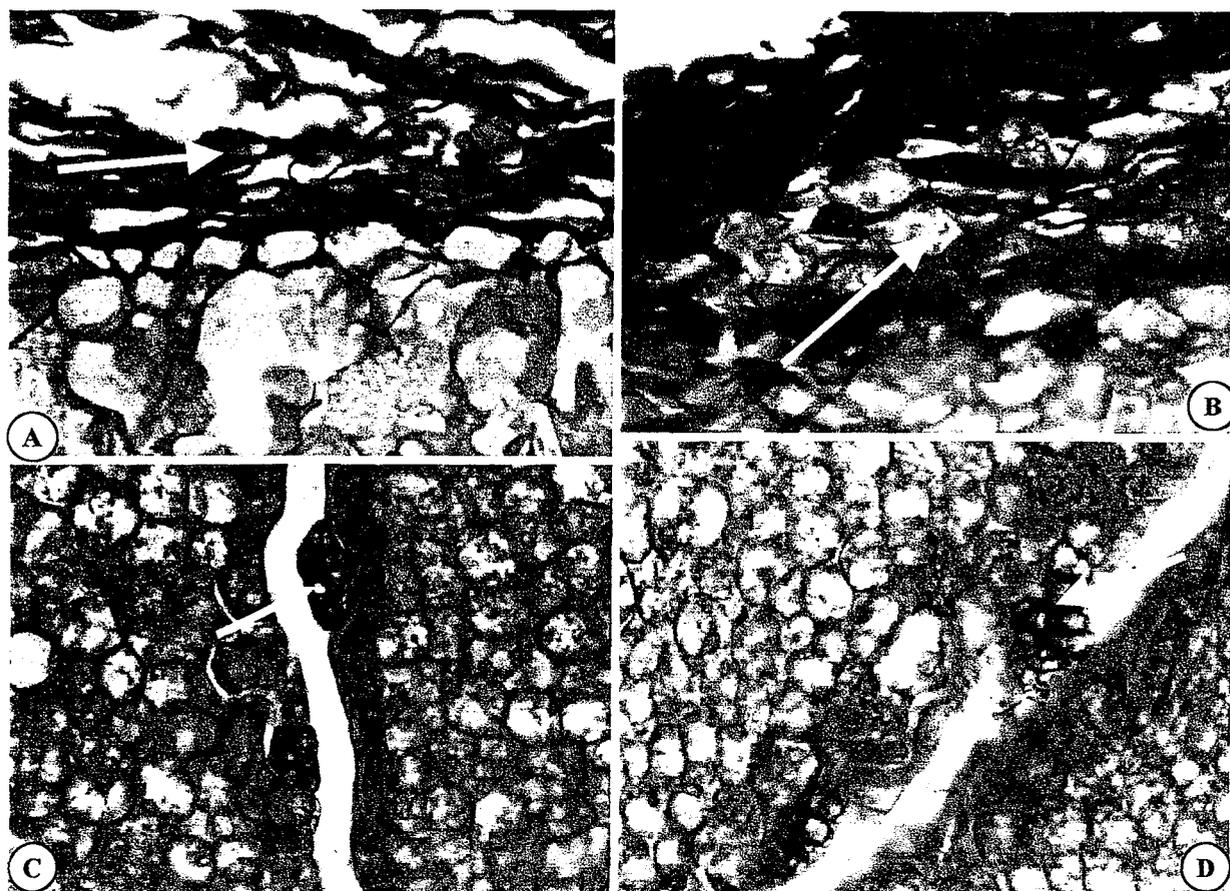


Figura 21- *T. grandiflorum* x *T. subincanum*. **A-** células do parênquima sub-epidérmico (seta) (100x); **B-** drusas no parênquima (seta) (400x); **C-** tricomas glandulares no epiderme do parênquima cotiledonar (seta) (400x); **D-** tricomas glandulares na epiderme cotiledonar com formação de haste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

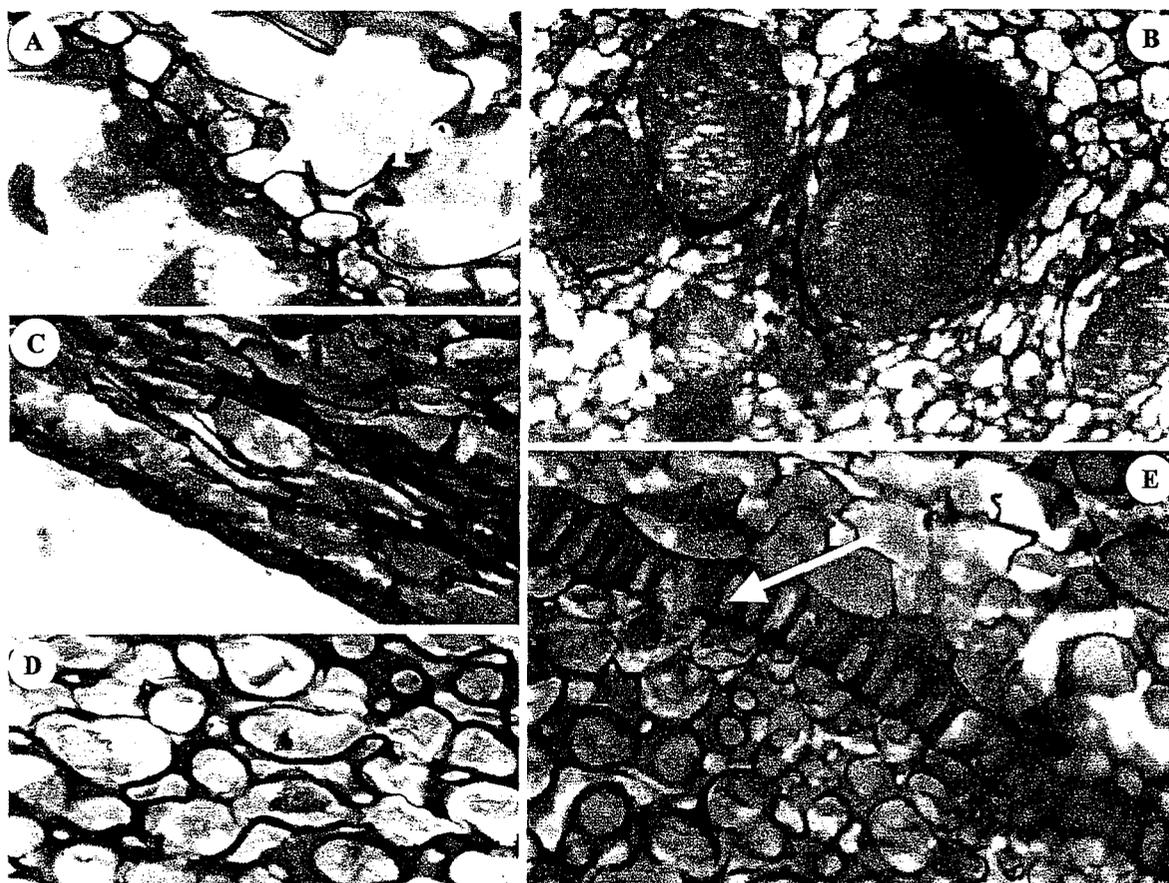


Figura 22- *T. grandiflorum* x *T. obovatum*. **A**-epiderme externa do tegumento externo (epe) (400x); **B**-idioblastos no tegumento (200x); **C** e **D**-detalhe das células do parênquima (400x); **E**-camada de células esclerificadas em paliçada (seta) (400x).

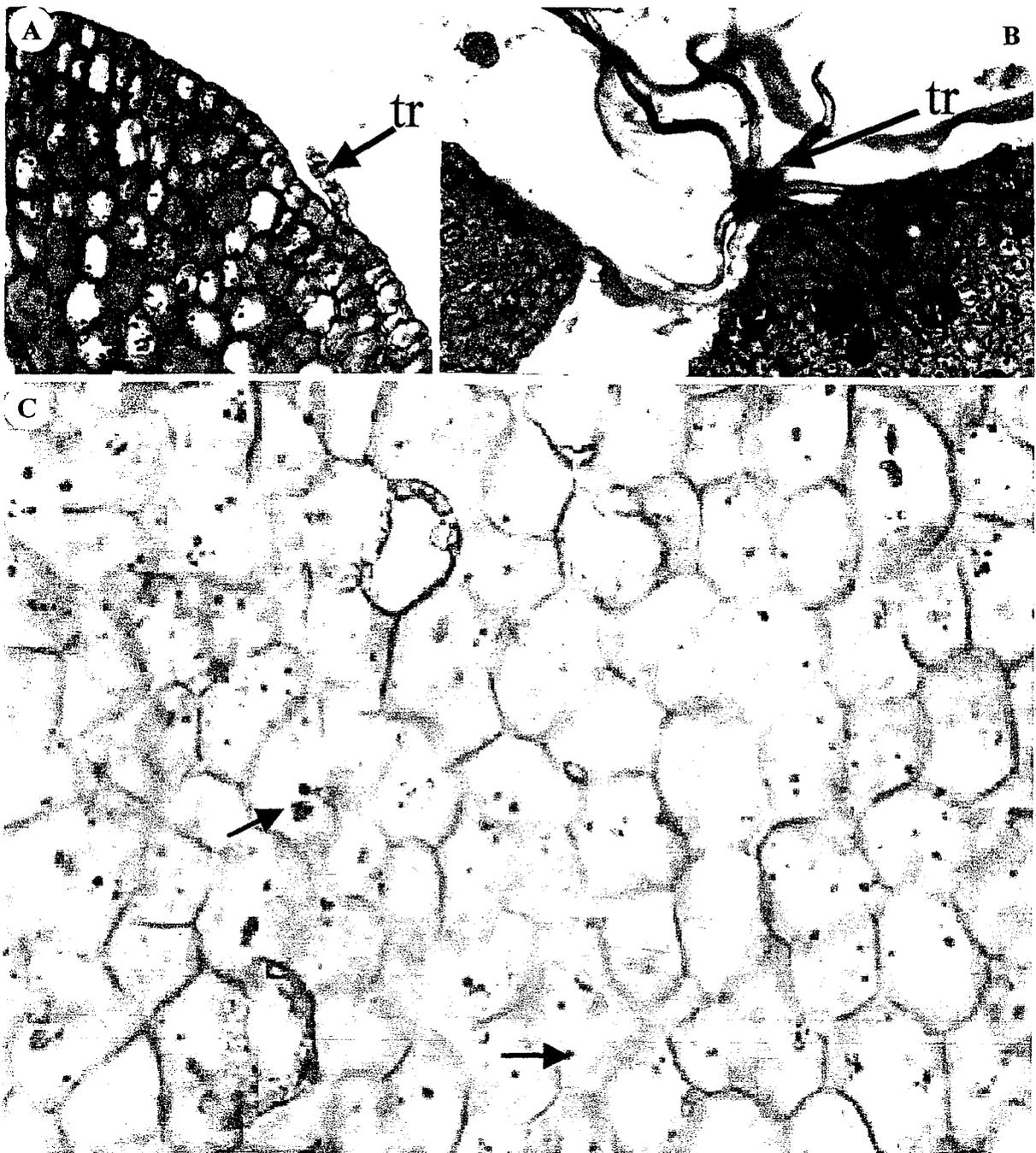


Figura 23- *T. grandiflorum* x *T. obovatum* **A-**tricoma glandular (tr) na epiderme cotiledonar (400x); **B-** tricoma (tr) estrelado na epiderme cotiledonar (200x); **C-** células do parênquima cotiledonar (seta), observar conteúdo fenólico (400x).

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

Seidel Ferreira dos Santos¹
Giorgini Augusto Venturieri²
Zenilda Laurita Bouzon³

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.

¹ Eng. Agrônomo; Msc. em Recursos Genéticos Vegetais

² Professor Doutor-Universidade Federal de Santa Catarina/CCB/BEG

³ Professora Doutora-Universidade Federal de Santa Catarina/CCB/BEG

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 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. 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 *T. 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.

Material e Métodos

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).

Resultados

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 (Willd. ex Spreng.) Schum

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 Mart.

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 mucilaginosa 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 Willd.

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 Klotzsch ex Bernoulli

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 reagindo 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).

Discussões

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.

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 grãos 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.

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 contêm 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 pécticas.

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.

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. Umas 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 cacão. 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 polifênóis do cacão 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).

Conclusões

- 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-embriônicos. 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.

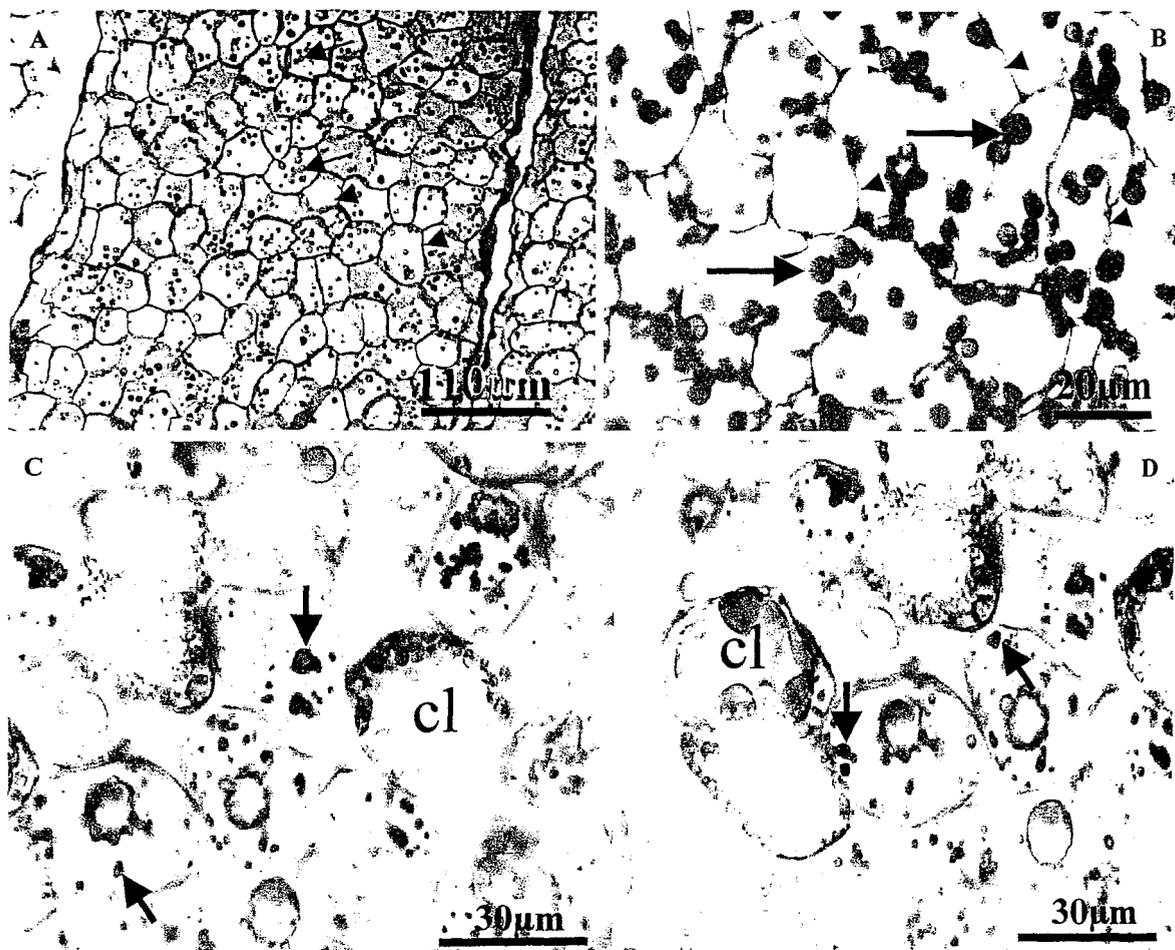


Figura 01-*T. grandiflorum*. A e B- células do parênquima cotiledonar PAS positivas (destacando grãos de amido (seta)); C-corpos protéicos (seta) em células do parênquima cotiledonar, idioblastos com corpos lipídicos (cl); D-células do parênquima cotiledonar CBB positivas evidenciando corpos protéicos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

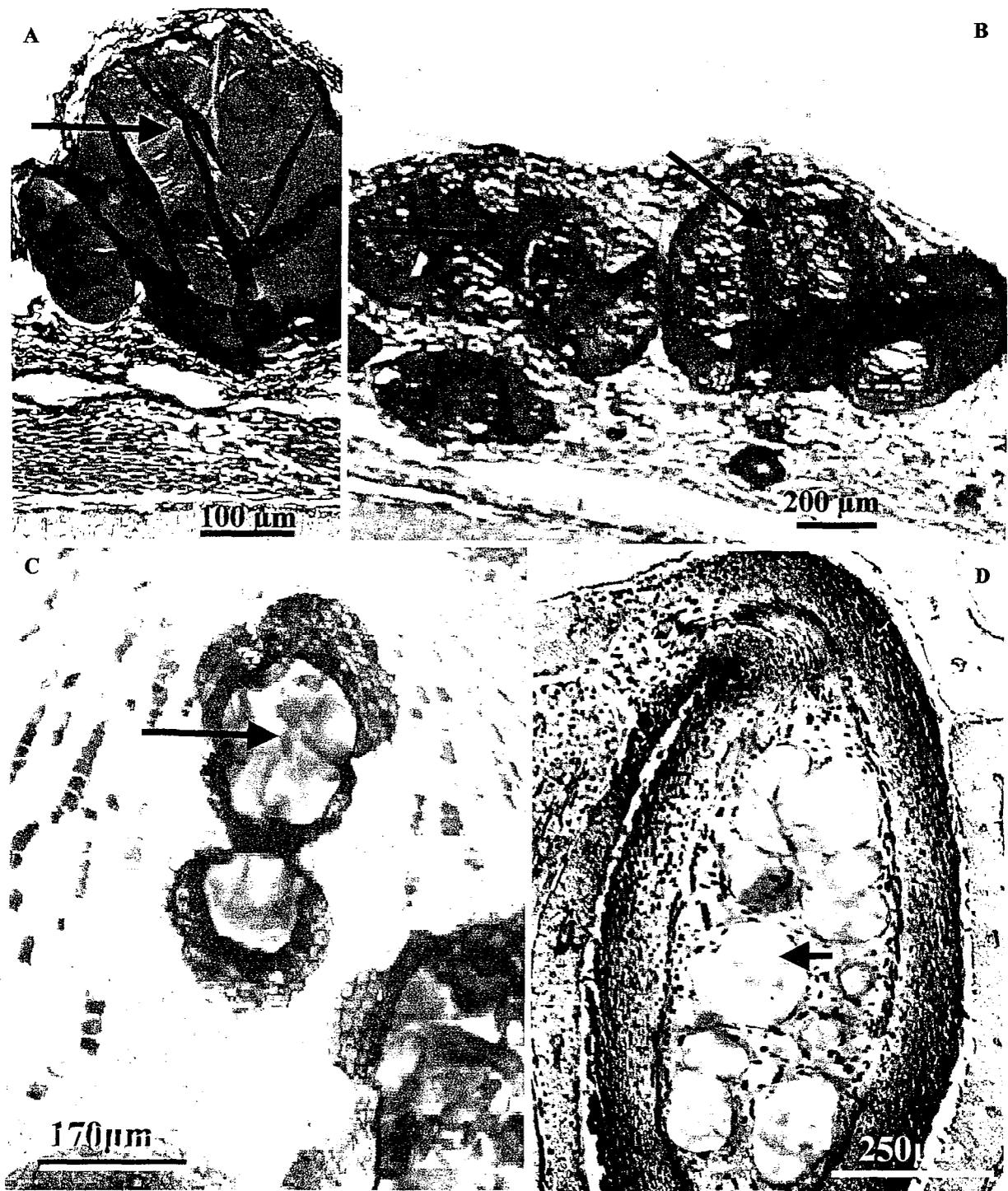


Figura 02-*T. grandiflorum*. **A**-idioblastos no tegumento externo evidenciando reação metacromática ao AT-O; **B**-sacos de mucilagem (sm) com reação positiva ao AB; **C**-sacos de mucilagem (seta) no eixo hipocótilo radícula com reação metacromática ao AT-O; **D**-sacos de mucilagem (seta) no eixo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

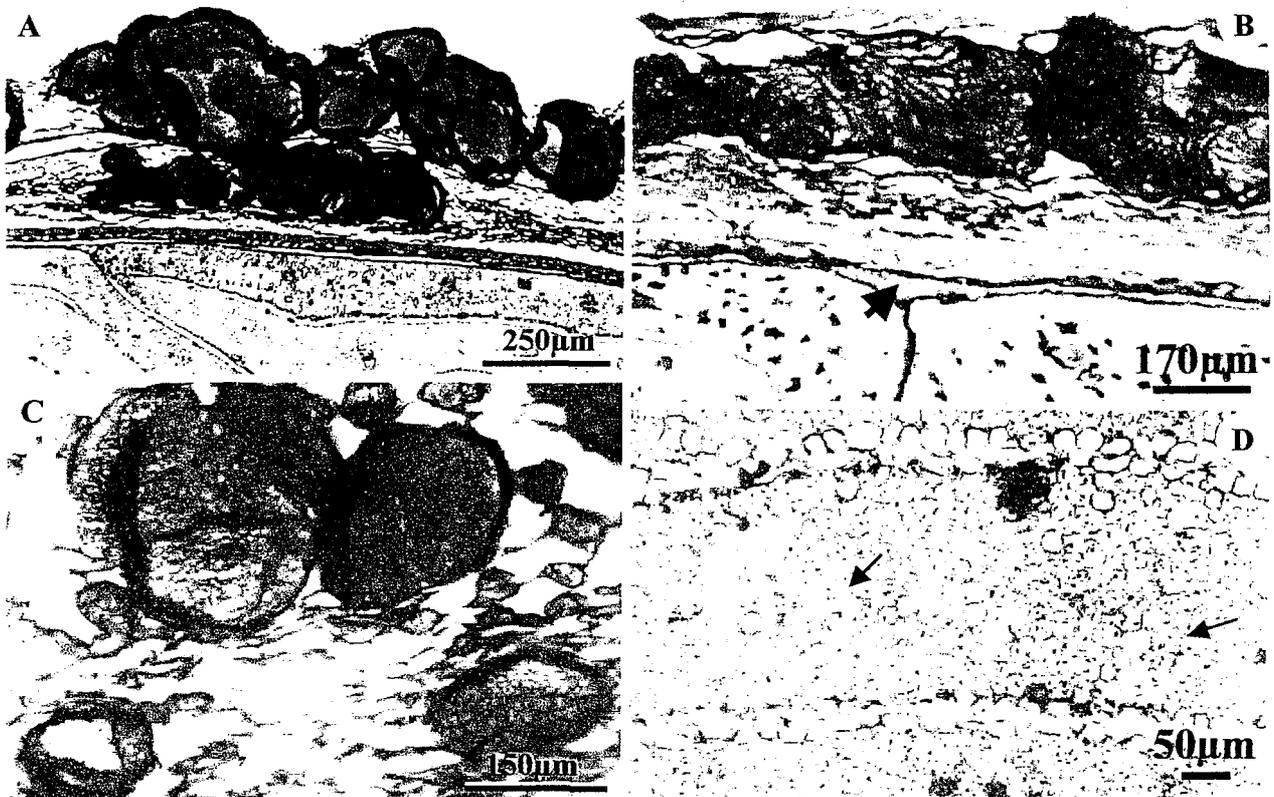


Figura 03- *T. subincanum*. **A**-idioblastos no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O; **B** e **C**-idioblastos no tegumento externo e a região entre os cotilédones (seta) mostrando reação positiva ao AB; **D**-células do parênquima cotiledonar (seta) CBB positivas com pequenas granulações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

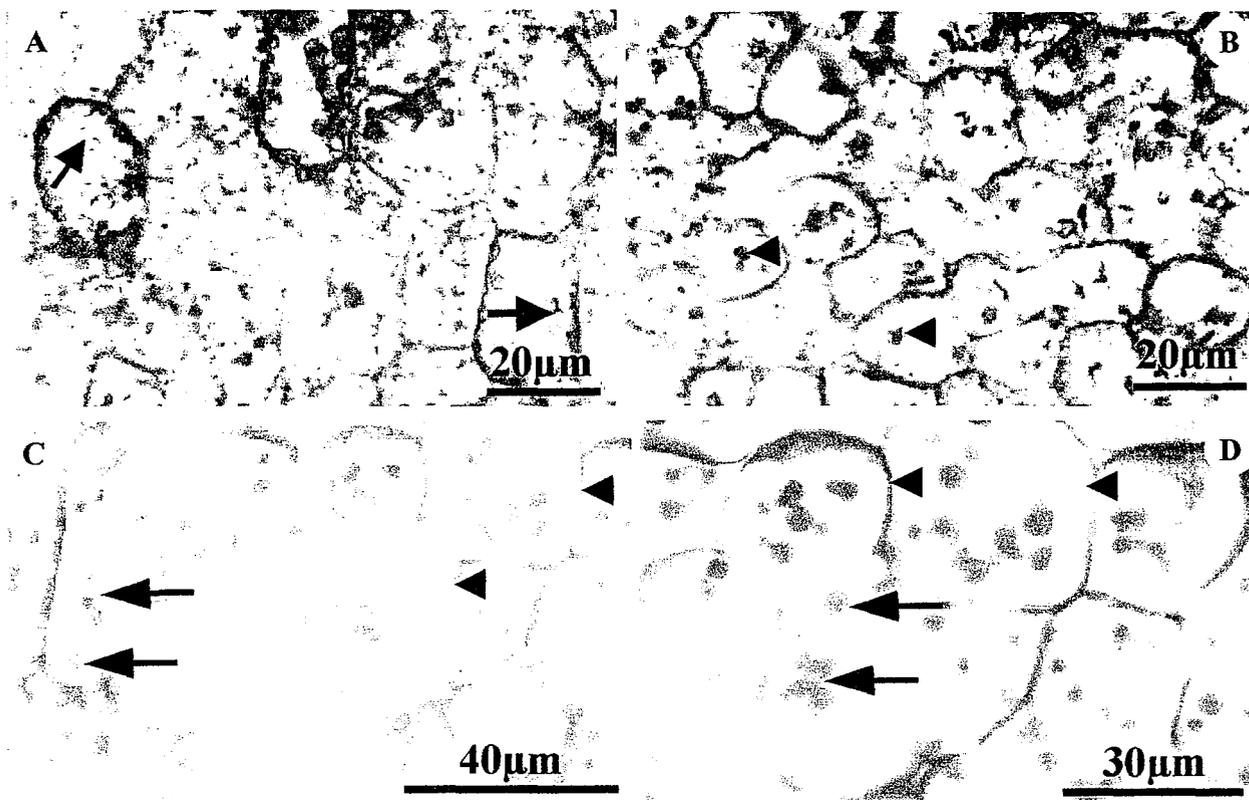


Figura 04- *T. subincanum*. **A**-células do parênquima cotiledonar com citoplasma positivo ao CBB e com idioblastos com corpos lipídicos (seta); **B**-células do parênquima cotiledonar evidenciando corpos protéicos (cabeça de seta); **C** e **D**-células do parênquima cotiledonar PAS positivas com reação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

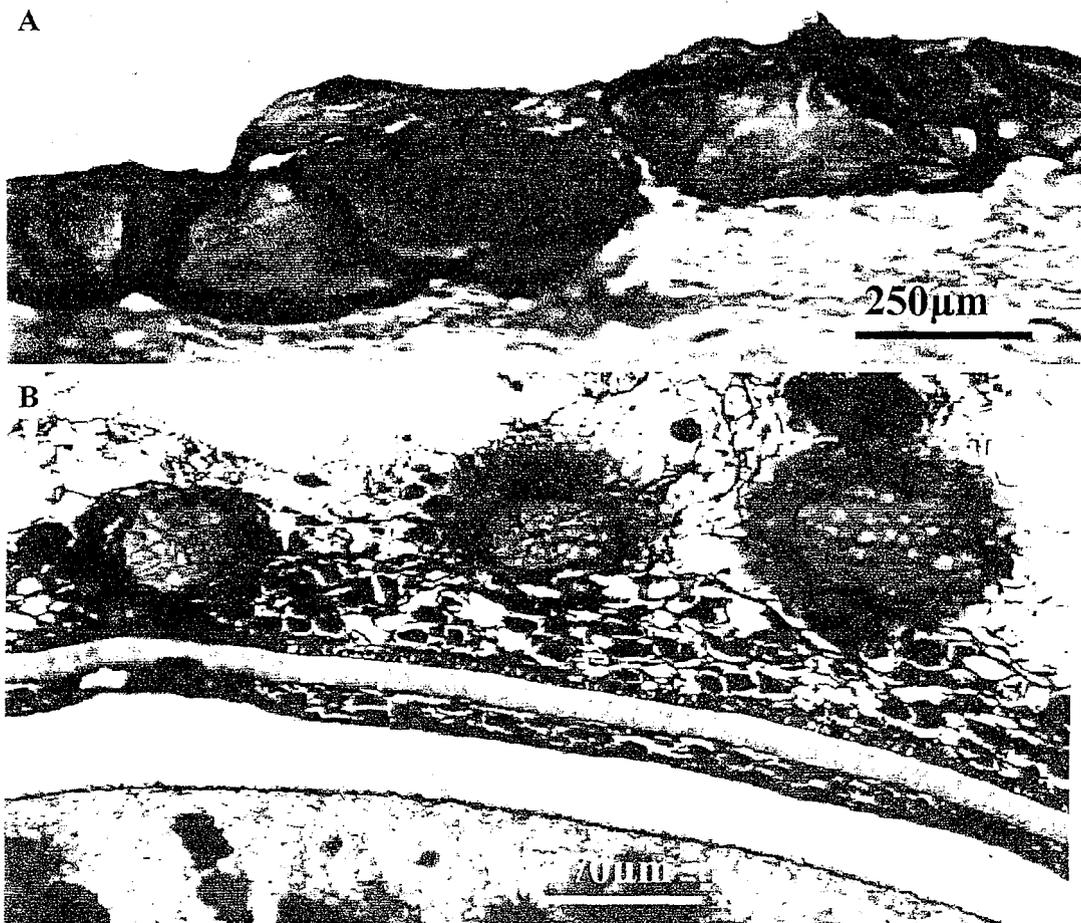


Figura 05- *T. speciosum*. **A**-idioblastos no tegumento externo AB positivos; **B**-canais de mucilagem no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O.

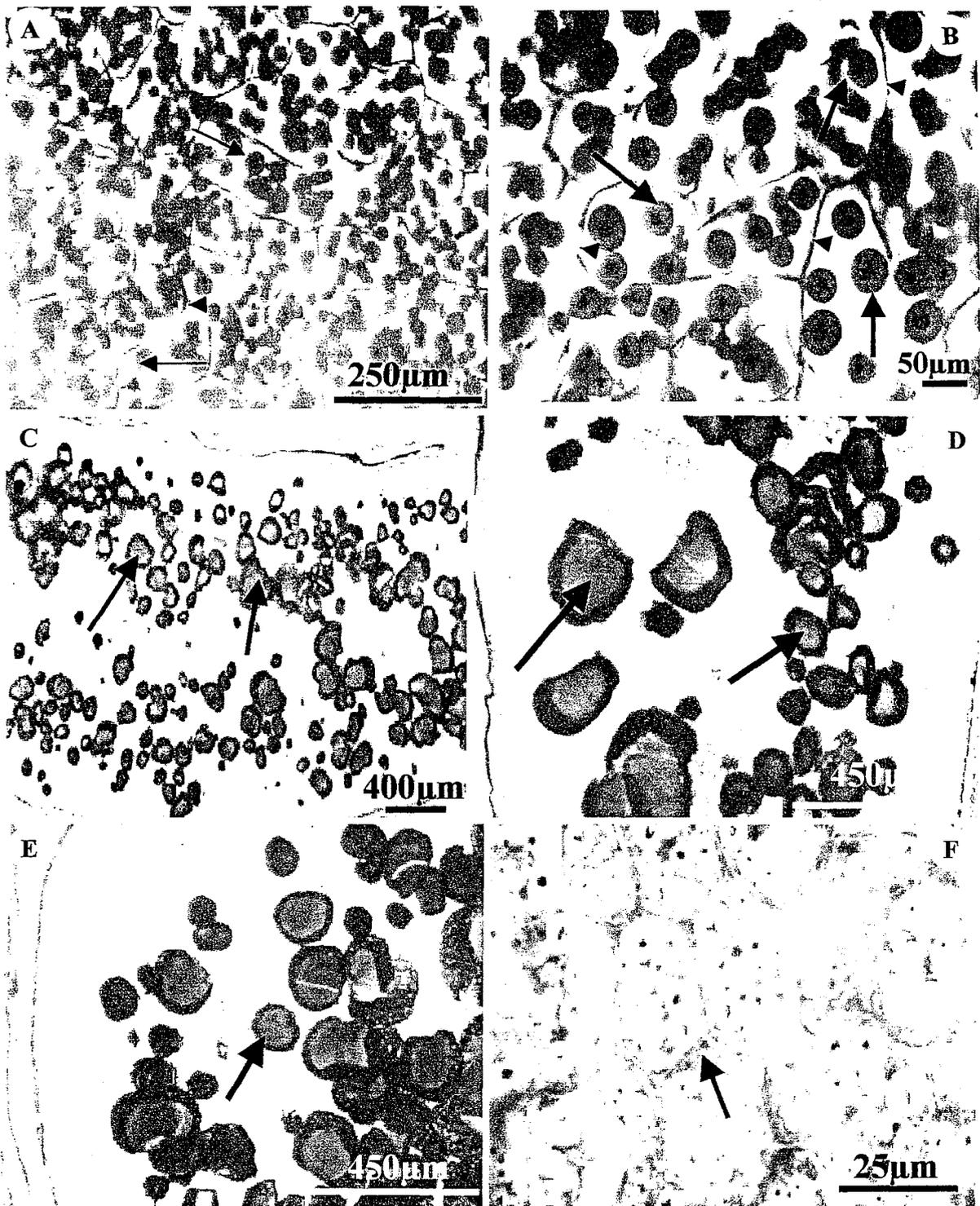


Figura 06- *T. speciosum*. A e B-células do parênquima cotiledonar PAS positivas com reação na parede celular (cabeça de seta) e grãos de amido no citoplasma (seta); C e D-idioblastos no parênquima cotiledonar mostrando reação positiva ao AB (seta); E-idioblastos no parênquima cotiledonar com reação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

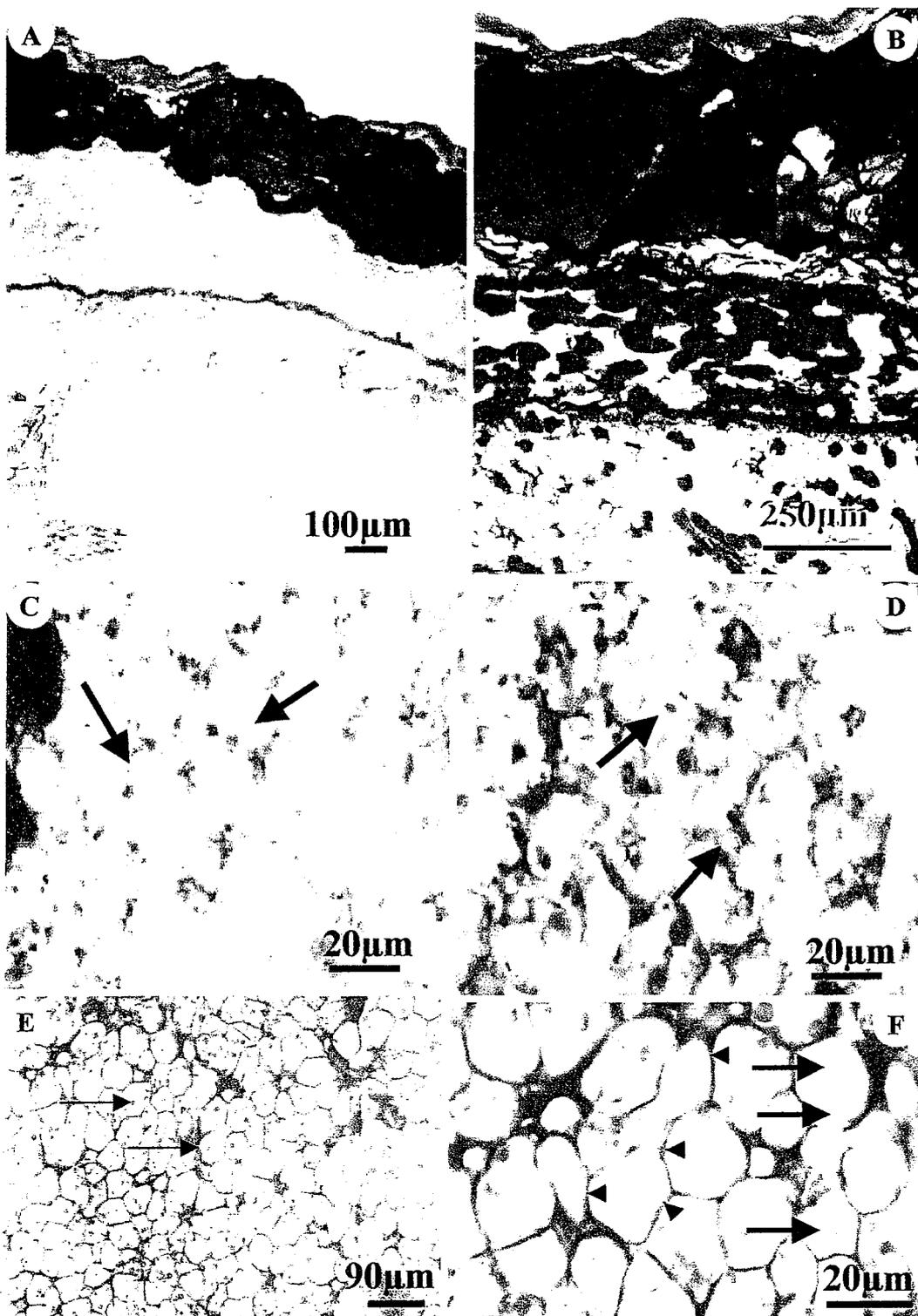


Figura 07- *T. obovatum*. A- idioblastos no tegumento externo com reação positiva ao AB; B- sacos de mucilagem (sm) no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O; C e D- granulações protéicas (seta) no parênquima cotiledonar corados com CBB; E e F- células do parênquima cotiledonar PAS positivas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

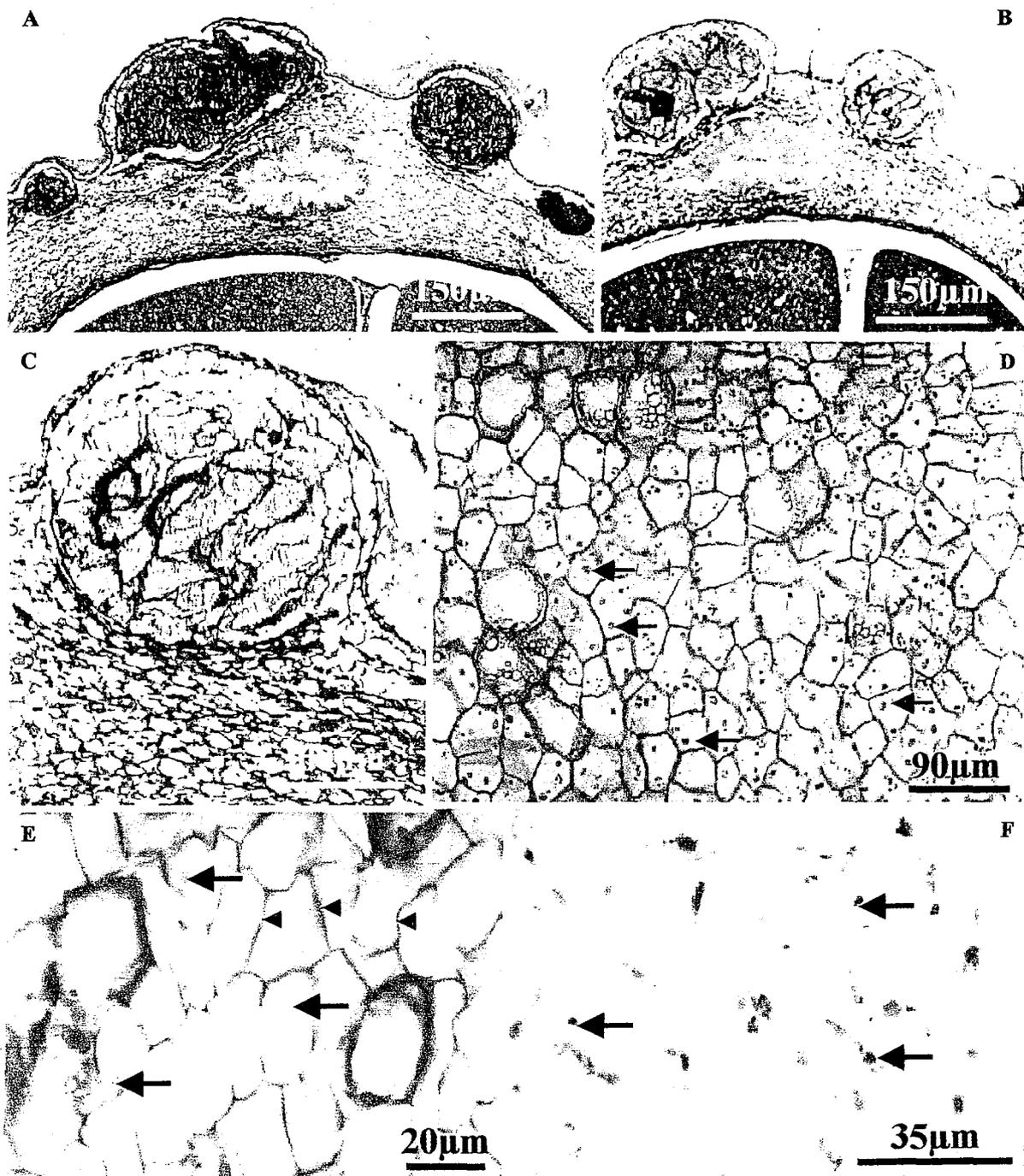


Figura 08- *T. grandiflorum* x *T. obovatum*. **A**-idioblastos com reação positiva ao AB ; **B** e **C**-idioblastos com reação metacromática ao AT-O; **D**-células PAS positivas no parênquima cotiledonar (seta) mostrando grãos de amido, parede celular (seta); **E**- células do parênquima cotiledonar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

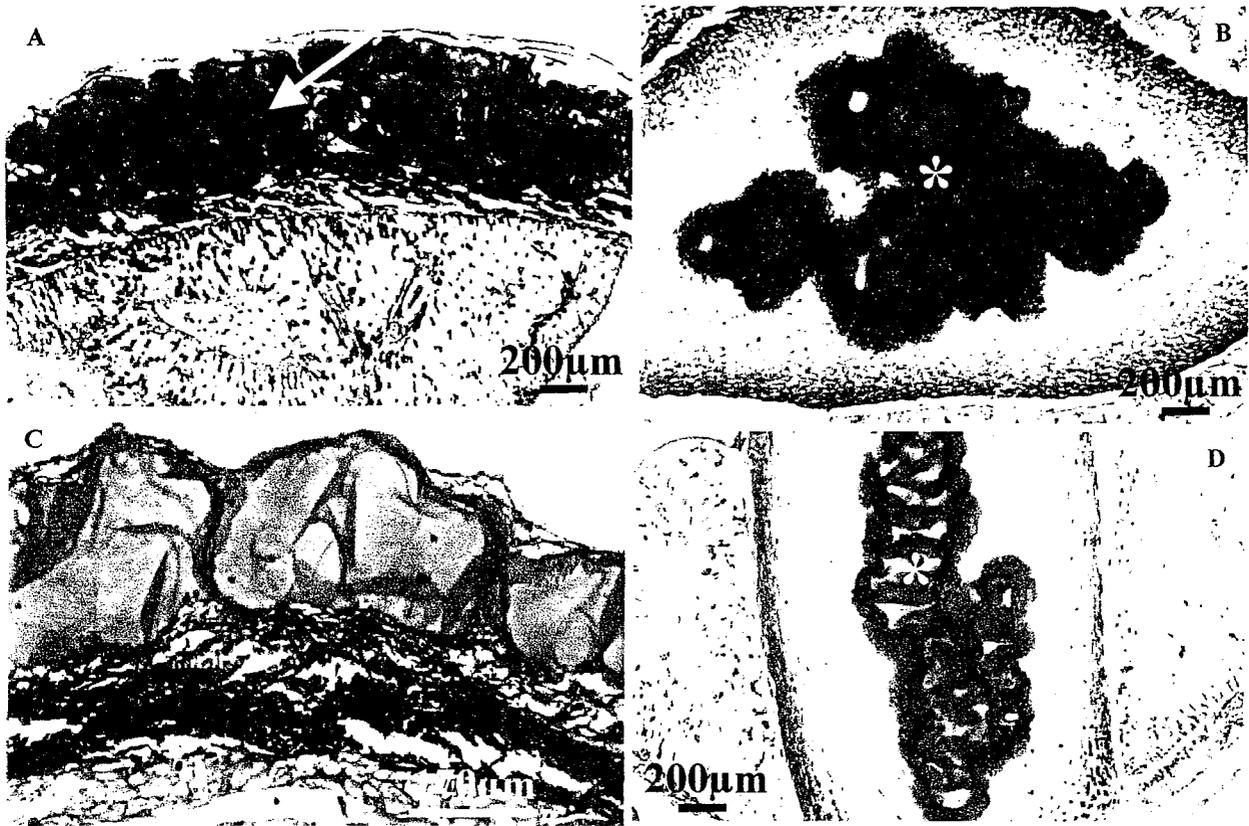


Figura 09-*T. subincanum* x *T. obovatum*. **A**-idioblastos (seta) no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O (seta); **B**-região central do eixo embrionário (*) com reação metacromática ao AT-O; **C**-idioblastos no tegumento externo AB positivos; **D**-região central do eixo embrionário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

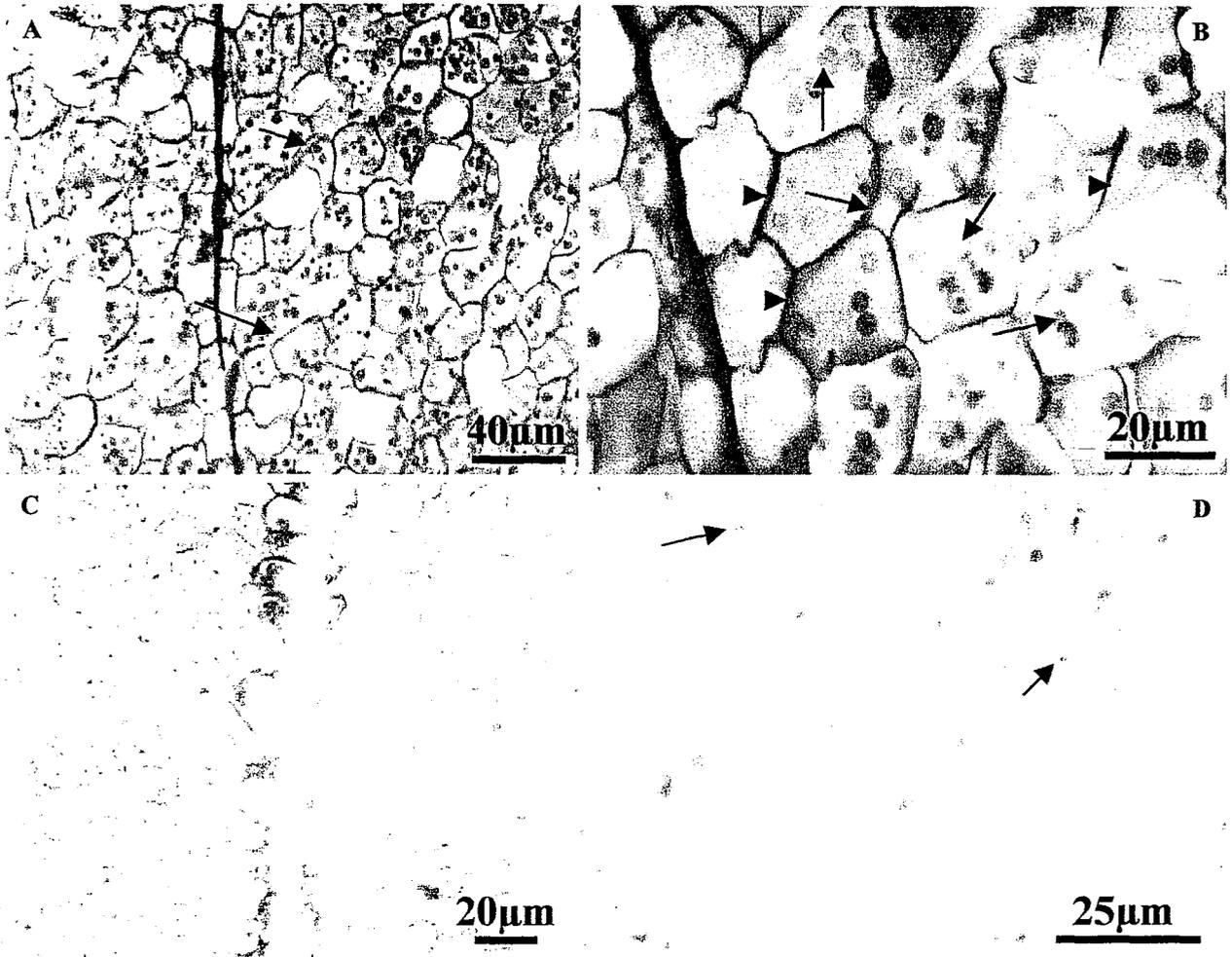


Figura 10- *T. subincanum* x *T. obovatum*. A e B-células do parênquima cotiledonar PAS positivas grãos de amido (seta); C e D-células do parênquima cotiledonar (seta) mostrando reação positiva ao CBB (evidenciando algumas granulações protéicas).

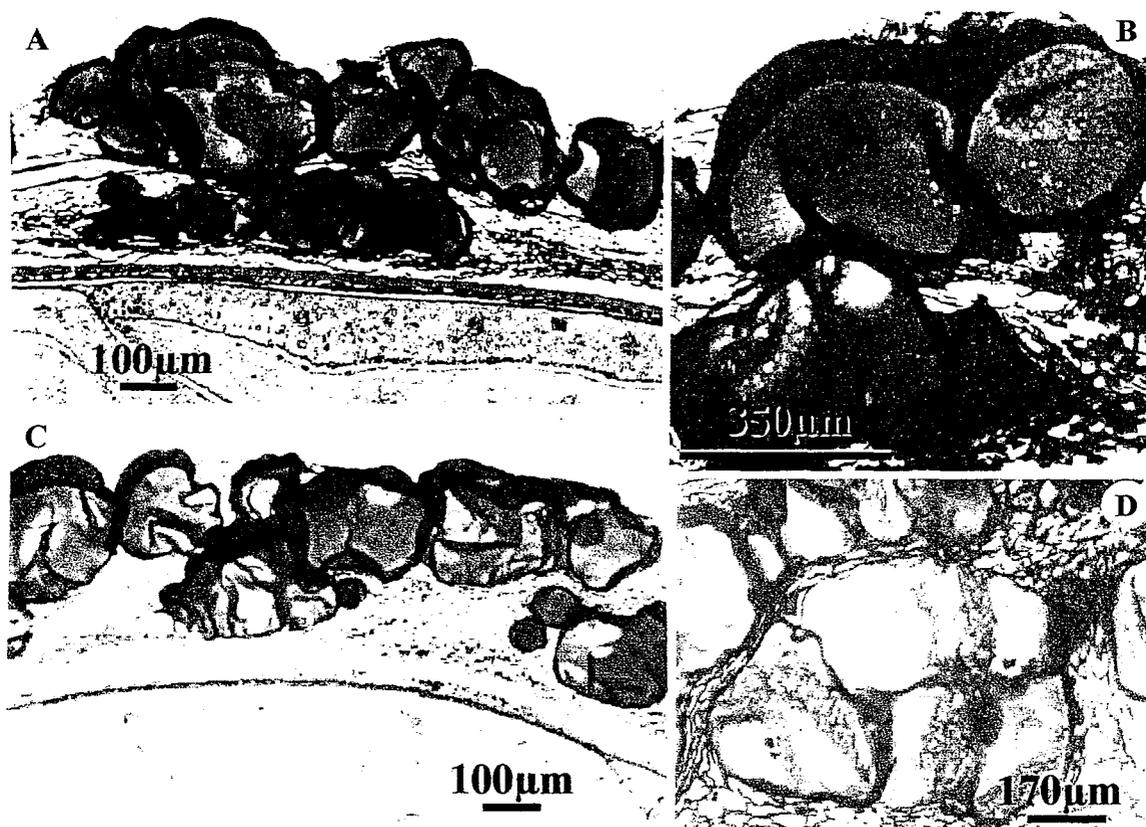


Figura 11-*T. grandiflorum* x *T. subincanum*. **A** e **B**- idioblastos no tegumento externo com reação metacromática ao AT-O; **C**-idioblastos no tegumento externo com reação positiva ao AB; **D**-detalhe dos idioblastos agrupados no tegumento externo PAS positivos.

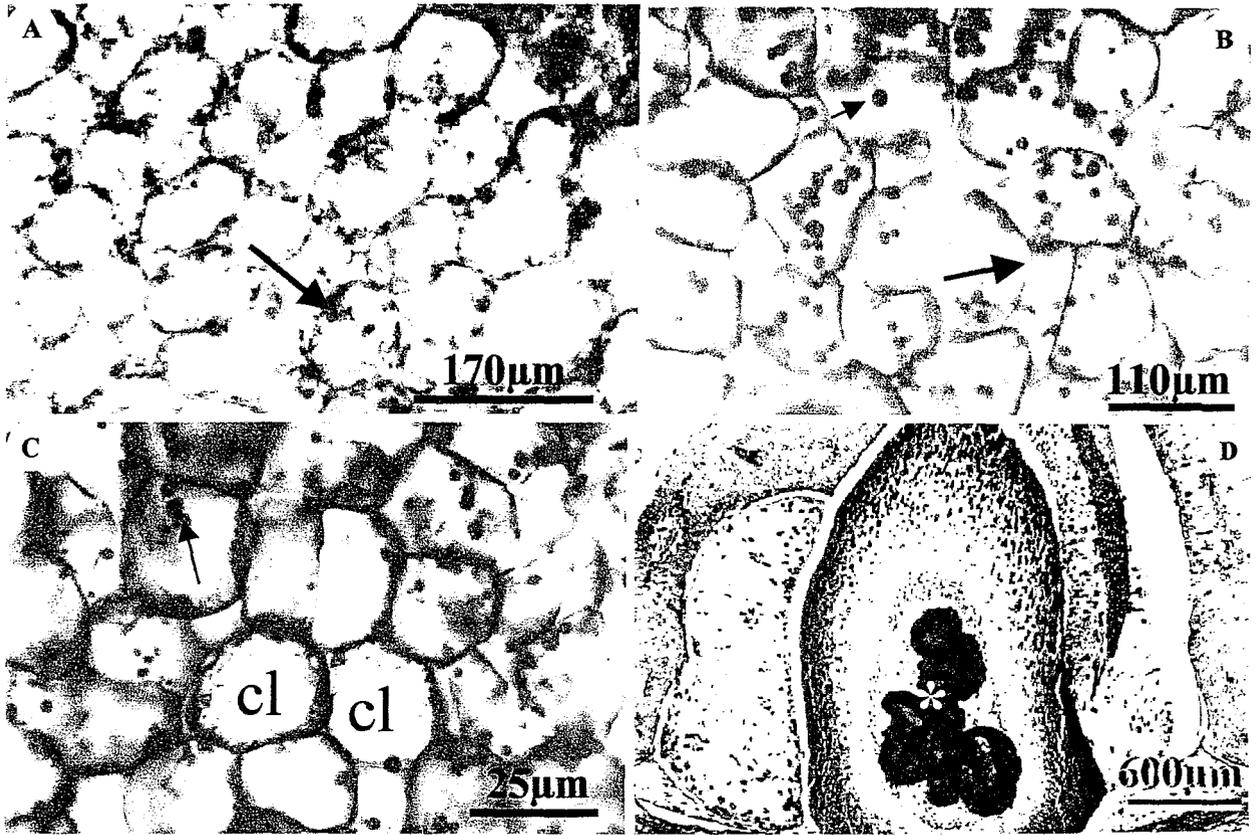


Figura 12-*T. grandiflorum* x *T. subincanum*. A-células do parênquima cotiledonar (seta) CBB positivas; B e C-células do parênquima cotiledonar (seta) positivas ao PAS e idioblastos com corpos lipídicos (cl); D-reação metacromática ao AT-O na região central do eixo embrionário (*).

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.
- 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**, 1980. 10 (2): 425.
- BARBOSA, G. & VENTURIERI, G. A. **Hibridação entre cacau (*Theobroma cacao*) e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)**, XLVI Congresso Nacional de Genética, Sociedade Brasileira de Genética, Setembro, Águas de Lindóia -SP.2000.
- BARROSO, G. M; MORIM, M. P; PEIXOTO, A. L; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: UFV, 1999, 443p.
- BARROSO, G. M; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F; COSTA, C. G. & PEIXOTO, A. L. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 1: 1-255. Rio de Janeiro. 1978.
- 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, 1990. 100p.

- BEWLEY, J. D; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2 ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.
- 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, 1982c.
- BOESEWINKEL, F. D. & BOUMAN, F. **The Seed Structure**. In: Johri, B.M. Ed. Embryology of Angiosperms. Springer-Verlag. Berlin, 1984.
- BOZZOLA, J.J; RUSSEL, L.D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. New York: Jones and Bartlett Publishers, 1992. 452 p.
- CORNER, E. J. H. **The Seeds of dicotyledons**. Cambridge: Cambridge. University Press, 1976. v. 1, 552p.
- 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 AMZÔNIA: 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. 1964- Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. **Contributions From The United States National Herbarium**, Washignton, 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**, 14 de Novembro de 19997. Campinas-SP.
- CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal**: Parte II: Órgãos Experimentos e Interpretações. São Paulo: Rocca, 1987. 304p.
- DANTAS. **Simpósio do Trópico Úmido**. Embrapa
- DANGOU JS, HOCHER V, FERRIERI N, FULCHERI C, MORARD P, ALEMANNIO 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 pre-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, J. A. ON TROPICAL TREE SEEDLINGS: I. SEEDS, SEEDLINGS, SYSTEMS, AND SYSTEMATICS. **The annals of the Missouri Botanical Garden**. Vol. 56, 1969. Pag. 125-161.
- DUCKE, A. AS espécies brasileiras de cacau (gênero *Theobroma* L.), na botânica sistemática e geográfica. **Rodriguesia**, 1940. 4 (13): 265-267, 7pl.
- DUFFUS, C. M. & SLAUGHTER, J. C. **Seed and their uses**. Jonh Wiley & Sons, New York, 1980.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: EDUSP, 1974. 239p.

FANH, A. **Anatomia vegetal**, 1984.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**. 1968, 55: 123-142.

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, 2001, p.303-309, set.

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**, 2001.

FIGUEIRA, A. Biotechnological studies in *Theobroma cacao*: Micropropagation, characterization of polysaccharides, and estimation of genetic diversity using molecular markers. Purdue, 1992. **Thesis (PhD)**- Purdue University.

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.

- GORDON, E. M. & McCANDLESS. 1973. 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.
- GREW, N. The anatomy of plants begun. London. Also in: **The anatomy of plants**. 2nd.edn.1682. Royal Society. London.
- GAHAN, P.B. **Plant histochemistry and citochemistry**. London: Academic Press. 1984.
- GATO, A. M. G. **Conservação de sementes de *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng) Schum.-Sterculiaceae**. 1992.110p. Dissertação (Mestrado)-INPA/FUA. Manaus.
- HOSKIN, J.M; DIMICK P. S & DANIEL R. R. SCANNING ELECTRON-MISCROSCOPY OF THE THEOBROMA CACAO SEED.JOURNAL OF FOOD SCIENCE, 1980.45: (6) 1358. **INST.FOOD TECHNOLOGISTS, CHICAGO**.
- HEYWOOD, V. H. **Flowering Plants of the word**. London. 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, 1940. 523p
- 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, 1997. 198 p.

- LENCI, C. G.; MARTINI, M. H.; TAVARES, D. Q.; BEGNAMI, C. N. & CORTELLAZZO, A.L. 2001. CARACTERIZAÇÃO CITOQUÍMICA DE SEMENTES DO GÊNERO *THEOBROMA*. IN: 52º Congresso Nacional de Botânica/Resumos. p.27
- 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**. 1981.1:421-432p.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry; Theoretical and applied**. London: Churchill Livingstone. 1985.
- YASSEN, M. Y; BARRINGER, S. A.; SPLITTSTOESSER, W. E. & CONSTANZA, S. 1994. The role of Seed Coat in Seed viability. **THE BOTANICAL REVIEW**, Vol. 60, N. 04, pag.427-439.
- McDOWELL, & TRUMP, 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. **Arch. Pathol Lab. Med**. 1000: 405 – 414.
- McCULLY, M. E. 1970. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Ann. N. Y. Acad. Sci**. 1970. 175: 702-711.
- 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. 1996, vol.53, no.1, p.73-73.
- NETOLITZKY, F. 1924. **Anatomie der angiosperm-samen**. In Handbuch der pflanzenanatomie (K. Linsbauer, ed.) Gerruder Borntrager, Berlim.V.10

- O'BRIEN , T. P; FEDER, N. & MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell wall by toluidine blue. **Protoplasma**. 1964. 59:39-52.
- O'BRIEN, T. P; McCULLY, M.E. **The study of plant structure, principles and slected methods**. Melbourne: Termarcarphi, 1981.
- OLIVEIRA, A. N.; QUEIROZ, M.S.M & RAMOS, M.B.P. **Revista Brasileira de Sementes**, Vol.22, 2000, n.º 2, p.193-199.
- 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.
- RAMOS, A. R. Análise comparativa de proteínas e mRNAs em plantas de cacau (*Theobroma cacao*) susceptíveis e tolerantes a vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*). **Plano de Tese de Doutorado**. UFPA/UNB, 1999.
- ROBARDS, A. W. . An Introduction to Techniques for Scanning Electron Microscope of Plant Cells. In: **Electron Microscope and Citochemistry of Plant Cells**. (J.L. Hall, ed.), Elsevier New York, 1978.
- ROCAS, A. N. 1988. **SEMILLAS DE ÁRBOLES Y ARBUSTOS.**: Ontogenia y Estructura. 1ed. México.
- SASS, J.E. **.Botanical microtechnique**. Iowa: Iowa College Press. 1951, 228p.
- SCHUMANN, K. .1886a. Streculiaceae. In: Martius, C., **Flora Brasiliensis**. 12 (3): 2-114, fig. 1-24.

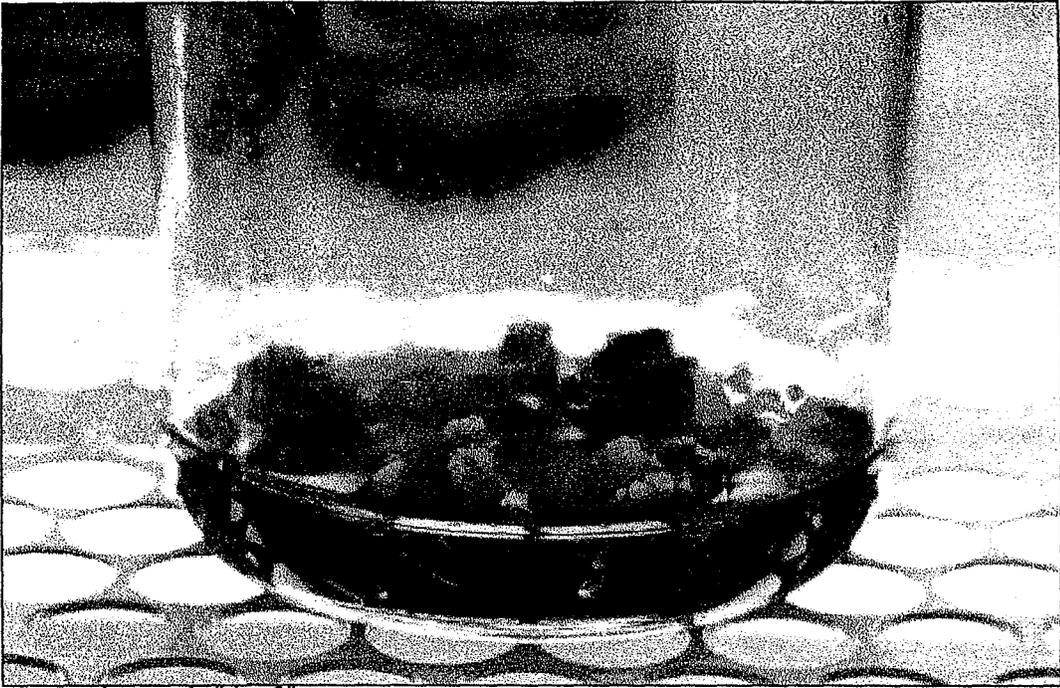
- SCHUMANN, K. Sterculiaceae, In: Engler, A. & Prantl, H. **Die natürlichen Pflanzenfamilien**. Leipzig. Wilhelm. Engelmann. 1895. 3 (6): 69-99.
- SILVA, J. A. C. STERCULIACEAE VENT. RESERVA FLORESTAL DUCKE. MANAUS-AM. **Dissertação de Mestrado**, INPA-MANAUS, 1998.
- SILVA, C. R. S. FILOGENIA DO GÊNERO *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. 1992. **Tropical Forests and Their Crops**. Ithaca: Canstock Publishing Associates, Cornell University Press, 1992, 568 p.
- 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, p.365-375,dez.2001.
- STUESSY, E. **Plant Taxonomy. The evolution of comparative data**. New York: Columbia University Press. 1991. 514p.
- TARODA, N. O Gênero *Sterculia* L. no Brasil, **Master's tese**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil. 1980.

- TIFFNEY, B. H. 1984. SEED SIZE, DISPERSAL SYNDROMES, AND THE RISE OF THE ANGIOSPERMS : EVIDENCE AND HYPOTHESIS. **Annals of The Missouri Botanical Garden**. Vol. 71.
- TIFFNEY, B. H. 1977 a. Fossil angiosperm fruits and seeds. **J. seed Technol.** 2, 1977a. 54-71.
- 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**, 1984. pp. 37-50.
- VENTURIERI, G. A. Cupuaçuzeiro- Fruteira típica da Amazônia com perspectiva para a exportação. Informativo Soc. Bras. 1984. **Fruticultura**. 3 (4): 7
- VENTURIERI, G.A. **Cupuaçu**: A espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: clube do cupú, 1993. 108p.
- 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**. 1998. 105 pag. datil. Belém, PA. (em inglês e português). 95p.
- 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**. 1999. 79 pag. datil. Belém, PA.

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, p.128-138, 1999.



- Bertrand, B. 1987. Quelques aspects du microbouturage du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). *Café Cacao Thé*, 31: 175-182
- Blake, J. & Maxwell, P. 1984 Tissue culture propagation of cacao by the use of axillary buds. *Proc. Int. Conf. Cocoa Cocomuts*. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Dufour, M. & Dublin, P. 1985. Quelques données nouvelles sur l'induction et le développement d'embryons somatiques chez *Theobroma cacao*. *Café Cacao Thé*, 29: 235-244
- Ferreira, M. das G. R.; Cárdenas, F. E. N.; Carvalho, C. H. S. de; Carneiro, A. A. Damião Filho, C. F. 2001. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. *Rev. Bras. de Fruticultura*. 23(3): 473-476.
- Figueira, A. & Janick, J. 1994. Optimizing carbon dioxide and light levels during in vitro culture of *Theobroma cacao*. *Journal of the American Society of Horticulture Science*, 119 (4): 865-871.
- Figueira, A., Whipkey, A., Janick, J., 1991. Increased CO₂ and light promote in vitro shoot growth and development of *Theobroma cacao* L. *Journal of the American Society of Horticulture Science*, 116: 585-589
- Flynn, W.P., Glicenstein, L.J., Fritz, P.J., 1990. *Theobroma cacao* L.: An axillary bud in vitro propagation procedure. *Plant Cell Org. Tiss. Cult.*, 20: 111-117.
- Janick, J.; Whipkey, 1985. A. Axillary proliferation of shoots from cotyledonary nodal tissue of cacao. *Revista Theobroma*, 15: 125-131.
- Legrand, B., Mississo, E. 1986. E. Influence de la taille des explantats et des régulateurs de croissance sur le développement des tissus de *Theobroma cacao* L. var. *Amelonado* cultivés in vitro. *Café Cacao Thé, Paris*, 30: 239-246
- Li, Z.; Traore, A.; Maximova, S.; Gultinan, M. J. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using Thidiazuron. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 34: 293-299.
- Orchard, J.E., Collin, H.A., Hardwick, K. 1979. Culture of shoot apices of *Theobroma cacao* L. *Physiol. Plant*, 47: 207-210.
- Passey, A.J.; Jones, O. P., 1983. Shoot proliferation and rooting in vitro of *Theobroma cacao* L. type Amelonado. *Journal of Horticultural Science*, 58: 589-592.
- Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. 1981. *The Principles and Practice of Statistics in Biological Research* (2nd ed.). San Francisco: State University of New York at Stony Brook, 776 p.
- Tan, C.L.; Furtek, D.B. 2003. Development of an in vitro regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. *Plant Science*, 164: 407-412.
- Velho, C. C.; Whipkey, A.; Janick, J. 1988. Cupuassu, a new beverage crop for Brazil. In: *Advances in New Crops*. Proceeding of the First National Symposium, *New Crops: Research, Development, Economics*. Janick, J. Simon, J.E. eds. Indianapolis, Indiana, oct. 23-26.
- Venturieri, G. A. 1993. *Cupuacu: A Espécie, sua Cultura, Usos e Processamento*. Clube do cupu, 118p. Belém PA.
- Von Arnold, S., Eriksson, T. 1981 In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.*, 59: 870-874.



branco do "tipo 3".

Figura 1: Calos formados em cotilédones do híbrido de *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum*. Os calos marrons escuros são do "tipo 1", os marrons claros são do "tipo 2", e branco do "tipo 3".

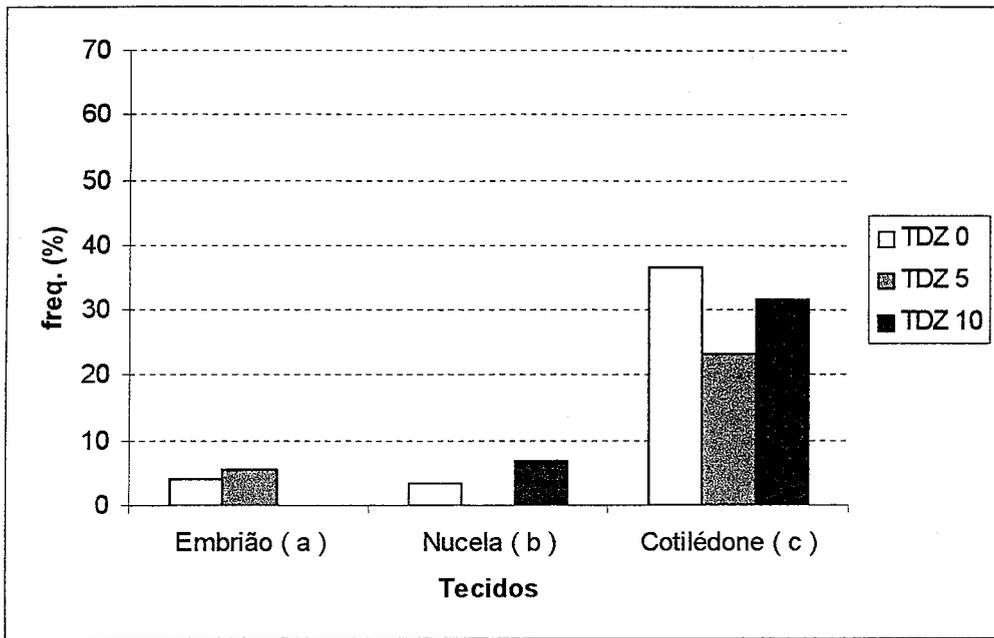


Figura 2: Frequência de calos formados por tipo de tecido. As médias diferiram entre si ao nível de 5%.

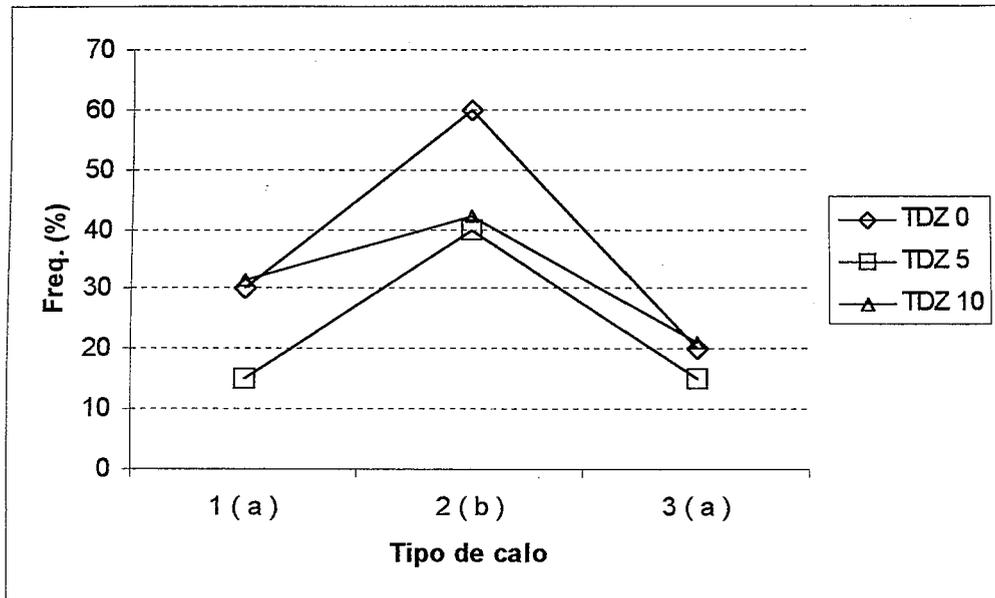


Figura 3: Frequência de calos formados por frasco em explantes de cotilédones. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5%.

Tabela 1: Valores médios da proporção (%) da cobertura de calo por dosagem de TDZ x tipo de tecido usado no explante.

Tratamento	Tecido			Média/dosagem de TDZ (%)
	Embrião (%)	Tegumento (%)	Cotilédone (%)	
TDZ 0	2,0	2,0	2,0	2,0
TDZ 5	0,4	0,7	9,1	3,4
TDZ 10	1,1	0,0	7,1	2,7
Média/tecido	1,2	0,9	6,1	

Tabela 2: Valores médios da proporção (%) da cobertura de calo por dosagem de TDZ x tipo de calo obtido em cotilédones.

Tratamento	Tipo de calo			Média/dosagem de TDZ (%)
	1 (%)	2 (%)	3 (%)	
TDZ 0	8,3	36,5	2,1	2,0
TDZ 5	4,1	33,3	2,0	15,6
TDZ 10	22,1	20,9	7,7	13,1
Média/tipo de calo	11,5	30,2	3,9	



Figura 4: Embriões somáticos do híbrido de *T. grandiflorum* x *T. obovatum* derivados de calos obtidos de explante de cotilédone.

CALOGÊNESE DO CACAU (*THEOBROMA CACAO*), CACAÚ (*T.SPECIOSUM*) E DO CUPUAÇU (*T. GRANDILFORUM*) USANDO 2,4-D E BAP¹

Giorgini Augusto Venturieri²
Giorgio Cristino Venturieri³

RESUMO: A calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por orogênese ou embriogênese somática. É útil também para produzir células para manipulações genéticas como poliploidizações, transformações e transferência de cromossomos com genes de importância econômica para as espécies mais comerciais. O gênero *Theobroma* tem o cacau, fonte da matéria prima para fabricação de chocolate. No presente trabalho a calogênese de 3 espécies deste gênero (cacau, cacaú e o cupuaçu) são avaliadas. Os explantes usados foram postos para desenvolver em condições estéreis em meio de cultura LPM (macro, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos do meio) (Von Arnold & Erikson, 1981) acrescido de água de coco (50 ml/l), glucose (20 g/l); 2-4 D (2 mg/l) combinado com BAP nas concentrações de 0; 1 e 2 mg/l x três tipos de tecido (tegumento, cotilédone e embrião). Como gelificante usou-se gelrite a 2,2 g/l. O pH usado foi 5,8. O cotilédone foi o tecido mais responsivo e o que gerou maior percentagem de cobertura de calos friáveis e brancos. Observando-se a curva de respostas para o cotilédone, nota-se que a dosagem ideal de BAP para o cacau estaria em torno de 1mg/l. Para as demais espécies o máximo foi obtido com 2mg/l mas dá indicadores de que se teria uma melhor performance se esta dosagem fosse aumentada. Houve discrepância nas respostas aos tratamentos dentro de cada espécie mostrando ser esta genótipo específica.

Palavras - chave: cultura-de-tecido, micropropagação

¹Estudos financiados pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) Programa do Trópico Úmido (PTU) (proc. n° 469915/00-5).

²Professor Doutor da Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, 88.040-900, Florianópolis - SC, Brasil, giorgini@ccb.ufsc.br

³Eng. Agrônomo. D.Sc. da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa. Postal 48, CEP: 66.095-100, Belém, PA, giorgio@cpatu.embrapa.br.

CALOGÊNESIS OF COCOA (*T. CACAO*), CACAUÍ (*T. SPECIOSUM*) AND CUPUASSU (*THEOBROMA GRANDILFORUM*) USING 2,4-D AND BAP

ABSTRACT: Calogenesis is a basic step for the development of systems of mass propagation of plants by organogenesis or somatic embryogenesis. It is also useful to produce cells for genetic manipulation as somatic hybridisation, poliploidization, transformation and chromosome transference carrying genes of economic importance for more economic species. The *Theobroma* genus have cocoa, font of *materia prima* for chocolate industry. At the present work the calogenesis of 3 species of this genus (cocoa, cacauí and cupuassu) are evaluated. Explants used were layered to develop in sterile conditions in LPm media (macro, micronutrientes, vitamins and aminoacids of the media) (Von Arnold & Erikson, 1981) added with coconut milk (50 ml/l), glucose (20 g/l); 2-4 D (2 mg/l) combined with BAP at concentration of 0; 1 e 2 mg/l x 3 different tissues (tegument, cotyledon and embryo). As a gelificant was used-se *gelrite* at 2,2 g/l. The used pH was 5,8. Cotyledon was the most responsive tissue and generated the highest percentage of white and friable callus. Observing the curve of response for cotyledon was noticed that for cocoa the ideal dosage of BAP would be around 1mg/l. For the other species the maximum was obtained with 2 mg/l indicating that a better performance would be achieved if this dosage would be increased. Discrepancies of treatment responses within species was observed showing a genotype specificity.

Key words: tissue-culture, micropropagation

INTRODUÇÃO:

O gênero *Theobroma* tem espécies de importância econômica mundial, como o cacau, fonte da matéria prima para fabricação de chocolate. O cacauí, não tem importância econômica atual. É consumido mais como uma fruta "do mato", algumas vezes encontrado nas feiras da amazônia (Cavalcante, 1988). No entanto, é uma espécie cujo o perfil da gordura extraída das suas semente, mais se aproxima da do cacau (Silva, 2000). Desta espécie pode-se também fazer um excelente chocolate (Ducke, 1953), tornando-a uma possível sucedâneo do cacau. O cupuaçu é outra espécie do gênero e que começa a ficar importante. Atualmente a sua polpa vem sendo usada na indústria de sucos, mas as amêndoas ainda são pouco utilizadas embora delas possa ser fabricado um produto similar ao chocolate de cacau e cosméticos (Venturieri, 1993).

A formação de calos em um explante, ou seja calogênese, é uma etapa básica para o desenvolvimento de sistemas de propagação massiva de plantas por oragonênese ou embriogênese somática. É útil também quando se deseja produzir células para manipulações genéticas como hibridações somáticas, poliploidizações e transformações.

Das 8 espécies amazônicas de *Theobroma*, a propagação *in vitro* de apenas duas delas tem sido avaliada. Para *T. cacao* tem-se feito consideráveis esforços para estabelecer um método de propagação baseado em cultura de tecidos. Porém, a recalitrância *in vitro* do cacau e a grande influência do genótipo na formação de calos dificultou a obtenção de um sistema de micropropagação via organogênese ou desenvolvimento de gemas axilares (Orchard *et al.*, 1979; Passey & Jones, 1983; Blake & Maxwell, 1984; Janick & Whipkey, 1985; Dufour & Dublin, 1985; Legrand & Mississo, 1986; Bertrand, 1987; Flynn *et al.*, 1990; Figueira *et al.*, 1991; Figueira & Janick, 1994; Tan & Furtek, 2002). Um sistema eficiente de propagação foi desenvolvido por Li *et al.* (1998) com procedimentos para estimular a

embriogênese somática e a regeneração de plantas a partir de tecidos florais (estaminódios), pela utilização de 3 etapas no cultivo (indução de calos, desenvolvimento de embriões e regeneração de plantas) em combinação com o uso da citocinina sintética TDZ (Thidiazuron) e da auxina sintética 2,4-D. Os resultados de Li *et al.* (1998) foram os mais promissores, com 100% dos estaminódios cultivados do genótipo Sca6-1 produzindo, em média, 45 embriões somáticos por estaminódio. Estaminódios de vários outros genótipos foram testados (num total de 19 genótipos) e todos foram responsivos às condições de cultura, em taxas que variaram de 1 a 100 % de eficiência, cada qual produzindo em média de 1 a 46 embriões. Esses resultados demonstraram, uma maior aproximação da utilização, no futuro, de embriões somáticos obtidos em laboratório na propagação clonal de cacauzeiros. Uma outra espécie de *Theobroma* estudada foi o cupuaçu (*T. grandiflorum*). Embriões imaturos desta espécie foram retirados de sementes e cultivados em meio MS suplementado com 2,4-D (1mg/l) e água de coco (10 ml/l) tendo sido obtido calos (Velho *et al.* 1988). Segmentos de eixo embrionário e de cotilédones foram cultivados em meio MS 1/2 + 2,4-D (1;2;4 e 8 mg/l); sais do MS 1/1 (SIGMA) acrescido de ANA (3mg/l); sais do N6 (SIGMA) 4g/l + 2,4-D (0;2;4 mg/l) e ANA (0;3;5 mg/l); sais do N6 (SIGMA) acrescido somente de ANA (3mg/l). Calos brancos e brilhantes foram observados nos explantes testado no meio MS + 2,4-D (1 e 2 mg/l). A combinação de ANA (3 mg/l) e 2,4-D (2mg/l) promoveram a formação de calos brancos e raízes, mas não foi quantificada a sua eficiência em relação aos demais tratamentos (Ferreira *et al.* 2001). Ainda no gênero *Theobroma* foi estudada a calogênese do híbrido interespecífico *T. grandiflorum* x *T. obovatum*. Os explantes usados (tegumento, cotilédone e embrião) foram cultivados em meio LPM mais água de coco (50 ml/l), glucose (20 g/l); 2,4 - D (2mg/l); Thidiazuron - TDZ nas concentrações de 0; 5 e 10 µg/l, carvão ativado (2 g/l) em gelrite (2 g/l) a um pH de 5,8. Os explantes de cotilédones foram os que formaram calos em maior frequência. Para este, notou-se que não houveram diferenças tanto para tipo de calo como para dosagem de TDZ. Foi observado que quanto menor a dosagem de TDZ maior a frequência de calos obtidos. Não foi constatada interação entre tipo de calo/frasco x dosagem de TDZ (Venturieri & Venturieri, 2003).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a calogênese de 3 diferentes tecidos obtidos da semente como o primeiro estágio para a obtenção de plântulas *in vitro* de três espécies do gênero *Theobroma*, o cacau o cacauí e o cupuaçu.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos completamente desenvolvidos, porém não completamente maduros e ainda portando o pedúnculo e um pedaço de ramo, das espécies: cacau (*T. cacao* matrizes CA-1, CA -2 e CA -3, procedentes do experimento JICA - competição de progênes); cupuaçu (*T. grandiflorum* matrizes GR 215; GR 624 e GR 1047, procedentes do experimento JICA - competição de clones) e cacauí (*T. speciosum* matrizes SEC31X SEC44Z SEC48X, procedentes da coleção "Addison O'Neil"). Todas as matrizes estão localizados na EMBRAPA - Amazonia Oriental em Belém - PA. Os frutos foram coletados em 16/10/2001 e envolvidos em papel jornal, mantidos em sacos plásticos e transportados para Florianópolis - SC. No dia seguinte, os sacos plásticos foram abertos e mantidos à temperatura ambiente dentro de laboratório por 4 dias quando foram então usados. Para a obtenção dos explantes, o fruto foi inicialmente esterilizado por imersão em Etanol 95% (1 min.) seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 40:60 v/v do produto comercial com 2,5% de cloro ativo: água, mais 3 gotas de detergente de uso doméstico (20 min.). As sementes foram extraídas do fruto e

despolpadas dentro do fluxo laminar e re-imersas em uma nova solução de hipoclorito na mesma concentração no tempo já citados. Foram então enxaguadas 3 vezes em água deionizada estéril por 1 minuto em cada vez. Os explantes, (tegumento, cotilédone e embrião) retirados das sementes, foram postos para desenvolver em condições estéreis em meio de cultura LPM (macro, micronutrientes, vitaminas e aminoácidos do meio) (Von Arnold & Erikson, 1981) acrescido de água de coco (50 ml/l), glucose (20 g/l); 2-4 D (2 mg/l) combinado com BAP nas concentrações de 0; 1 e 2 mg/l x três tipos de tecido. Como gelificante usou-se gelrite a 2,2 g/l. O pH usado foi 5,8. Para cada tratamento, foram utilizados 2 frascos, com capacidade para 500 ml, cada um contendo 40 ml de meio. Em cada frasco foram, colocados 5 explantes (repetições). As culturas foram mantidas no escuro, à temperatura de 22 ± 2 °C. No dia 22/11/2001, 33 dias após a colocação nos meios de cultura, a emissão de calos foi avaliada pela sua presença/ausência e extensão da proporção da área exposta do explante (acima do meio de cultura) que formou calo. A qualidade do calo foi avaliado subjetivamente atribuindo-se nota de 1 a 3 sendo: 1 calos amarelados, translúcidos formando uma superfície lisa; 2 = calos amarelados, levemente opacos e friáveis; 3 = Calos brancos, opacos, brilhantes e friáveis.

Para as análises estatísticas, os dados foram transformados para o arco seno da raiz de p , onde p = a proporção (Sokal & Rohlf, 1981) e submetidos a análise de variância. A comparação de médias foi feita pelo teste de t de Student usando o pacote estatístico Bioestat (Ayres *et al.*, 1998). Gráficos e tabelas foram elaborados usando a frequência de calos (em porcentagem) e porcentagem de cobertura dos calos do tipo 3 obtidos por tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas três espécies estudadas a formação de calos iniciou-se ao longo da segunda semana de cultivo, a partir de pontos que se expandiam, e recobriam a superfície do explante. Os calos do tipo 2 e 3, considerados de média a elevada capacidade embriogênica tiveram comportamento semelhante em cada dosagem de BAP aplicada. Os calo do tipo 1, considerado como de menor capacidade embriogênica, mostrou-se negativamente associados aos de maior capacidade embriogênica, sugerindo que a formação do calo 1 é um estágio primário de desenvolvimento inibido de prosseguir em direção aos calos do tipo 2 e 3 (figura 1 a, b e c).

Em todas as espécies os tecidos que mais responderam a formação de calos foram os o embrião e o cotilédone (tabela 1). O tegumento teve uma resposta muito pequena e possivelmente devido a resquícios de cotilédone que permaneceram aderidos a ele causando uma falsa impressão de que seria a "nucela" que estaria gerando calos, que estudos anatômicos mostraram não está presente nas espécies estudadas (Santos, em preparação).

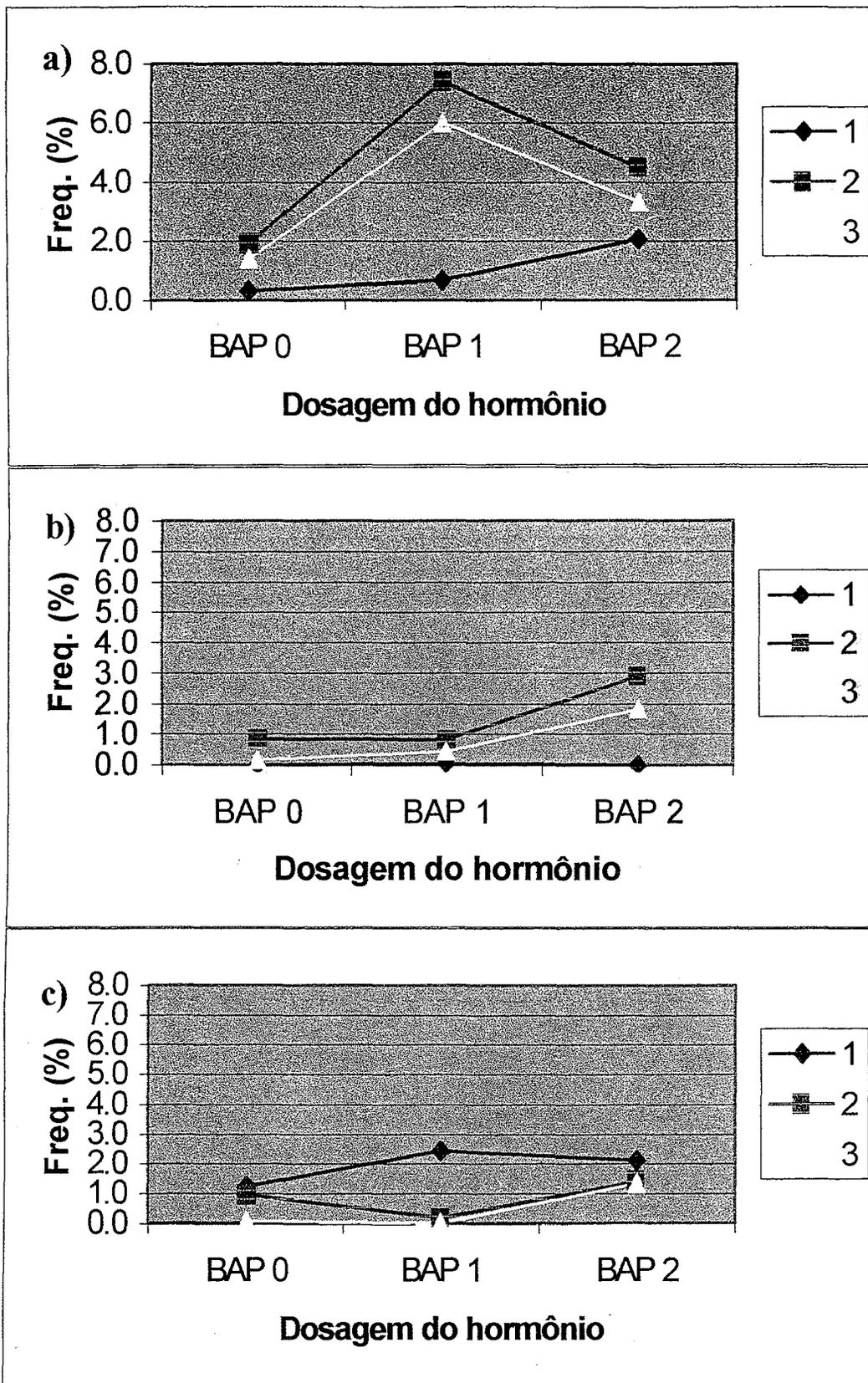


Figura 1: Tipo de calo obtido por dosagem de hormônio. a) Cacao (*T. cacao*); b) Cacaúí (*T. speciosum*) e c) Cupuaçu (*T. grandiflorum*).

Tabela 1: Frequência média de explantes responsivos por espécie. Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5%.

Espécie	Variedade	Freq. de explantes responsivos (%)		
		Embrião	Tegumento	Cotilédone
Cacao	CA-1	66.7	0.0	70.0
	CA-2	30.0	0.0	100.0
	CA-3	50.0	0.0	80.0
	Média	48.9a	0.0b	83.3a
Cacauí	SEC31X	100.0	0.0	40.0
	SEC44Z	0.0	20.0	10.0
	SEC48X	0.0	20.0	100.0
	Média	33.3a	13.3a	50.0a
Cupuaçu	GR215	30.0	0.0	90.0
	GR624	0.0	0.0	20.0
	GR1047	0.0	30.0	0.0
	Média	10.0a	10.0a	36.7a
Média geral		30.7	7.8	56.7

Uma avaliação mais pragmática seria através da proporção de cobertura do explante com calos do tipo 3 devido ao seu maior potencial embriogênico. Com base nesta variável são apresentadas a seguir as estatísticas por cada espécie estudada.

Cacau

Os valores médios por variedade estão apresentados na tabela 2. A dosagem de BAP 1 foi a mais efetiva para induzir calo do tipo 3, dando em média 6% de cobertura e o cotilédone o tecido que mais apresentou-se coberto com calos do tipo 3 com um média de 9,0% (figura 2). Os tecidos tegumento e embrião não diferiram estatisticamente entre si tendo apresentado os piores resultados (tabela 2).

Tabela 2: Valores da proporção de calo do tipo 3 por tratamento em cacau (*T. cacao*). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%.

Variedade	Tecido	BAP 0	BAP 1	BAP 2	Média/tecido
CA 1	Embrião	1.11	3.33	1.40	1.03 a
CA 2	Embrião	0.00	0.00	0.50	
CA 3	Embrião	0.00	2.20	0.70	
média/dosagem de BAP		0.37	1.84	0.87	
CA 1	Tegumento	1.00	0.00	0.20	0.13 a
CA 2	Tegumento	0.00	0.00	0.00	
CA 3	Tegumento	0.00	0.00	0.00	
média/dosagem de BAP		0.33	0.00	0.07	
CA 1	Cotilédone	0.00	11.00	12.00	9.56 b
CA 2	Cotilédone	6.20	9.60	8.56	
CA 3	Cotilédone	4.20	28.00	6.50	
média/dosagem de BAP		3.57	16.20	9.02	
Média geral/dosagem de BAP		2.09 a	9.02 b	4.98 a	

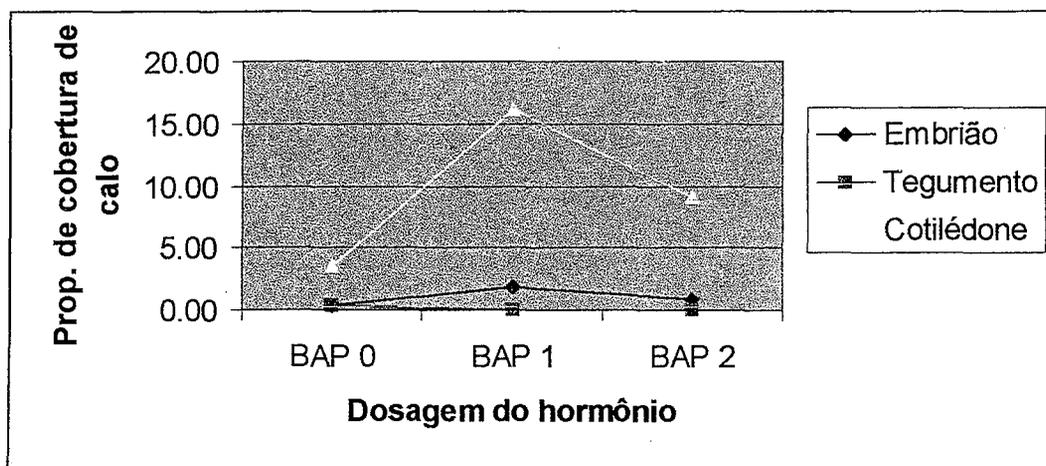


Figura 2: Efeito da dosagem de hormônio sobre a formação de calos do tipo 3 em cacau (*T. cacao*).

Para o cacau não foi evidenciada interação entre dosagem do hormônio, tipo de tecido do explante e variedade usada (tabela 3).

Tabela 3: Resultado da análise de Variância para interação entre os tratamentos aplicados para o cacau (*T. cacao*) usando a variável arco seno da raiz da proporção de cobertura com calos do tipo 3.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	(p)
Dosagem de BAP (A)	2	0.0439	0.0220	---	---
Explante (B)	2	0.3653	0.1826	---	---
Variedade (C)	2	0.0071	0.0036	---	---
Interação A x B	4	0.0637	0.0159	2.8711	0.0954
Interação A x C	4	0.0241	0.0060	1.0836	0.4264
Interação B x C	4	0.0358	0.0089	1.6120	0.2614
Erro (A x B x C)	8	0.0444	0.0056	---	---

Se o efeito de variedade for excluído da análise, nota-se que foi significativo para a dosagem de BAP e altamente significativo para tipo de explante. Não houve interação significativa entre os dois fatores, embora o resultado da análise de indicadores que ela exista (tabela 4).

Tabela 4: Resultado da análise de Variância para efeito da dosagem o hormônio, tipo de explante e interação entre estes fatores, aplicados para o cacau.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	p
Dosagem de BAP (A)	2	0.0439	0.0220	3.5482	0.0491*
Explante (B)	2	0.3653	0.1826	29.5087	0.0000***
Interação (A x B)	4	0.0637	0.0159	2.5751	0.0723
Erro	18	0.1114	0.0062	---	---

Cacauí

Os valores médios por variedade estão apresentados na tabela 5. A dosagem de BAP 2 foi a mais efetiva para induzir calo do tipo 3, dando em média 2,7% de cobertura e o cotilédono o tecido que mais apresentou-se coberto com calos do tipo 3 com um média de 1,7% (figura 1), (tabela 1).

Para o cacauí não foi evidenciado efeito da dosagem de hormônio ou tipo de tecido e nem interação entre dosagem do hormônio, variedade ou tipo de tecido usado no explante (tabela 6) (figura 3).

Tabela 5: Valores da proporção de calo do tipo 3 por tratamento em cacauí (*T. speciosum*). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%.

Variedade	Tecido	BAP 0	BAP 1	BAP 2	Média/tecido
SEC 31X	Embrião	1.2	3.3	2.3	0.8 a
SEC 44Z	Embrião	0.0	0.0	0.0	
SEC 48 Y	Embrião	0.0	0.0	0.0	
média/dosagem de BAP		0.40	1.11	0.77	
SEC 31X	Tegumento	0.0	0.1	0.0	0.0 a
SEC 44Z	Tegumento	0.0	0.0	0.0	
SEC 48 Y	Tegumento	0.0	0.0	0.0	
média/dosagem de BAP		0.00	0.03	0.00	
SEC 31X	Cotilédone	0.3	0.2	0.4	1.7 a
SEC 44Z	Cotilédone	0.0	0.0	0.0	
SEC 48 Y	Cotilédone	0.0	0.4	13.6	
média/dosagem de BAP		0.10	0.20	4.67	
Média geral/dosagem de BAP		0.25 a	0.67 a	2.72 a	

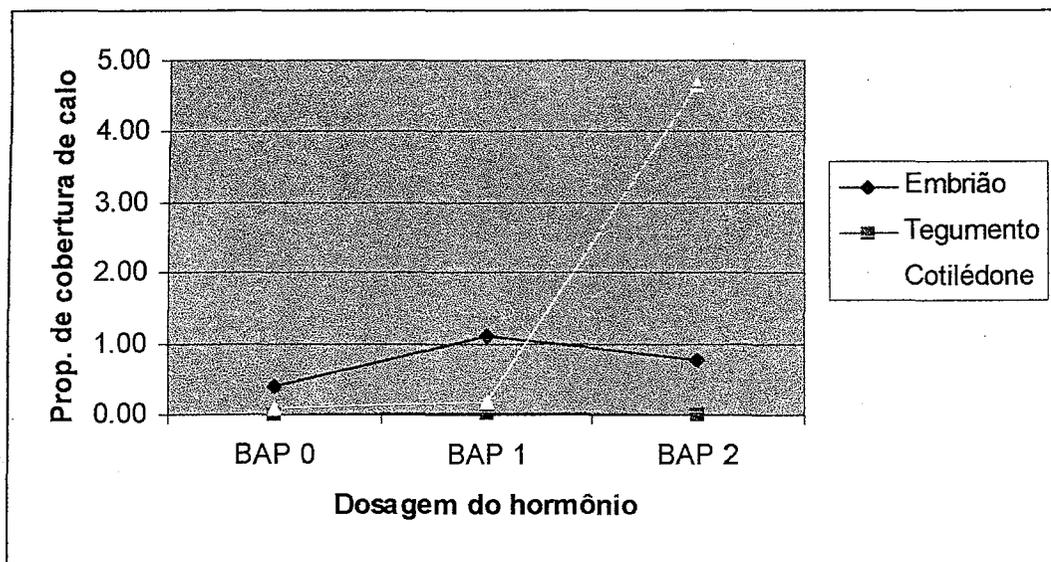


Figura 3: Efeito da dosagem de hormônio sobre a formação de calos do tipo 3 em cacauí (*T. speciosum*).

Tabela 6: Resultado da análise de Variância para interação entre os tratamentos aplicados para o cacauí (*T. speciosum*).

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	(p)
Dosagem de BAP (A)	2	0.0106	0.0053	---	---
Explante (B)	2	0.0187	0.0093	---	---
Variedade (C)	2	0.0226	0.0113	---	---
Interação A x B	4	0.0205	0.0051	1.1030	0.4186
Interação A x C	4	0.0186	0.0046	1.0024	0.4608
Interação B x C	4	0.0540	0.0135	2.9097	0.0928
Erro (A x B x C)	8	0.0371	0.0046	---	---

A exemplo do que foi feito para o cacau, a análise foi refeita excluindo-se o efeito de variedade, não apresentado diferença significativa para dosagem do hormônio e tipo de tecido (tabela 7).

Tabela 7: Resultado da análise de Variância para efeito da dosagem o hormônio, tipo de explante e interação entre estes fatores, aplicados para o cacauí (*T. speciosum*).

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	p
Dosagem de BAP (A)	2	0.0106	0.0053	0.7203	0.5040
Explante (B)	2	0.0187	0.0093	1.2707	0.3047
Interação (A x C)	4	0.0205	0.0051	0.6961	0.6067
Erro	18	0.1323	0.0073	---	---

Cupuaçu

Os valores médios por variedade estão apresentados na tabela 8. Houve diferença significativa para a dosagem de BAP sendo a BAP 2 foi a mais efetiva para induzir calo do tipo 3, dando em média 2% de cobertura. O tegumento e o cotilédone foram os tecido que mais apresentaram-se cobertos com calos do tipo 3 respectivamente com médias de 0,7 e 0,6% (figura 4). Os tecidos não diferiram estatisticamente entre si (tabela 8).

Tabela 8: Valores da proporção de calo do tipo 3 por tratamento em cupuaçu (*T. grandiflorum*). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%.

Variedade	Tecido	BAP 0	BAP 1	BAP 2	Média/tecido
GR 215	Embrião	0.3	0.0	0.7	0.1 a
GR 624	Embrião	0.0	0.0	0.0	
GR 1047	Embrião	0.0	0.0	0.0	
média/dosagem de BAP		0.10	0.00	0.23	
GR 215	Tegumento	0.0	0.0	0.0	0.7 a
GR 624	Tegumento	0.0	0.0	0.0	
GR 1047	Tegumento	0.0	0.0	6.1	
média/dosagem de BAP		0.00	0.00	2.03	
GR 215	Cotilédone	0.0	0.0	4.5	0.6 a
GR 624	Cotilédone	0.0	0.0	0.5	
GR 1047	Cotilédone	0.0	0.0	0.0	
média/dosagem de BAP		0.00	0.00	1.67	
Média geral/dosagem de BAP		0.05 a	0.00 a	1.97 b	

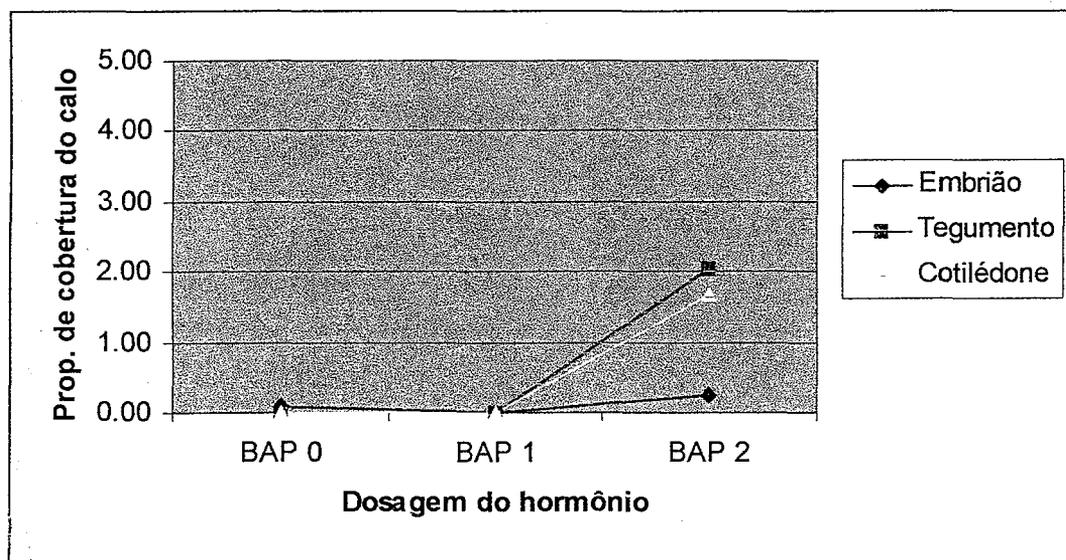


Figura 4: Efeito da dosagem de hormônio sobre a formação de calos do tipo 3 em cupuaçu (*T. grandiflorum*).

Para o cupuaçu não foi evidenciada interação entre dosagem do hormônio, variedade ou tipo de tecido usado no explante (tabela 9). Também não houve efeito da dosagem de hormônio ou tipo de tecido (tabela 10) (figura 4).

Tabela 9: Resultado da análise de Variância para interação entre os tratamentos aplicados para o cupuaçu (*T. grandiflorum*).

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	(p)
Dosagem de BAP (A)	2	0.0255	0.0127	---	---
Explante (B)	2	0.0014	0.0007	---	---
Variedade (C)	2	0.0042	0.0021	---	---
Interação A x B	4	0.0069	0.0017	0.3483	0.8385
Interação A x C	4	0.0055	0.0014	0.2777	0.8837
Interação B x C	4	0.0211	0.0053	1.0616	0.4355
Erro (A x B x C)	8	0.0397	0.0050	---	---

Tabela 10: Resultado da análise de Variância para efeito da dosagem o hormônio, tipo de explante e interação entre estes fatores, aplicados para o cupuaçu (*T. grandiflorum*) usando a variável cobertura com calos do tipo 3.

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	p
Dosagem de BAP (A)	2	10.0585	0.0127	3.2554	0.0609
Explante (C)	2	1.6007	0.0007	0.1788	0.8385
Interação (A x C)	4	3.8481	0.0017	0.4413	0.7789
Erro	18	37.3600	0.0039	---	---

A grande discrepância dos valores entre os genótipo interferiu na acuidade da análise de variância, mas analisando-se os dados por variedade, fica evidente que o cacauí e o cupuaçu apresentaram resposta específicas para cada genótipo. Por exemplo, a variedades de cacauí 31X mostrou-se responsiva para o tecido embrião, mas as demais não. O cupuaçu (*T. grandiflorum*) ha um genótipo que somente gerou calo do tipo 3 no tegumento (var. GR1047) e nos demais tecidos não, ou seja o inverso do observado nos demais genótipos, que geram calos no embrião e cotilédone, mas não geraram no tegumento (tabela 8). Logo há fortes indícios de que, a exemplo do observado para o cacau (Tan & Furtek, 2002) a resposta de cada tecido está associada ao genótipo de origem.

Para as três espécies usadas o cotilédone foi o tecido mais responsivo e o que gerou maior percentagem de cobertura de calos friáveis e brancacentos. Observando-se a curva de respostas para o cotilédone, nota-se que a dosagem ideal de BAP para o cacau estaria em torno de 1mg/l. Para as demais espécies esta dosagem dá indicadores de que se teria uma melhor performance se fosse aumentada.

O protocolo de Li *et al.* 1998 obteve maior sucesso na indução de calos usando o meio DKW com o uso de 2-4D associado com TDZ. Para Tan & Furket. (2003) que usou os mesmos hormônios, mas nos meios DKW e MS, observou que o DKW foi bom para o clone AMAZ12 enquanto o MS o foi para o clone CAB64, ou seja mostrando também um resposta genótipo específica para o tipo de meio. O meio LPm, usado no presente trabalho é parecido com o meio MS, mas a exemplo do observado por Tan & Furket (2003) o uso de outros meios poderá trazer efeitos melhores em certos genótipos e por isto deverão ser testados.

Outros autores também optaram pelo uso da sacarose como fonte de carbono em cultivos *in vitro* de cacau (Pence *et al.*, 1979; Lopez-Baez *et al.*, 1993; Figueira & Janick,

1993; Alemanno *et al.*, 1996). Precedentes na literatura indicam que a fonte de carboidrato pode influenciar o grau e o tipo de diferenciação e, desta forma, a eficiência na regeneração de plantas (Strickland *et al.*, 1987; Chu *et al.*, 1990; Swedlund & Locy, 1993; Navarro-Alvarez *et al.*, 1994). Li *et al.* (1998) usaram glicose como fonte de açúcar. De fato, esses autores comentam, em seu artigo, uma reação de hiper-sensibilidade desenvolvida por tecidos de *T. cacao* cultivados em meios nutritivos contendo outros açúcares que não a glicose. Tan & Furket (2003) usaram no meio DKW uma mistura de sacarose e glucose, com bons resultados, o que poderia ser uma alternativa a ser testada.

O uso de tecido como o cotilédone tem o inconveniente de não ser útil para a clonagem de matrizes já testadas, mas pela facilidade de obtenção e reposta apresentou-se como um excelente tecido para a geração de calos passíveis de virem a ser usados em manipulações genéticas.

O uso da combinação 2-4D + TDZ não foi testado ainda para o cacauí e cupuaçu mas até o momento tem sido os hormônios mais efetivos para a formação de calos embriogênicos para o cacau (Li *et al.*, 1998; Tan & Furket, 2003).

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos aos estagiários: Adriana Tomazi pela profícua ajuda na instalação dos experimentos; Fabiano José Pickscius, Daniel Enriquez Hidalgo e Cassia Garrido durante as avaliações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alemanno, L., Berthouly, M., Michaux-Ferrière, N. 1996. Somatic embryogenesis of cocoa from floral parts. *Plantations, Recherche, Développement*, v.3(4):225-237, 1996.
- Ayres, M.; Ayres, M.A. Jr.; Ayres, D.L.; Santos, A. S. dos 1998. *BIOESTAT. Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências Biológicas e Médicas*. Sociedade Civil Mamirauá/MCT - CNPQ, 193 p.
- Bertrand, B. 1987. Quelques aspects du microbouturage du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). *Café Cacao Thé*, 31: 175-182
- Blake, J. & Maxwell, P. 1984 Tissue culture propagation of cacao by the use of axillary buds. *Proc. Int. Conf. Cocoa Cocomuts*. Kuala Lumpur, Malaysia.
- Cavalcante, P. B. 1988. *Frutas Comestíveis da Amazônia*. 4ªed., rev. ampl. - Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi; companhia Souza Cruz Indústria e Comércio, 146 p. e fig.
- Chu, C.C., Hill, R.D., Brule-Babel, A.I. 1990. High frequency of pollen embryoid formation and plant regeneration in *Triticum aestivum* L. on monosaccharide containing media. *Plant Science, local*, 66: 255-262.
- Ducke, A. 1953. As espécies brasileiras do gênero *Theobroma*. *Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte*, 28:1-89.
- Dufour, M. & Dublin, P.1985. Quelques données nouvelles sur l'induction et le développement d'embryons somatiques chez *Theobroma cacao*. *Café Cacao Thé*, 29: 235-244
- Ferreira, M. das G. R; Cárdenas, F. E. N.; Carvalho, C. H. S. de; Carneiro, A. A. Damião Filho, C. F. 2001. Desenvolvimento de calos em explantes de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em função da concentração de auxinas e do meio líquido. *Rev. Bras. de Fruticultura*. 23(3): 473-476.
- Figueira, A. & Janick, J. 1994. Optimizing carbon dioxide and light levels during in vitro culture of *Theobroma cacao*. *Journal of the American Society of Horticulture Science*, 119 (4): 865-871.
- Figueira, A., Whipkey, A., Janick, J., 1991. Increased CO₂ and light promote in vitro shoot growth and development of *Theobroma cacao* L. *Journal of the American Society of Horticulture Science*, 116: 585-589
- Flynn, W.P., Glicenstein, L.J., Fritz, P.J., 1990. *Theobroma cacao* L.: An axillary bud in vitro propagation procedure. *Plant Cell Org. Tiss. Cult.*, 20: 111-117.
- Janick, J.; Whipkey, 1985. A. Axillary proliferation of shoots from cotyledonary nodal tissue of cacao. *Revista Theobroma*, 15: 125-131.
- Legrand, B., Mississo, E. 1986. E. Influence de la taille des explantats et des regulateurs de croissance sur le développement des tissus de *Theobroma cacao* L. var. *Amelonado* cultivés in vitro. *Café Cacao Thé, Paris*, 30: 239-246
- Li, Z.; Traore, A.; Maximova, S.; Gultinan, M. J. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using Thidiazurom. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 34: 293-299.
- Lopez-Baez, O., Bollon, H., Eskes, A.B., Pétiard, V. 1993. Embryogenèse somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales. *Sciences de la vie*, 316:579-584.
- Navarro-Alvarez, W., Baenziger, P.S., Eskridge, K.M., Shelton, D.R., Gustafson, V.D., Hugo, M. 1994. Effect of sugars in wheat anther culture media. *Plant Breeding*, 112:53-62.
- Orchard, J.E., Collin, H.A., Hardwick, K. 1979. Culture of shoot apices of *Theobroma cacao* L. *Physiol. Plant*, 47: 207-210.

- Passey, A.J.; Jones, O. P., 1983. Shoot proliferation and rooting in vitro of *Theobroma cacao* L. type Amelonado. *Journal of Horticultural Science*, 58: 589-592.
- Pence, V.C., Hasegawa, P.M., Janick, J., 1979. Asexual embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Journal of the American Society of Horticulture Science*, 104: 45-148.
- Santos, S. F. dos 2003. Anatomia E Histoquímica De Sementes No Gênero *Theobroma* L. (Sterculiaceae). *Tese de Mestrado*. Universidade Federal de Santa Catarina / Centro de Ciências Agrárias, Mestrado em Recursos Genéticos. Florianópolis, SC (em preparação).
- Silva, C. R. S., 2000. Filogenia do gênero *Theobroma* utilizando marcadores moleculares e bioquímicos. *Tese de Mestrado*. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 139 p.
- Sokal, R.R.; Rohlf, F.J. 1981. *The Principles and Practice of Statistics in Biological Research* (2nd ed.). San Francisco: State University of New York at Stony Brook, 776 p.
- Strickland, S.G., Nichol, J.W., McCall, C.M., Stuart, D.A. , 1987. Carbohydrate source on alfafa somatic embryogenesis. *Plant Science*, 48: 113-121.
- Swedlund, B. & Locy, R.D. 1993. Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize. *Plant Physiology*, 103:1339-1346.
- Tan, C.L.; Furtek, D.B. 2003. Development of an in vitro regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. *Plant Science*, 164: 407-412.
- Velho, C. C.; Whipkey, A.; Janick, J. 1988. Cupuassu, a new beverage crop for Brazil. In: *Advances in New Crops*. Proceeding of the First National Symposium, *New Crops: Research, Development, Economics*. Janick, J. Simon, J.E. eds. Indianapolis, Indiana, oct. 23-26.
- Venturieri, G. A. 1993. *Cupuçu: A Espécie, sua Cultura, Usos e Processamento*. Clube do cupu, 118p. Belém PA.
- Venturierim G.A. , Venturieri, G.C. 2003. Calogênese do Híbrido *Theobroma grandiflorum* x *T. obovatum* (Sterculiaceae). *Biologia Aplicada ao Uso Econômico do Gênero Theobroma* - Relatório Final. CNPq/Programa de Trópico Úmido - PUT/Proc. n. 469915-5. n. pag.. Belém, PA.
- Von Arnold, S., Eriksson, T. 1981 *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.*, 59:870-874.

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

Seidel Ferreira dos Santos¹
Giorgini Augusto Venturieri²

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 seminiais. 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.

¹ Eng. Agrônomo; MSc. em Recursos Genéticos Vegetais

² Professor Doutor- Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, CCB/BEG

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 tégmen, 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 OLIVEIRA & AKISSUE (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 fibro-vasculares; 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.

MATERIAL E MÉTODO

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).

Microscopia de Luz:

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.

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.

RESULTADOS

Anatomia da semente

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-endospermica.

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 paliçádica 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).

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.

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 frequência 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).

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 distingui 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 periclinamente 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

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).

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).

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 idioplastos com conteúdo fenólico. As paredes celulares destas células são delgadas e não lignificadas, formadas basicamente por celulose (Figura 23 C).

DISCUSSÃO

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 bitegumentados. Deve-se observar que o potencial ontogênico dos óvulos bitegumentados é geralmente maior que o dos óvulos unitegumentados, sendo assim as sementes unitegumentadas 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 paliçádica 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 paliçada 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 alguma espécie 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.

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 puberolar, 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.

CONCLUSÃO

- 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 está 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 ao 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 paliádica 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 separa-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.

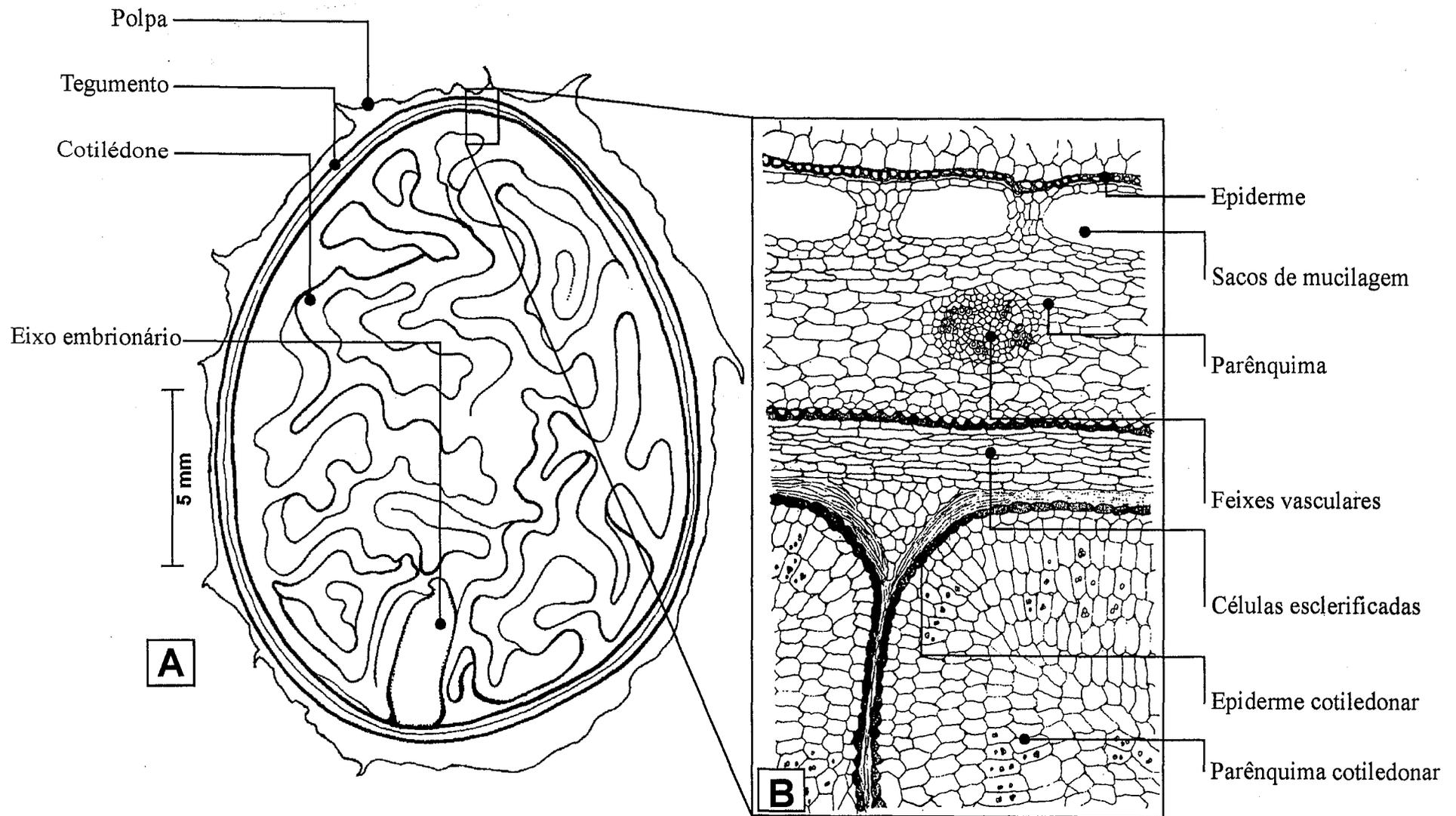


Figura 01-Estrutura anatômica da semente madura de *Theobroma cacao* L. A-semente em corte longitudinal; B- detalhe da semente em corte longitudinal. (Adaptado de AKISUE & OLIVEIRA, 1991).



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

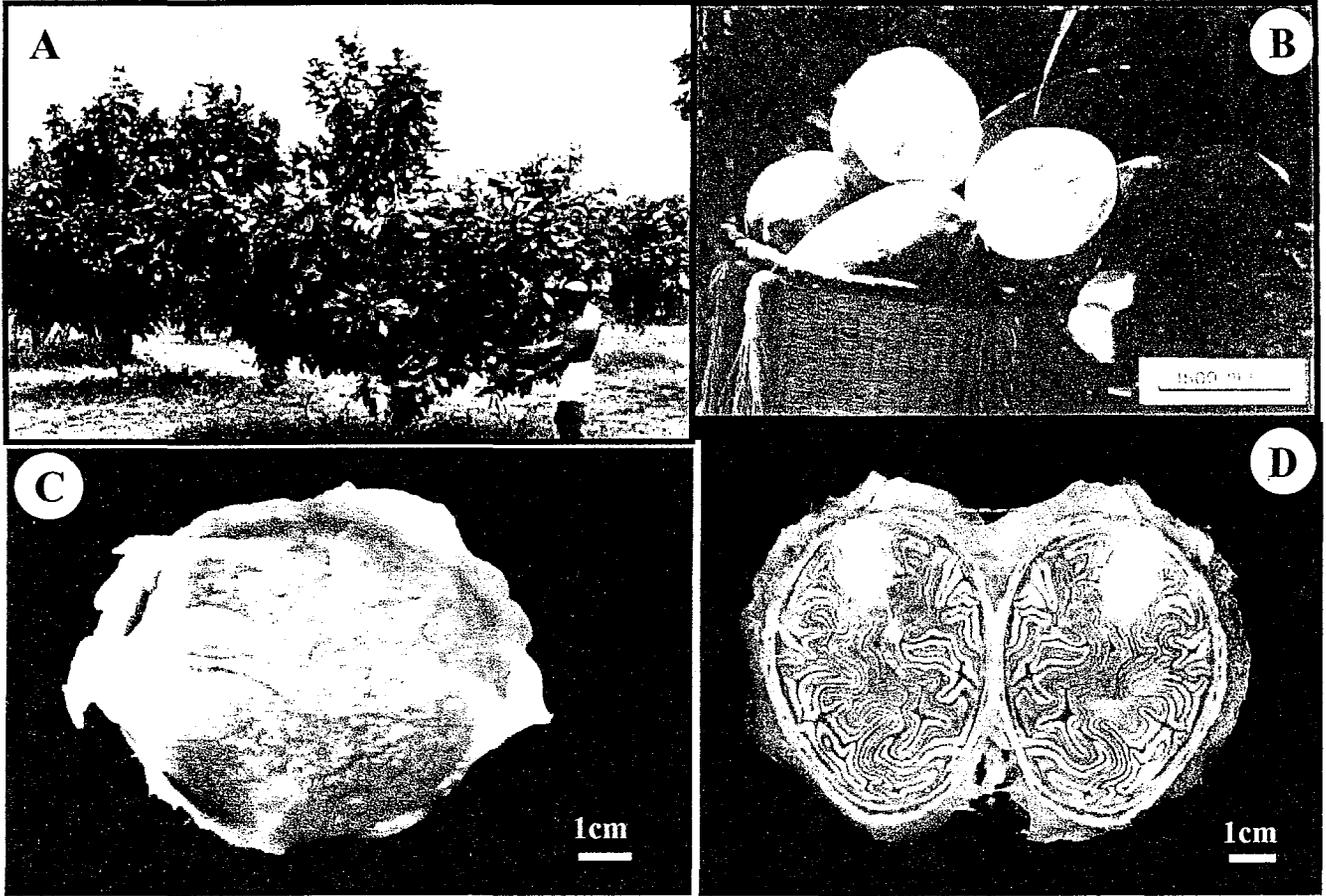


Figura 03- *T. grandiflorum*. A-planta cultivada; B-aspecto geral do fruto; C-aspecto externo da semente; D-semente em corte longitudinal.

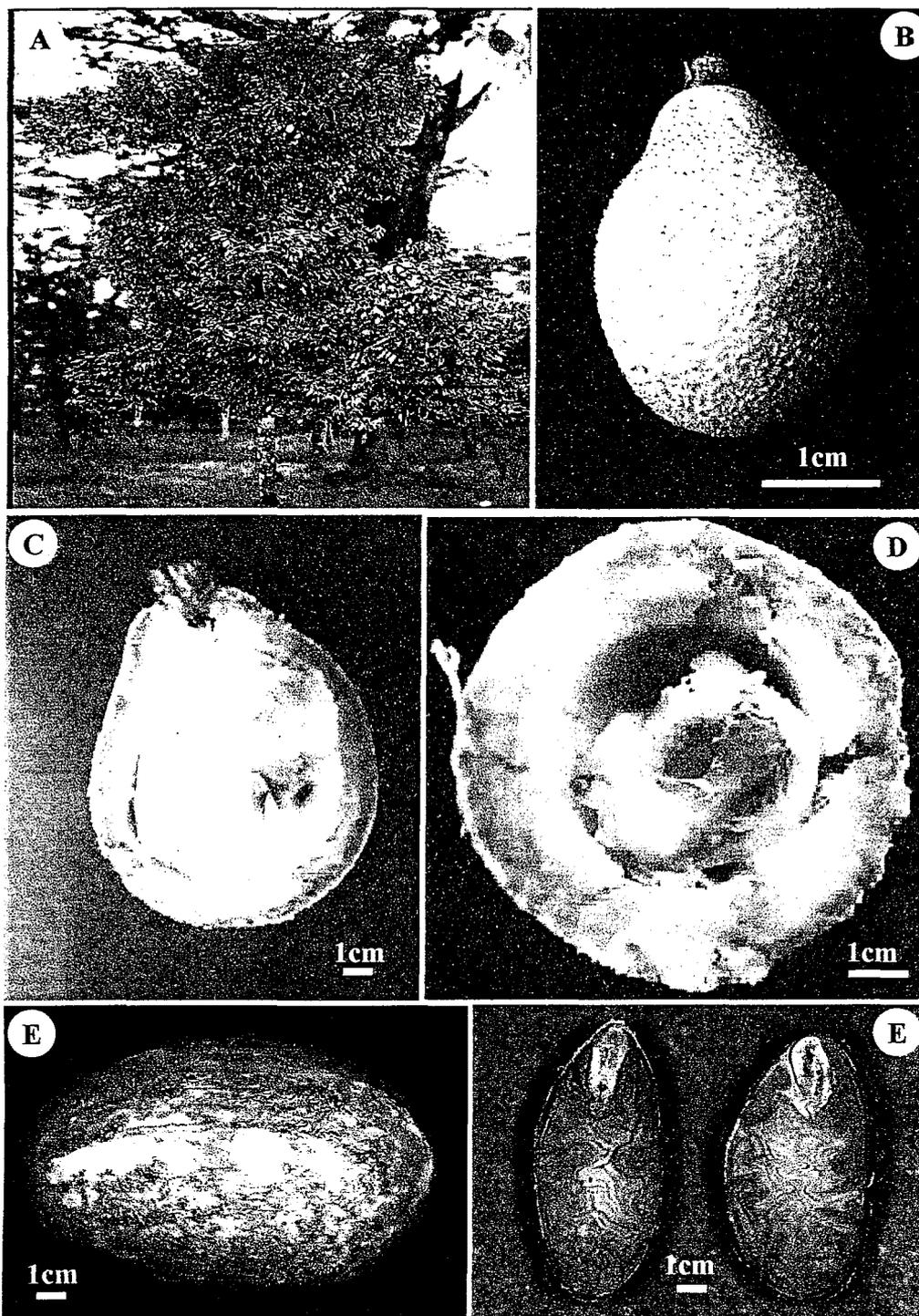


Figura 04- *T. obovatum*. **A**-aspecto da árvore; **B**-detalhe do fruto; **C**-fruto (corte longitudinal); **D**-fruto (corte transversal); **E**-aspecto externo de uma semente; **F**-semente (corte longitudinal)

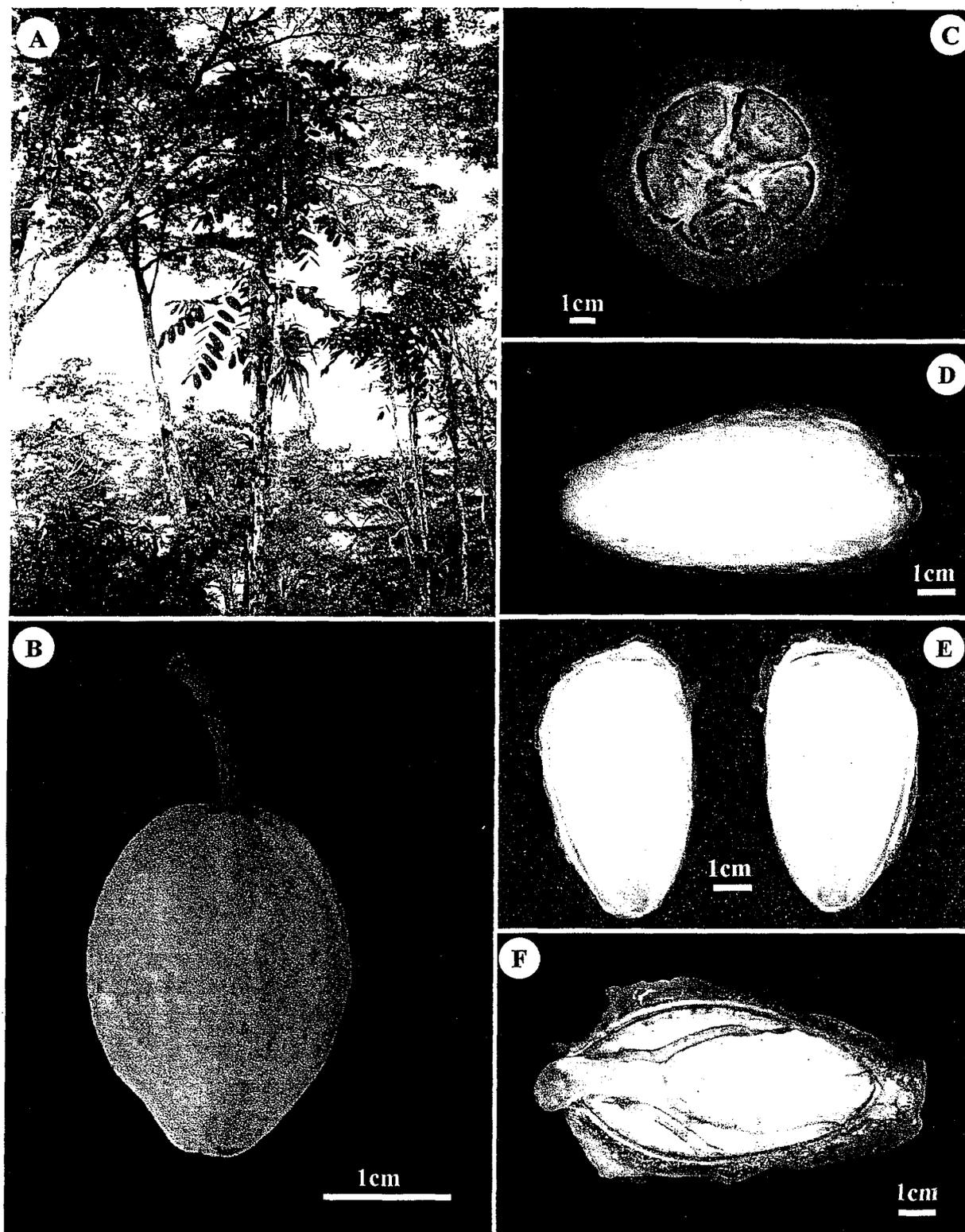


Figura 05- *T. speciosum*; A- aspecto geral da árvore; B- fruto (aspecto geral), C- fruto (corte transversal); D-semente (aspecto externo); E e F-semente em corte longitudinal (detalhe do embrião).

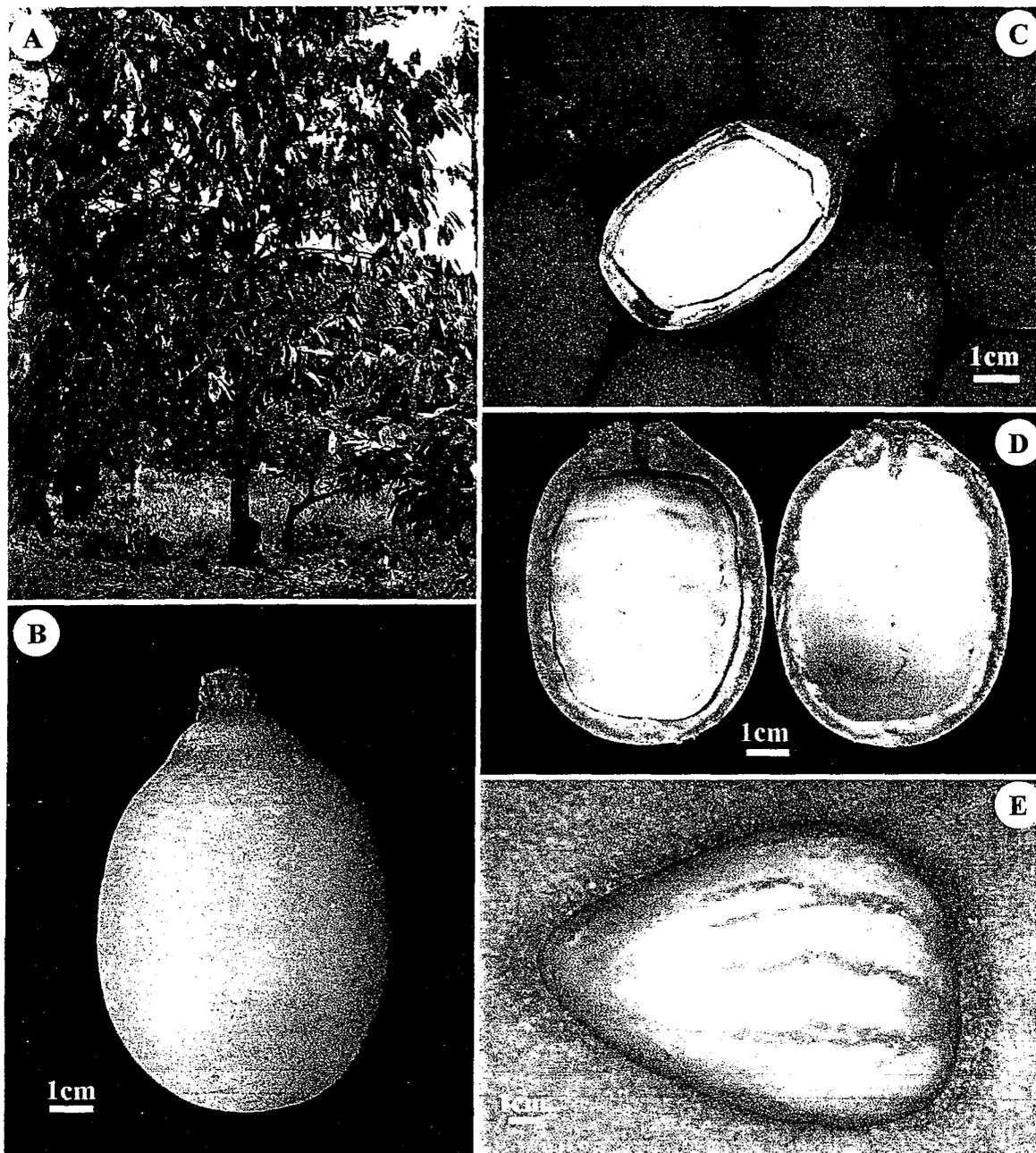


Figura 06- *T. subincanum*. A-aspecto geral da árvore; B,C,D-detalle do fruto (observar polpa de coloração branca); E-aspecto externo da semente.

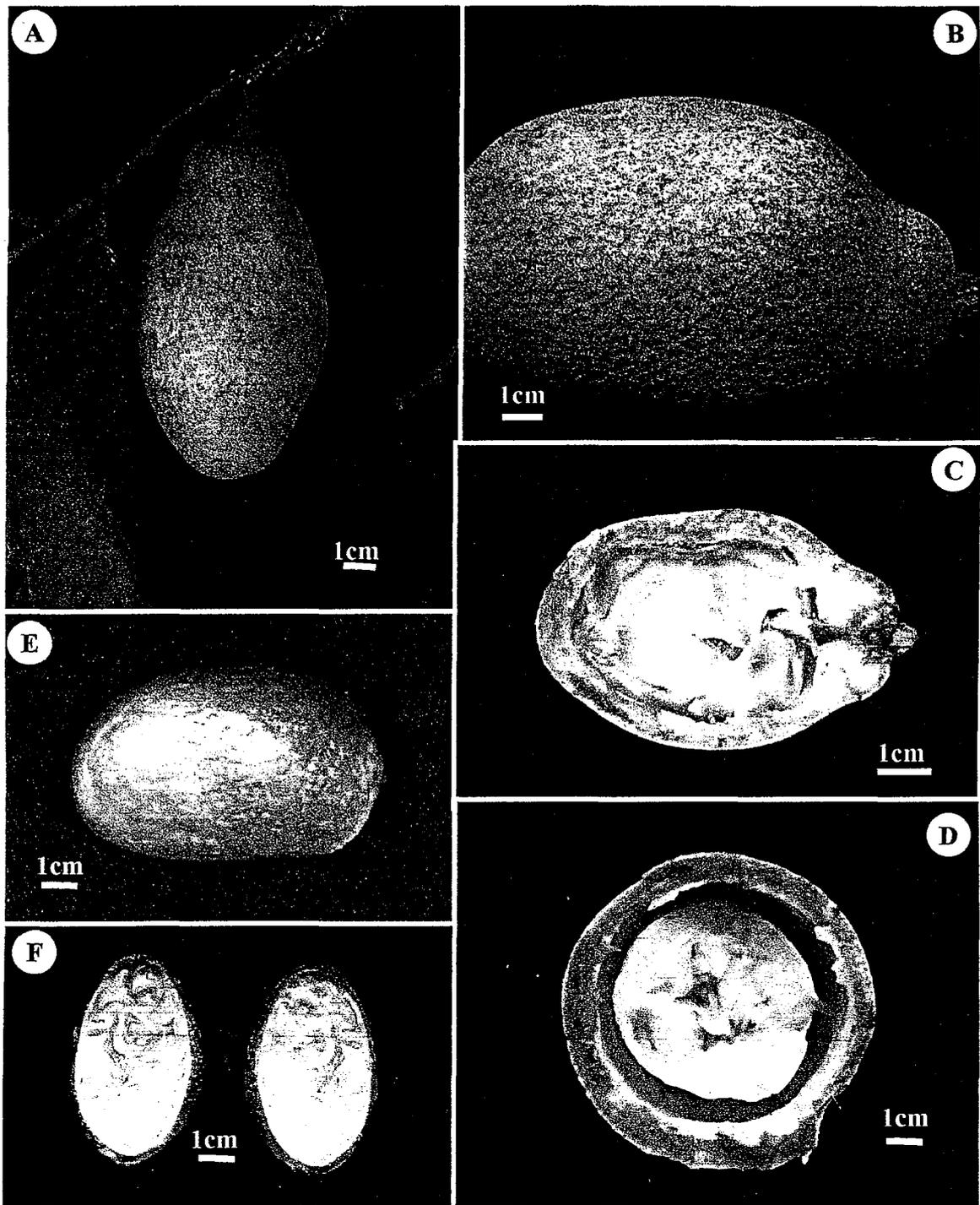


Figura 07- *T. obovatum* x *T. subincanum*. **A e B**-aspecto geral do fruto, **C**-Fruto em corte longitudinal; **D**-fruto em corte transversal; **E**-aspecto geral da semente; **F**-semente em corte longitudinal

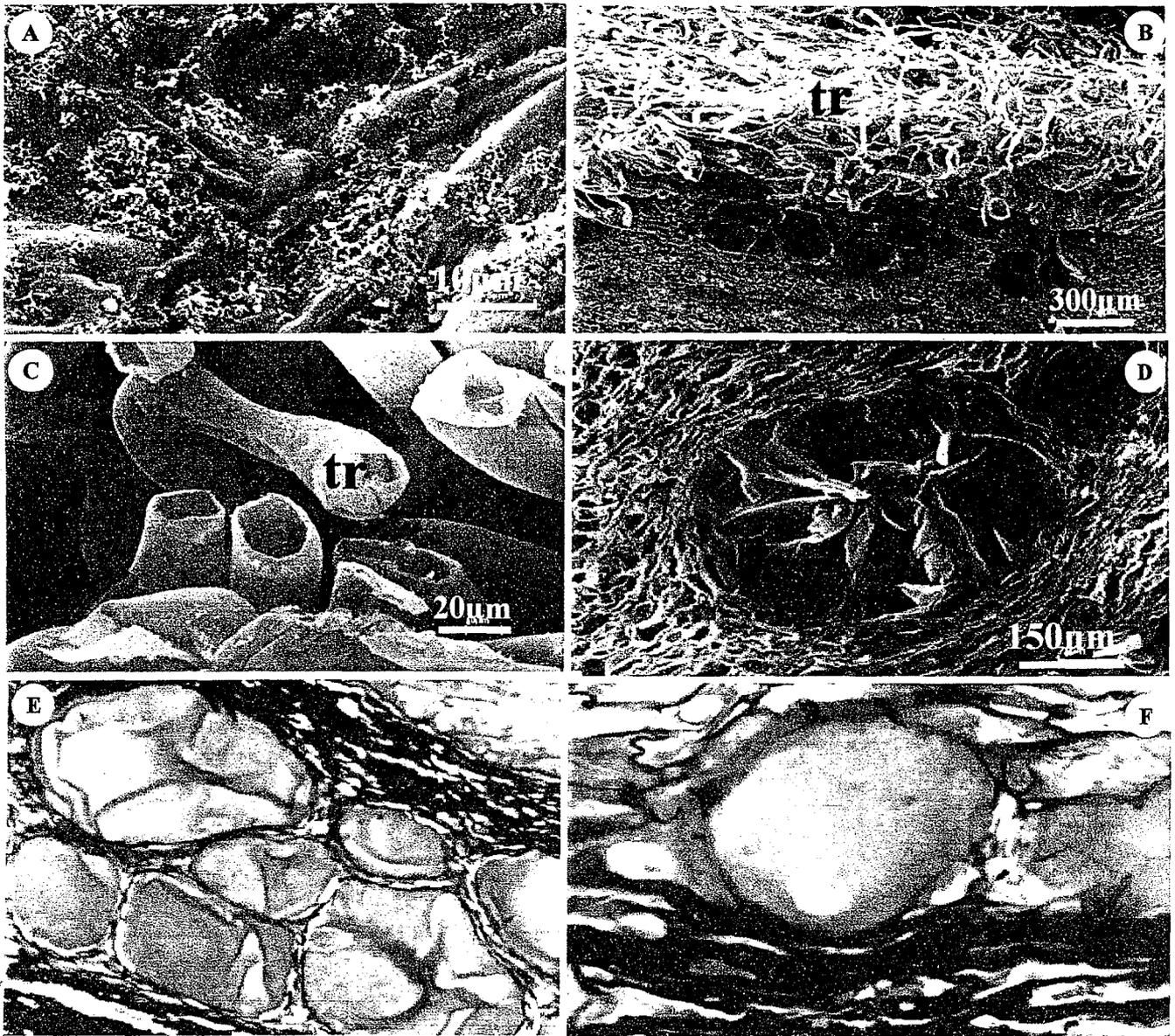


Figura 08- *T. grandiflorum*. **A**-superfície do tegumento externo (MEV); **B**-tricomas (tr) na epiderme externa MEV; **C**-detalhe dos tricomas (tr) na epiderme externa do tegumento externo (MEV); **D**-idioblastos em secção transversal (MEV); **E**-idioblastos agrupados no tegumento externo (100x)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

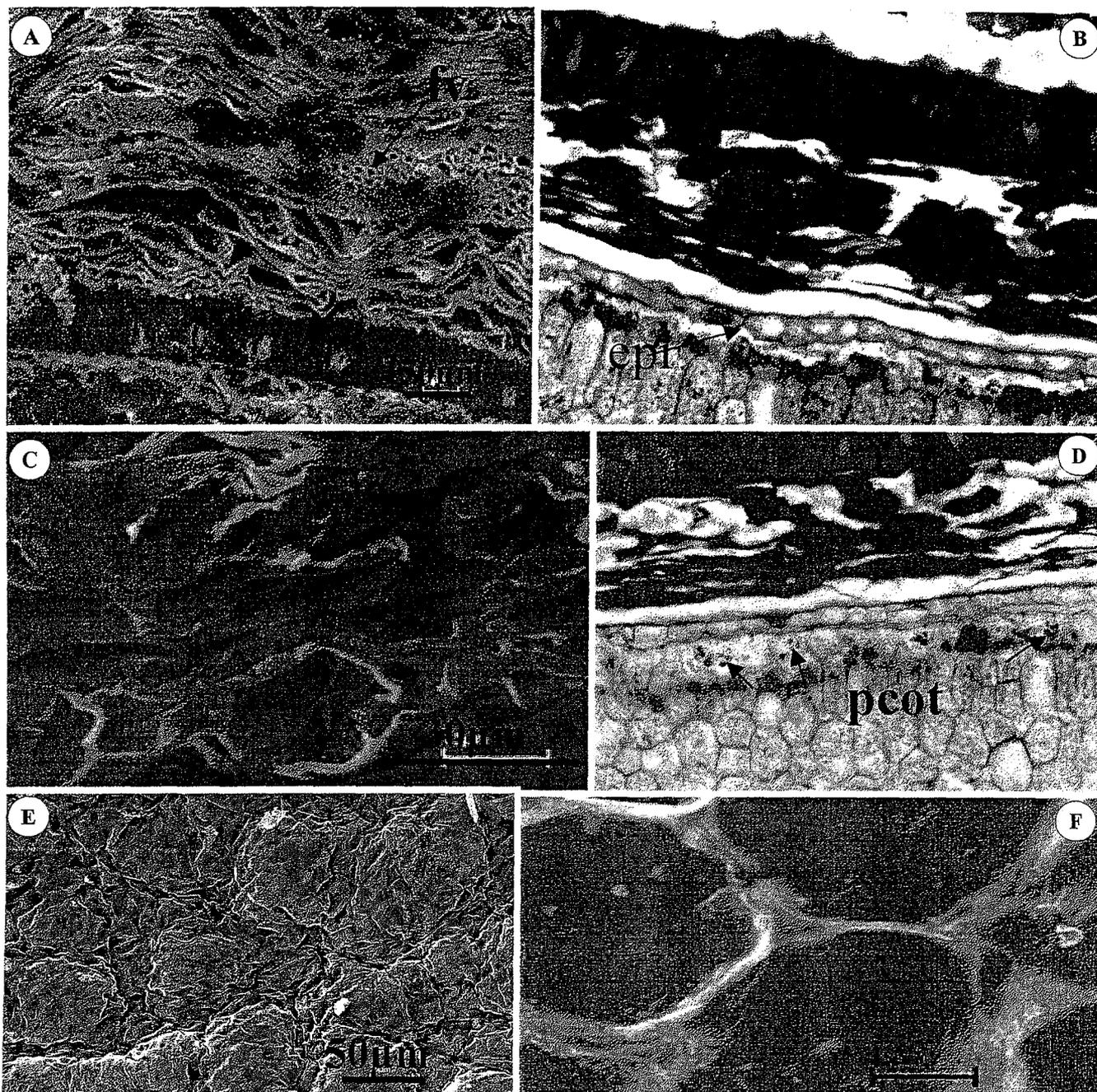


Figura 09- *T. grandiflorum*. **A**-corte transversal do tegumento evidenciando os feixes vasculares (fv) e a camada de células em paliçada (seta), **B**-camada de células esclerificadas (seta) e epiderme interna do tegumento interno (epi) (400x) ; **C**-células parenquimáticas do tegumento externo (MEV);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

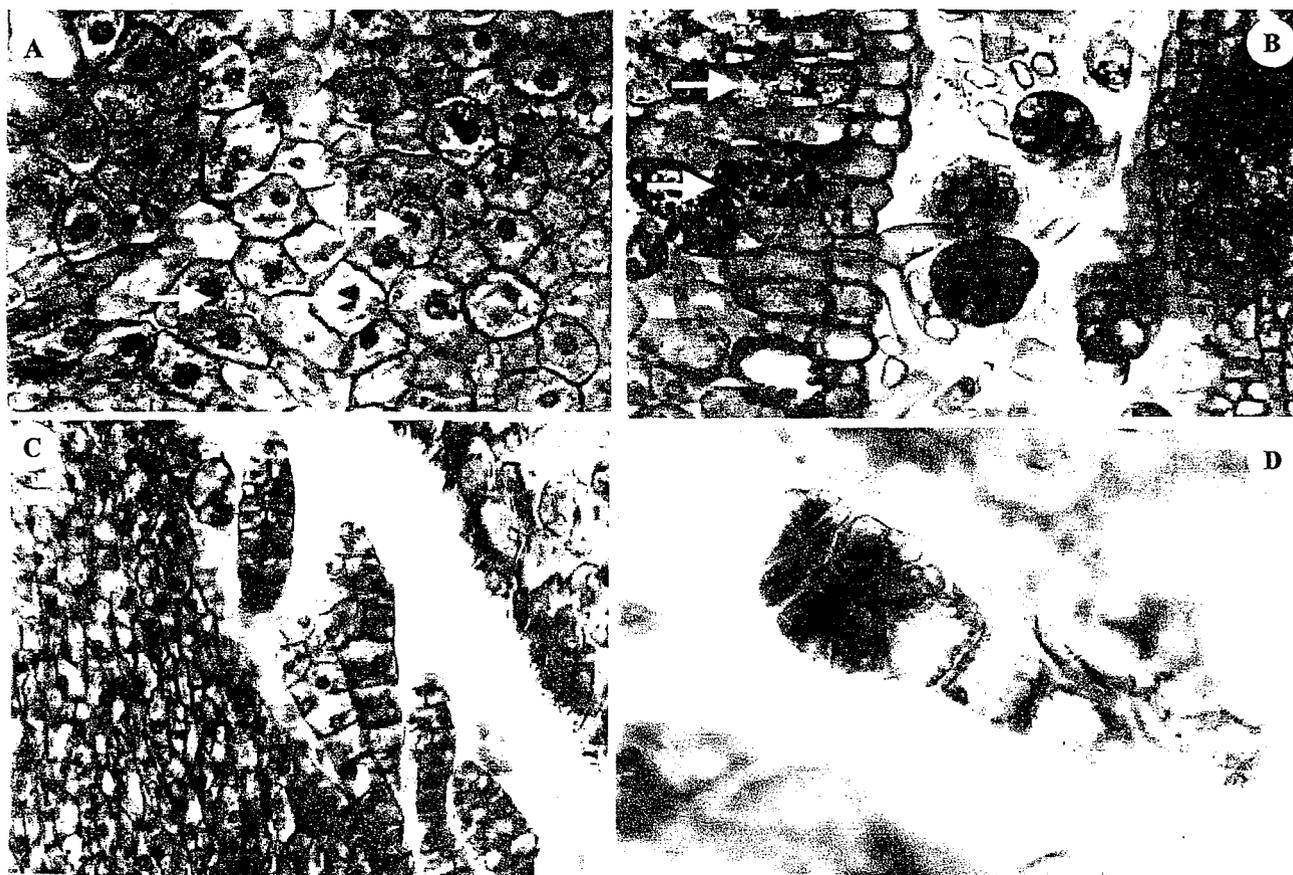


Figura 10- *T. grandiflorum*. **A**-Células do parênquima cotiledonar em vista frontal coradas com Safranina e Fast Green (seta) com núcleos bem evidenciados (200x); **B**-idioblastos com conteúdo fenólico (seta) (400x); **C**-tricomas glandulares na epiderme cotiledonar (400x); **D**-tricoma glandular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

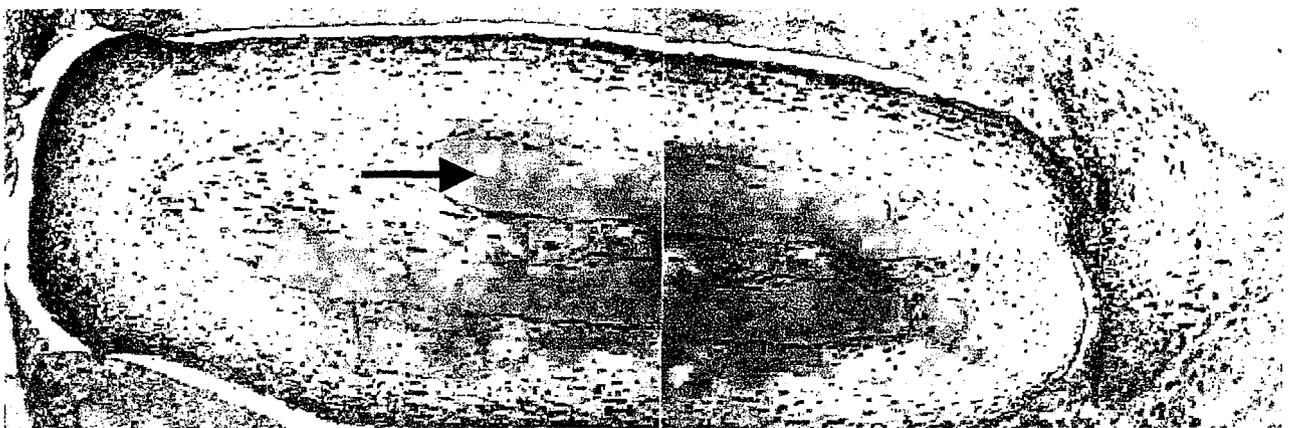


Figura 11- *T. grandiflorum*. A- secção longitudinal do eixo hipocótilo-radícula em corte longitudinal (células com conteúdo fenólico) (seta branca), células com conteúdo ácido (seta preta) (400x).

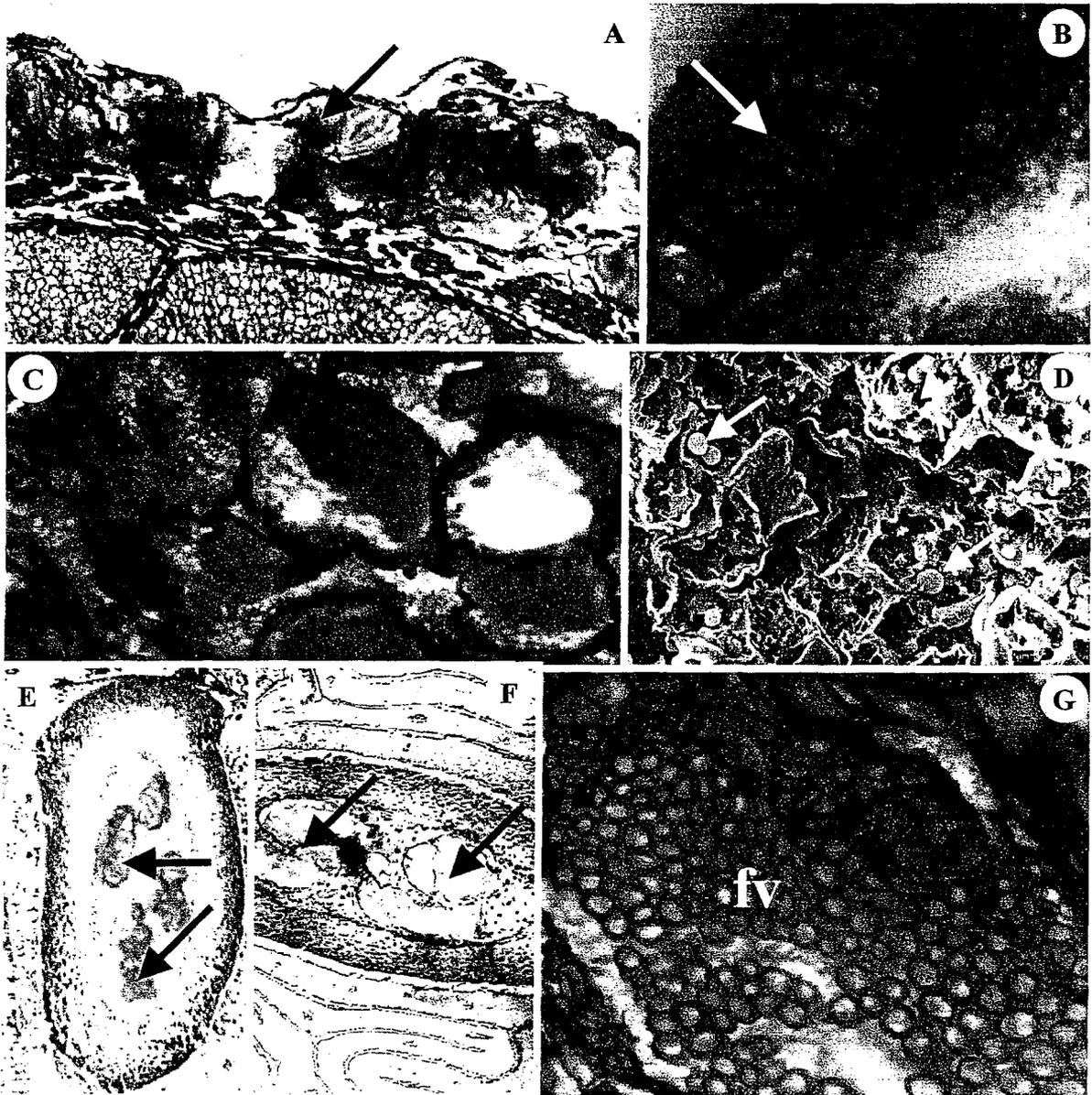


Figura 12- *T. obovatum*. A-idioblastos no tegumento externo (seta) (200x); B-detalle da epiderme externa do tegumento externo (seta) (400x); C-idioblastos no tegumento externo (400x); D-parênquima cotiledonar, observar grãos de amido (seta) MEV; E e F-eixo hipocótilo-radícula. Observar células com conteúdo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

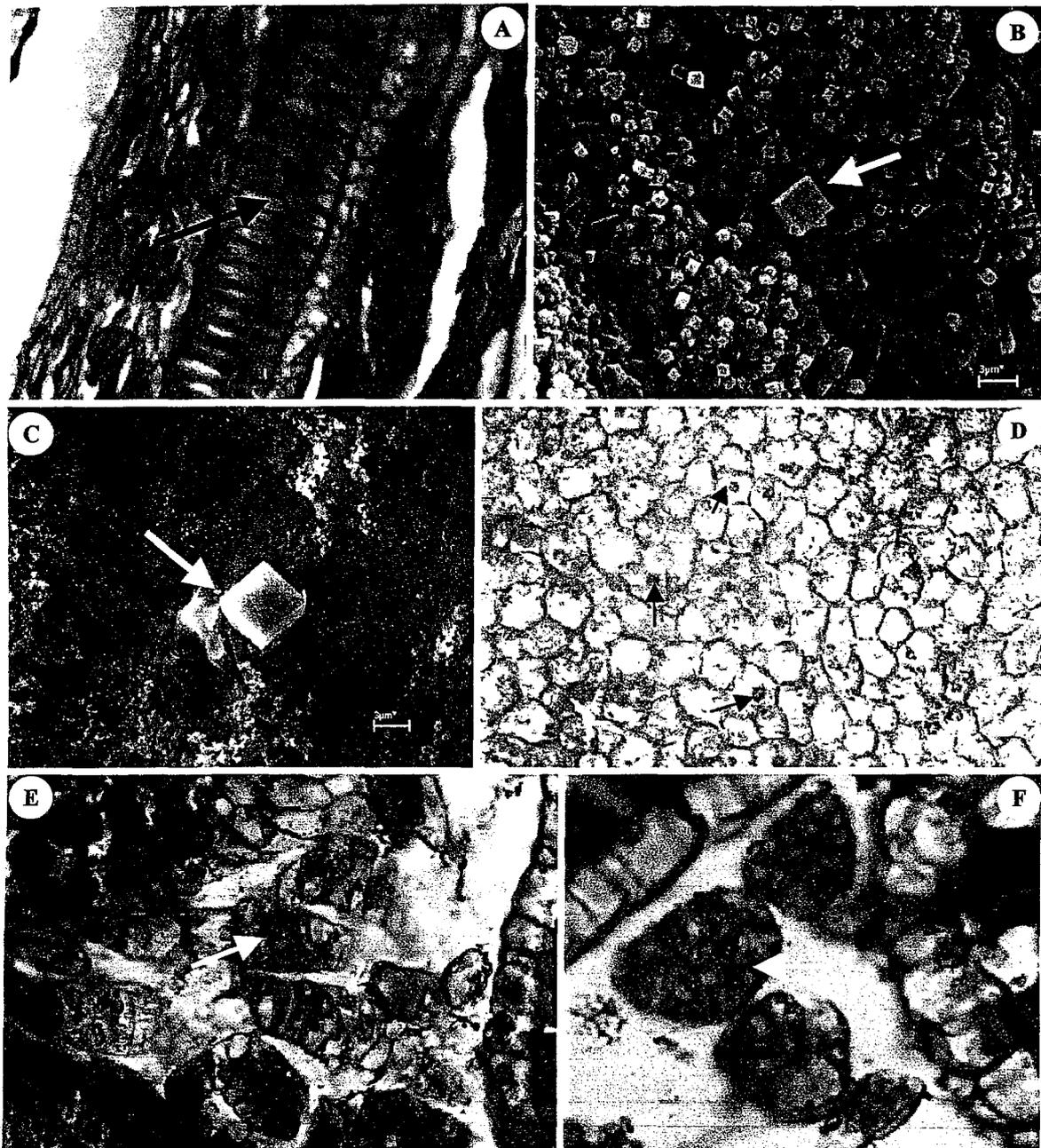


Figura 13- *T. obovatum*. **A**-camada de células esclerificadas (seta) (200x); **B e C**- cristais de oxalato de cálcio (seta) na superfície da epiderme interna do tegumento externo (MEV); **D**- células do parênquima cotiledonar (seta) evidenciando os núcleos e conteúdo fenólico (100x); **E**-tricomas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

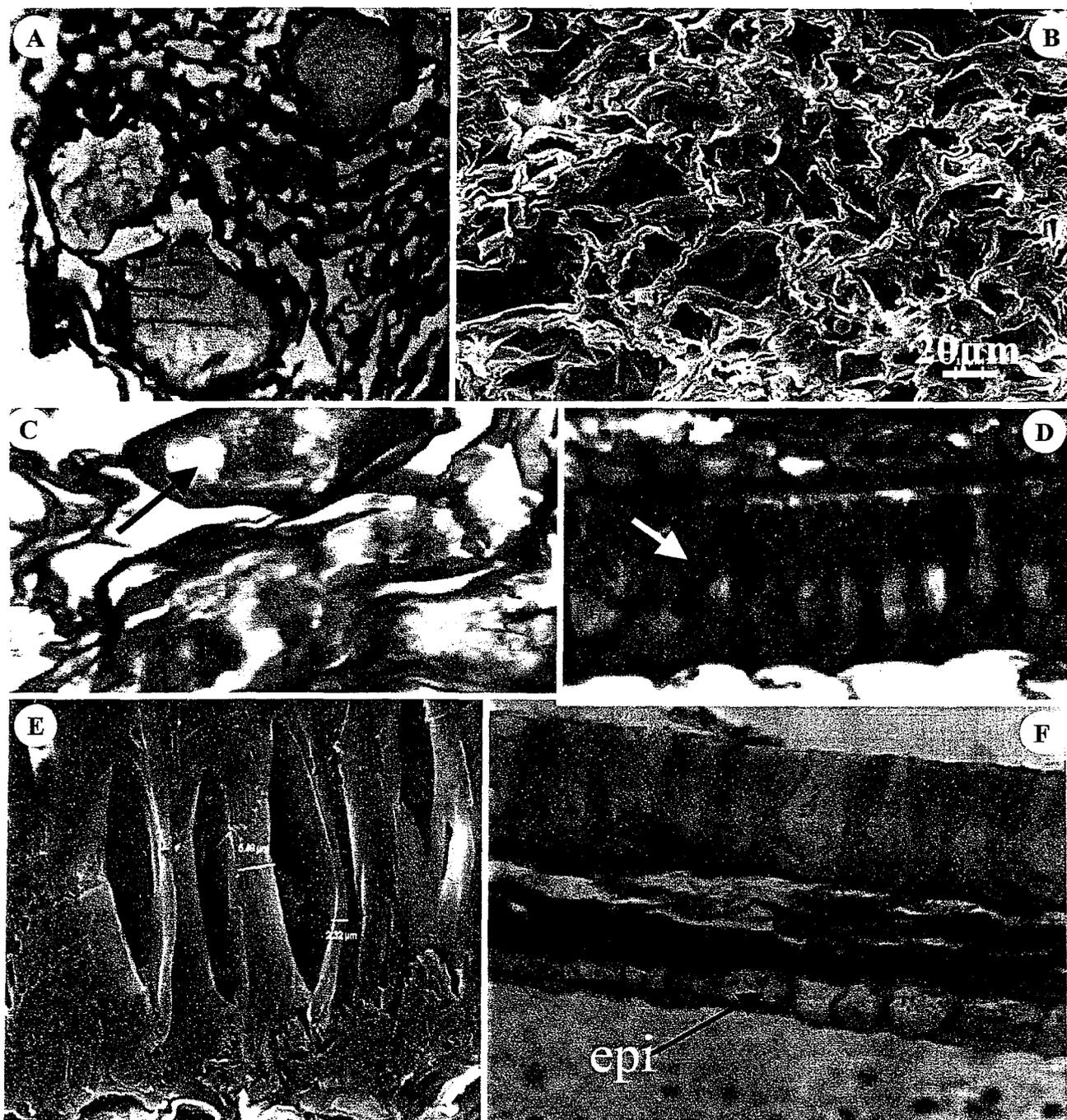


Figura 14- *T. speciosum*. A-sacos de mucilagem no tegumento externo (sm) (400x); B-parênquima do tegumento externo (MEV); C-detalle das drusas nas células parenquimáticas (seta) (400x); D-camada de células esclerificadas (seta) (400x); E-camada de células esclerificadas (MEV); F-detalle da epiderme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

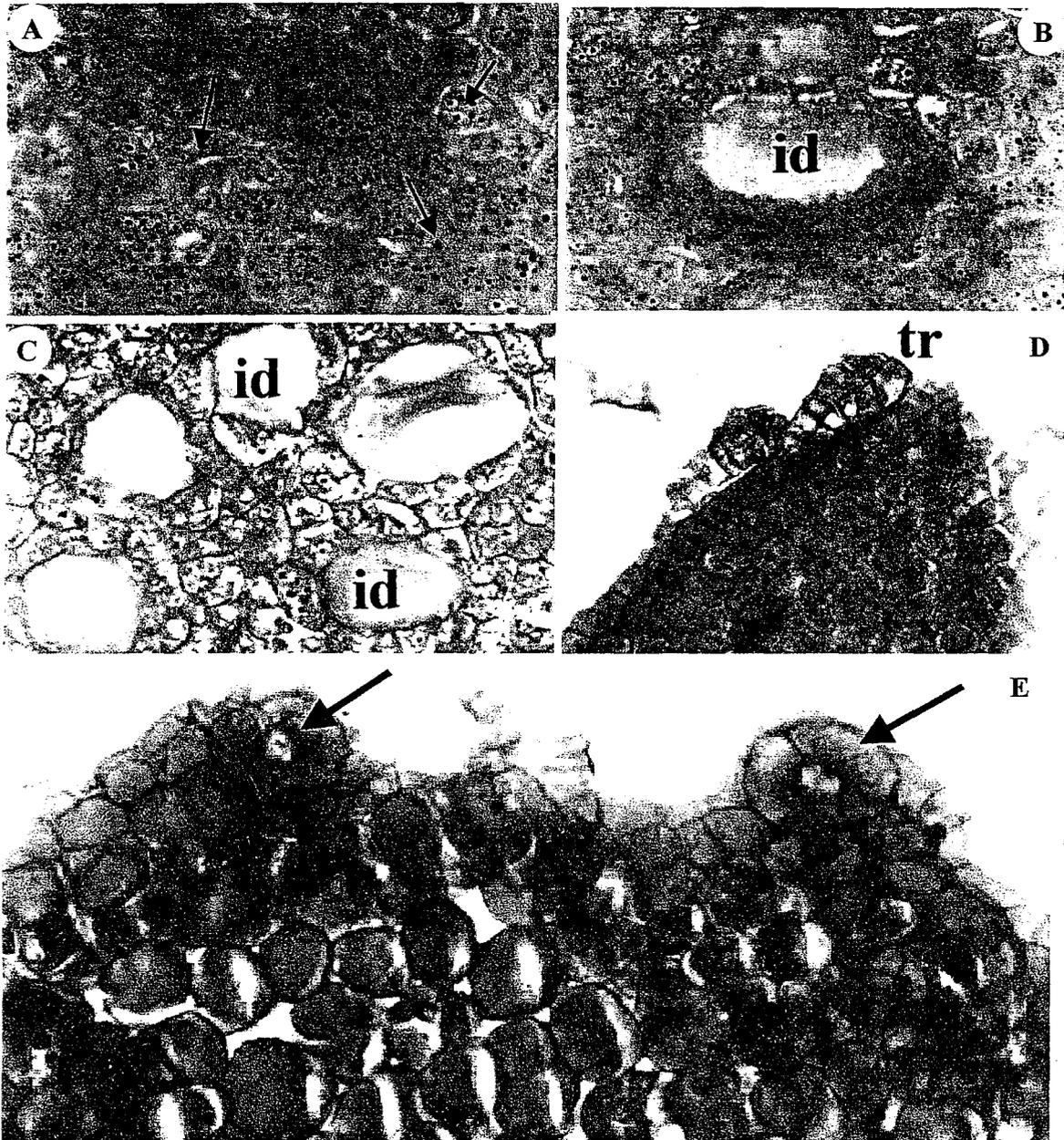


Figura 15- *T. speciosum*. A-células do parênquima cotiledonar com compostos fenólicos (seta) (400x); B-idioblastos (id) no parênquima cotiledonar com substâncias ácidas (400x); C-idioblastos (id) agrupados no parênquima cotiledonar (400x); D-tricomas (tr) glandulares com haste longa na epiderme cotiledonar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