

Anatomia foliar de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) sob condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*

Albarelo, N. ¹; Figueiredo¹, S. F. L.; Viana², V. R. C.; Neves², L. J.

¹ Laboratório de Biotecnologia de Plantas - LABPLAN/DBAV/IBRAG/UERJ - Rua São Francisco Xavier, 524 - PHLC - Sl.509. Maracanã - Rio de Janeiro - CEP:20.550-013. e-mail: labplan@uerj.br; ² Laboratório de Anatomia Vegetal/Horto Botânico do Museu Nacional/UFRJ

RESUMO: Foi realizado o estudo anatômico comparativo entre as folhas de um exemplar arbóreo, de plantas germinadas em sementeira e de plantas cultivadas *in vitro* de *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae). Caracteres anatômicos distintivos e de valor diagnóstico foram registrados nas três situações estudadas. As respostas morfogênicas e anatômicas encontradas no material cultivado *in vitro* apontam para o sucesso deste tipo de propagação.

Palavras-Chave: *Rollinia mucosa*, Annonaceae, anatomia foliar, cultura *in vitro*, planta medicinal

ABSTRACT: Leaf anatomy of *Rollinia mucosa* Jacq. Baill. (Annonaceae) under *in vivo* and *in vitro* conditions. Anatomical comparisons were made between leaves of a tree, of nursery-grown seedlings, and plantlets of *Rollinia mucosa*. Distinctive anatomical traits and of diagnostic values were found in these three situations studied. The morphogenic and anatomical responses found in the *in vitro* culture revealed characteristics that contribute to the success of this type of propagation.

Key Words: *Rollinia mucosa*, Annonaceae, leaf anatomy, *in vitro* culture, medicinal plant

INTRODUÇÃO

Rollinia mucosa, espécie de ampla distribuição nos neotrópicos, ocorre freqüentemente em estado de cultivo em altitudes de até 1500 metros (Maas & Westra, 1992). Com provável origem nas Antilhas (Porto, 1936; Cavalcante, 1972), atualmente estende-se do Caribe ao extremo sul da Amazônia (Clement, 1992) e demais estados da região Norte, onde é conhecida como biribá (Corrêa, 1984; Amorozo & Gelly, 1988). Sua presença no Estado do Rio de Janeiro deve-se ao cultivo de mudas trazidas de Iquitos, Peru, para o Horto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro em 1928 (Porto, 1936). Das Annonaceae introduzidas no Rio Grande do Sul, *R. mucosa* está representada em cinco municípios do Estado (Záchia, 1994).

A espécie é utilizada como fonte de óleo comestível, na confecção de canoas, no setor da construção civil, além do aproveitamento do líber na fabricação de estopa. Os frutos, com polpa branca e adocicada têm importância econômica, sendo comercializados principalmente na região amazônica (Prance & Silva, 1975; Ngiefu *et al.*, 1976; Corrêa, 1984). Como planta medicinal, *R. mucosa* tem sido alvo de pesquisas fitoquímicas e farmacológicas, uma vez que vários de seus metabólitos secundários vêm apresentando ação medicamentosa relevante. A presença de lignanas furofurânicas com atividade anti-PAF (fator ativador de plaquetas) foi registrada em folhas, caule, frutos

imaturos, sementes e em diferentes órgãos de plântulas e plantas propagadas *in vitro* (Paulo *et al.*, 1991, Paulo, 1992; Figueiredo *et al.*, 1999). O PAF é uma substância naturalmente produzida pelo organismo, sendo um potente mediador de anafilaxias e inflamações, estando também envolvido em rejeição a enxertos, doenças renais, trombose, ovariectomia, respostas imunológicas, citotoxicidade linfócita e certas desordens do sistema nervoso central (Hosford *et al.*, 1988). Acetogeninas com atividade antineoplásica, estão presentes em folhas, frutos e sementes da espécie (Pettit *et al.*, 1988, Chen *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1997; Chávez *et al.*, 1998, 1999).

Com relação à propagação das anonáceas, George & Nissen (1987) não indicam a reprodução por sementes pelo fato das plântulas serem geneticamente diversas, além de apresentarem um longo período juvenil. Recomendam a propagação clonal a fim de eliminar a variabilidade responsável pela redução da produção e qualidade do fruto. Nesse sentido, trabalhos em cultura de tecidos vegetais com diferentes espécies da família Annonaceae têm sido realizados (Nair *et al.*, 1983, 1984a, 1984b, 1986; Jordan, 1988; Jordan *et al.*, 1990a, 1990b; Bejoy & Hariharam, 1992; Encina *et al.*, 1994; Lemos and Blake 1996a; 1996b; Figueiredo *et al.* 2000). As técnicas de propagação *in vitro* favorecem a expressão de potenciais morfo-genéticos a fim de atender a atual demanda no setor produtivo.

Recebido para publicação em 08/12/00 e aceito para publicação em 18/09/01.

Embora diferenças anatômicas sejam, algumas vezes, constatadas em plantas provenientes de cultivo *in vitro*, o prévio conhecimento de sua anatomia foliar torna-se adequado, no intuito de minimizar os problemas relativos à transferência e aclimatização das plantas, permitindo tanto o sucesso da micropropagação, quanto a avaliação da interferência dessas condições na produção de metabólitos especiais de interesse.

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo o estudo da anatomia foliar de *Rollinia mucosa*, a partir de um exemplar arbóreo, de plantas cultivadas em sementeira e de plantas propagadas sob condições *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODO

O material botânico utilizado nesse estudo foi obtido de exemplar arbóreo localizado no Horto dos Departamentos de Botânica e Farmacognosia da UFRJ, de plantas cultivadas em sementeira e plantas cultivadas *in vitro* (Albarelo *et al.*, 1996; Figueiredo *et al.*, 2001). Para a análise anatômica utilizaram-se folhas provenientes do 4º nó, localizadas em posição intermediária da copa, conservadas sob refrigeração ou nos seguintes fixadores: álcool etílico a 70°GL (Jensen, 1962), FAA 50°GL e FAA 70°GL (Johansen, 1940). Fragmentos da lâmina foliar e do pecíolo foram processados em micrótomo ou desidratados em série etílica, infiltrados e incluídos em parafina (Johansen, 1940; Sass, 1958). Cortes seriados foram executados em micrótomo automático, modelo Spencer, variando a espessura entre 10 e 15µm. Após a desparafinização e hidratação, foram submetidos à coloração. Secções com 50 a 80µm e 20 a 30µm foram obtidas, respectivamente, em micrótomo manual do tipo Ranvier e em micrótomo de congelação. As secções foram coradas pela mistura azul de astra e safranina (Bukatsh, 1972) modificada pelo uso concomitante dos dois corantes, ou por azul de Toluidina (Dop & Gautié, 1928).

A epiderme foi analisada, em vista frontal, através de cortes paradérmicos ou por dissociação utilizando-se a técnica de Schultze (Costa, 1982). Procedeu-se à contagem dos estômatos na superfície abaxial, ao nível do terço médio da lâmina foliar, para a determinação do número de estômatos/mm², calculando-se a média aritmética de 25 campos com área de 0.045mm². Na classificação dos estômatos seguiu-se a terminologia referida por Van Cotthem (1970).

Os resultados foram documentados através de desenhos e diagramas morfológicos e anatômicos, executados com o auxílio de câmara clara adaptada ao estereomicroscópio binocular Zeiss e ao microscópio ótico Leitz. Os esquemas

anatômicos seguem as convenções de Metcalfe & Chalk (1950). As fotomicrografias e respectivas mensurações foram obtidas com auxílio do microscópio Orthoplan de Leitz, com ocular micrométrica e equipamento fotográfico Orthomat.

São utilizadas nas figuras as seguintes abreviaturas: TM = terço médio; ST = secção transversal; VF = vista frontal; AD = face adaxial; AB=; face abaxial.

RESULTADO

Pecíolo Árvore

Secções transversais ao nível do terço médio exibem contorno côncavo-convexo, correspondendo o lado côncavo à face adaxial (Figura 1.e). A epiderme é uniestratificada constituída por células de secção poligonal na face ventral e elíptica na dorsal. As paredes periclinais externas são arqueadas ou discretamente retas, revestidas por estratos cuticulares lamelados, ligeiramente ondulados e anisotrópicos podendo formar discretas flanges. Um maior espessamento nesses estratos é notado na face adaxial da estrutura. Tricomas tectores unisseriados e pluricelulares, implantados ao nível das demais células epidérmicas, predominam na canaleta ventral apresentando, freqüentes vezes, de duas a quatro células. Os elementos do sistema de revestimento, em ambas as faces, evidenciam em vista frontal um contorno poligonal apresentando de quatro a seis lados. Dispõem-se paralelamente em relação ao maior eixo do órgão, sendo os tricomas encontrados na mesma orientação. A organização é alterada em torno da base dos tricomas, onde se observa uma tendência à disposição radial. Na região central correspondente à canaleta ventral, as células não se encontram na disposição anteriormente descrita, distribuindo-se desordenadamente. As células epidérmicas revelam paredes retas ou ligeiramente arqueadas, espessadas, ressaltando a ocorrência de campos de pontoações. Os estômatos são raros e situam-se fora do sulco ventral. Exibem células oclusivas grandes, circundadas por um número variável de elementos celulares, que permitem classificá-los como paracíticos ou anomocíticos. O restante da estrutura é constituído por um parênquima, que nas regiões adjacentes à epiderme, assume características de colênquima com espessamento variando de angular a anelar. O parênquima é integrado por células de dimensões variadas e contorno circular. O sistema vascular, ao nível do terço médio, é constituído por três conjuntos, com número variado de feixes voltados para a face dorsal e porções laterais do pecíolo (Figura 1.e). O conjunto voltado para a face abaxial é constituído por seis a

oito feixes do tipo colateral, separados por elementos parenquimáticos, enquanto os conjuntos laterais têm em média de nove até quatorze feixes. Na porção proximal, no ponto de inserção do pecíolo no ramo, as secções têm forma de ferradura (Figura 1.a), apresentando feixes diversamente orientados e abundância de esclereídes. Em região mais superior, nota-se o aumento do tamanho da secção e conseqüente aproximação e união dos bordos (Figura 1.b), conferindo ao pecíolo, uma secção elíptica dotada de uma depressão ventral e uma região central oca. Na região imediatamente acima, correspondente à base do pecíolo individualizado, verifica-se o achatamento da face ventral e o progressivo preenchimento da região central da secção (Figura 1.c). Neste nível, após o desaparecimento do orifício, as secções mostram-se plano-convexas, estando os feixes vasculares em número de vinte e três, dispostos em forma de "V" (Figura 1.d). Alguns destes feixes mostram-se acompanhados por células em processo de lignificação, verificando-se, também, a redução do número de esclereídes. À medida em que se atinge a porção distal do pecíolo, duas projeções laterais tornam-se evidentes, indicando a expansão da lâmina foliar (Figura 1.f), exibindo uma goteira ventral pronunciada, decorrente do aprofundamento da canaleta. Nesta região, os três conjuntos de feixes mostram-se guarnecidos dorsalmente por bainhas de fibras (Figura 2) sendo reduzido o aparecimento de esclereídes. O parênquima na porção central da secção, pode exibir certo grau de dilaceração.

Plantas cultivadas em sementeira

O pecíolo apresenta formato côncavo-convexo, em secções transversais ao nível do terço médio (Figura 3). A epiderme é simples, com células de paredes periclinais externas arqueadas, pouco espessadas, revestidas por uma fina cutícula estriada. São observados tricomas pluricelulares, unisseriados, constituídos por até quatro células.

Interiormente, um parênquima com aspecto colenquimatoso na região subepidérmica, apresenta elementos celulares de secção arredondada, delimitando pequenos meatos. O sistema vascular, na porção mediana, é constituído por três grupos de feixes posicionados em meio ao tecido fundamental. O maior, com três a cinco feixes, acha-se relacionado à face dorsal, enquanto os outros dois, com dois a quatro feixes, acham-se voltados para as porções laterais da estrutura. Dois pequenos feixes reduzidos quase que totalmente à porção floemática, estão relacionados às projeções da face ventral. A região proximal tem características semelhantes às anteriormente descritas, diferindo basicamente pela menor concavidade na face adaxial. Os dois grupos de

feixes acham-se voltados para a face dorsal, tendo menor número de elementos em cada conjunto. Na porção distal, a secção exibe duas pequenas projeções laterais. Os tecidos vasculares dispõem-se em arco mais aberto, estando o floema sempre relacionado à face dorsal. Em todo o pecíolo encontram-se estratos cambiais.

Plantas propagação *in vitro*

Em cortes transversais à porção mediana do pecíolo, observam-se secções de formato côncavo-convexo (Figura 4). A epiderme é simples, apresentando células com paredes periclinais retas ou arqueadas, notadamente na face abaxial, revestidas por uma cutícula delgada. Tricomas tectores unisseriados e pluricelulares são encontrados ao nível dos demais elementos epidérmicos.

Vistos frontalmente, os elementos do sistema de revestimento apresentam formato tabular, acompanhando a orientação do maior eixo do órgão. Os estômatos são escassos, pertencendo aos tipos anomocítico e paracítico.

Internamente à epiderme, o tecido fundamental é integrado por células de formato e dimensões mais ou menos constantes e paredes levemente espessadas. O tecido vascular, em posição mediana e distal, se dispõe em arco aberto, sendo constituído por quatro grupos de feixes do tipo colateral, com número variável de elementos. Na região proximal, os conjuntos de feixes acham-se reduzidos ao número de três, enquanto na distal, há pouca variação na organização dos feixes, havendo aumento no número de elementos.

Lâmina Foliar Exemplar arbóreo

A lâmina foliar exibe organização dorsiventral, hipoestomática, com tricomas em ambas as faces. Em secções transversais, na região do terço médio, a epiderme mostra-se uniestratificada, com elementos celulares de maiores dimensões, em geral, na face adaxial (Figura 5). Apresentam paredes levemente espessadas, depositando-se sobre as periclinais externas, uma cutícula estriada que exibe maior espessamento na face adaxial. Os estômatos mostram células estomáticas de paredes fortemente espessadas, situadas ao mesmo nível dos demais elementos. Ocasionalmente, os estômatos podem se posicionar ligeiramente acima do estrato epidérmico. Os tricomas são simples, pluricelulares, unisseriados, com número variável de duas a quatro células e acham-se implantados ao nível das células epidérmicas. Em vista frontal, as células epidérmicas pela face adaxial, exibem contorno poligonal, paredes retas ou levemente

curvas (Figura 8a). Na face abaxial as células mostram paredes retas, curvas ou com certo grau de sinuosidade (Figura 8b). Nesta face, os tricomas encontram-se em maior abundância, preferencialmente implantados sobre as nervuras. Por vezes, as células apicais do tricoma apresentam-se recurvadas. Estrias epicuticulares são observadas nas células anexas e nas células que recobrem as nervuras. Os estômatos, distribuídos aleatoriamente, são do tipo paracítico (Figura 8b) e encontram-se em densidade equivalente a $195/\text{mm}^2$. Um discreto espessamento parietal na região polar das células estomáticas pode ser observado. Raras vezes, detectam-se discretas proeminências nas extremidades das células estomáticas, que se projetam para o interior das células adjacentes, produzindo invaginações na parede. Ocasionalmente verifica-se a comunicação entre as células estomáticas e anexas, estas mostrando maior sinuosidade na região da comunicação. Estômatos maiores são encontrados entre as células que recobrem as nervuras, apresentando, eventualmente, padrão anomocítico.

O mesofilo constitui-se de parênquima paliçádico uniestratificado que comunica-se com um estrato coletor e de três a cinco camadas de parênquima lacunoso (Figura 5). A camada é constituída de células alongadas justapostas e o estrato coletor mostra-se pouco diferenciado, apresentando elementos curtos com secções variáveis, organizando-se, em certas regiões, como um segundo estrato paliçádico. O parênquima lacunoso, consta de células de secção variável e paredes delgadas, delimitando espaços intercelulares de dimensões também variáveis. Os elementos adjacentes à epiderme abaxial, exibem secção e disposição mais regulares, originando na região dos estômatos, pequenas câmaras. As nervuras de médio porte são do tipo transcurrente apresentando feixes condutores guarnecidos por fibras dispostas em casquete, formando bainhas esclerenquimáticas, cuja extensão se projeta até à epiderme. As nervuras de pequeno porte localizam-se nos limites entre o paliçádico e o lacunoso ou totalmente imersas no parênquima lacunoso. Esses feixes podem exibir fibras associadas aos dois tecidos vasculares, associadas somente ao floema, ou não exibirem tecido mecânico.

Secções transversais da nervura principal, na região do terço médio, evidenciam um leve arqueamento na face adaxial, contrastando com a acentuada convexidade da face abaxial (Figura 9b). O tecido de revestimento exibe características semelhantes às descritas para o restante da folha, podendo perceber-se, no entanto, maior espessamento cuticular e redução do tamanho da secção das células epidérmicas que revestem a

face abaxial (Figura 10). O parênquima clorofiliano na região adaxial, apresenta-se modificado, verificando-se que os elementos paliçádicos perdem gradativamente o formato e a orientação, constatando-se abaixo da epiderme, de um a três estratos de células de secção retangular com paredes espessadas. Em relação ao parênquima lacunoso, o mesmo transiciona para um parênquima fundamental, que guarnece lateralmente e dorsalmente o sistema vascular. Na porção dorsal da nervura esse tecido mostra características colenquimáticas nos estratos adjacentes à epiderme, variando o seu número, de um a quatro. Entre a bainha colenquimática e os demais elementos do parênquima fundamental, visualizam-se de dois a três estratos com paredes colapsadas (Figura 10). O sistema vascular se dispõe em anel interrompido, constituído por vinte feixes em média, do tipo colateral, guarnecidos por casquetes de fibras mais ou menos desenvolvidos, que chegam a se anastomosar formando uma bainha quase contínua (Figura 9b). A porção proximal se distingue pela maior dimensão da secção destacando-se do mesofilo e pela abundância de elementos do sistema vascular (Figura 9a). A região central da secção apresenta células parenquimáticas com paredes dilaceradas, entre as quais podem figurar esclereídes (Figura 9a). Ao nível distal (Figura 9c), é notável a redução do número de estratos parenquimáticos, chegando a apenas um, na região externa à zona de células colapsadas. Verifica-se uma acentuada esclerificação dos tecidos no centro da secção, que apresenta-se íntegra. O bordo apresenta-se ligeiramente fletido em direção à face abaxial. As células epidérmicas nesta região, apresentam menor secção, assemelhando-se à epiderme que reveste a nervura principal. Os estratos subepidérmicos assumem características de colênquima.

Plantas cultivadas em sementeira

Secções transversais da lâmina foliar, na região do terço médio (Figura 6), revelam organização dorsiventral, hipoestomática, com tricomas em ambas as faces. A epiderme é simples, com células de secção retangular à elíptica e paredes finas. Uma cutícula lisa e delgada está depositada sobre as paredes periclinais externas. Comparativamente, a parede periclinal externa das células que revestem a face adaxial apresenta maior espessamento. Tricomas tectores simples, pluricelulares e unisseriados, com até quatro células, acham-se implantados ao nível dos demais elementos epidérmicos. Os estômatos encontram-se ao mesmo nível ou discretamente projetados, com células estomáticas pequenas e paredes fortemente espessadas. Em vista frontal, as células

epidérmicas apresentam contorno variável em consequência da sinuosidade das paredes celulares em ambas as faces (Figuras 8b e 8c), observando-se em torno da base dos pêlos uma disposição radiada. Os estômatos, observados apenas na face abaxial, são do tipo paracítico, distribuídos aleatoriamente, com densidade média de 102/mm². Em relação ao complexo estomático, é possível observar-se, com freqüência, projeções de conteúdo das células estomáticas que se ligam às paredes opostas das células anexas, produzindo uma constrição ao nível mediano destas células (Figura 8d). As células estomáticas possuem espessamento parietal nas regiões polares, podendo também verificar-se a presença de pequenas projeções, correspondentes a evaginações na parede das células anexas.

O mesofilo é formado por parênquima paliçádico uniestratificado, cujos elementos exibem secção triangular, assemelhando-se a um estrato coletor (Figura 6). O parênquima lacunoso dispõe-se em três a quatro estratos em média, com células variadamente lobadas guarnecendo espaços intercelulares amplos, sobretudo na região subestomática. As nervuras de médio e menor porte estão imersas no parênquima lacunoso. As de médio porte, apresentam feixes colaterais circundados por fibras esclerenquimáticas que se comunicam com as células do parênquima paliçádico pela face adaxial e com as células subepidérmicas, pela face abaxial. Ao nível da nervura principal, pela face abaxial, as células epidérmicas transicionam de um formato mais alongado no sentido periclinal, para secções com menor lúmen e paredes mais espessadas. O tecido fundamental mostra-se homogêneo, com número reduzido de feixes vasculares. Fibras perivasculares são encontradas e, externamente à região perivascular, podem ser assinaladas algumas células iniciando um processo de colapamento das paredes (Figura 11). Na região proximal, a nervura destaca-se do mesofilo, apresentando maior número de camadas de parênquima na face abaxial, maior desenvolvimento do tecido vascular e maior grau de lignificação das fibras perivasculares. A região distal distingue-se por um discreto espessamento subepidérmico observado na face abaxial, além da redução do tecido vascular e ausência de fibras perivasculares.

Na região correspondente ao bordo, percebe-se uma discreta curvatura da lâmina em direção à face abaxial, apresentando células epidérmicas com maior espessamento das paredes. Os elementos do parênquima paliçádico assumem gradativamente uma secção circular, constituindo com um a três estratos de parênquima lacunoso, a porção distal do bordo.

Plantas propagadas *in vitro*

A partir de cortes transversais ao nível mediano detecta-se a lâmina foliar com estrutura dorsiventral e hipoestomática (Figura 7). Os elementos epidérmicos possuem paredes arqueadas ou levemente retas, sobre as quais deposita-se uma fina cutícula. Tricomas tectores são encontrados em ambas as faces da lâmina, sendo mais abundantes na face abaxial e sobre as nervuras, apresentando as mesmas características encontradas no pecíolo. Os estômatos mostram-se ao nível ou discretamente projetados em relação às células epidérmicas (Figura 7). Em vista frontal, as células epidérmicas exibem formato poligonal, apresentando na face adaxial paredes retas com cinco ou seis lados, em geral (Figura 8e). Os estômatos estão distribuídos por toda a face abaxial, numa densidade aproximada de 220/mm² (Figura 8f). Nessa condição de cultivo, verifica-se que apresentam dimensões muito variáveis, produto de sua fase de diferenciação, permitindo distinguir também estômatos pertencentes ao tipo paracítico, e com menor freqüência ao tipo anomocítico. Em geral, as células estomáticas mostram-se túrgidas, conferindo ao estômato um contorno mais circular, observando-se naqueles já diferenciados, a ocorrência de um discreto espessamento parietal na região polar das células estomáticas. A conexão entre a célula estomática e a célula anexa pode ser verificada (Figura 8f). Ao nível do terço médio, o mesofilo é formado por um parênquima paliçádico organizado em um só estrato, constituído por células largas, por vezes com secção tendendo para o formato triangular, exibindo em geral, extremos arredondados (Figura 7). Estas células deixam entre si, pequenos espaços intercelulares, mais freqüentes na região correspondente à metade interna da altura celular. O parênquima lacunoso constitui-se de três ou quatro estratos, com células de secção arredondada ou poligonal, que determinam espaços intercelulares de dimensões variáveis. As nervuras de menor porte, reduzidas aos elementos traqueais, encontram-se nos limites entre os parênquimas paliçádico e lacunoso, sendo envolvidas por células parenquimáticas. As nervuras de médio porte, caracterizam-se por apresentar os elementos condutores envolvidos por uma bainha parenquimática, guarnecida nas duas extremidades por conjuntos de fibras, que no caso das nervuras de maior porte, chegam a produzir o arqueamento da lâmina na face abaxial e a reduzir a altura dos elementos do parênquima paliçádico. Nessas nervuras, a bainha parenquimática pode se mostrar lignificada. Ao nível da nervura principal (Figura 12), as células epidérmicas mostram dimensões reduzidas e paredes mais espessadas na face abaxial, verificando-se o arqueamento das paredes

periclinais externas, as quais assumem um aspecto festonado. A cutícula é discretamente mais espessada que no restante da lâmina, exibindo estriações que insinuam-se entre as paredes anticlinais. O parênquima paliçádico da lâmina foliar, mantém-se na região da nervura, enquanto os demais tecidos que envolvem o sistema vascular, mostram características de tecido fundamental. Os elementos celulares adjacentes à epiderme abaxial, apresentam maior espessamento parietal, chegando a constituir de um a dois estratos mecânicos. Entre as células parenquimáticas que guarnecem o tecido vascular e os elementos adjacentes à epiderme abaxial, observa-se a ocorrência de estratos colapsados. O sistema vascular é composto por cinco a seis feixes, em média, envolvidos lateralmente e ventralmente por um estrato interrompido de fibras. Na região proximal (Figura 13), a nervura mediana difere da região do terço médio, pelas seguintes características: arqueamento mais pronunciado na face ventral; interrupção do parênquima paliçádico, que assume as características de um parênquima fundamental; ocorrência na face abaxial de lacunas posicionadas na porção mediana do parênquima fundamental; disposição em forma de arco aberto do sistema vascular, constituído por até dez feixes e fibras perivasculares em diferenciação e a ausência da região de células colapsadas. Na região distal, verifica-se a redução do sistema vascular, não disposto mais em arco, e a integridade do parênquima fundamental na face abaxial. Na porção correspondente ao bordo, a lâmina foliar mostra-se levemente recurvada em direção à face abaxial, apresentando células epidérmicas com lúmen reduzido e leve espessamento nas paredes periclinais externas. Os elementos do parênquima paliçádico assumem gradativamente secção circular, constituindo de um a dois estratos de parênquima lacunoso, a porção distal do bordo.

DISCUSSÃO

O estudo da anatomia foliar de *R. mucosa* revela diferenças quanto ao grau de sinuosidade das paredes das células epidérmicas em função da origem do material. No exemplar arbóreo, a sinuosidade das paredes anticlinais pode ser observada somente na face abaxial, enquanto que nas plantas cultivadas em sementeira esta característica mostrou-se acentuada e presente em ambas as epidermes. Durante o desenvolvimento da folha, as células epidérmicas continuam a expandir-se mesmo após os elementos celulares do mesofilo terem alcançado o seu tamanho final. As tensões sofridas em resposta a variações da pressão exercida no mesofilo, promoveriam a distorção das paredes anticlinais das células

epidérmicas formando sinuosidades, as quais exercem importante função mecânica, prevenindo o colapso parietal no caso de escassez de água (Cutter, 1977; Esau, 1985). No caso das plantas de *R. mucosa* cultivadas em sementeira, tal característica evitaria danos ao material jovem, mais suscetível à dessecação. Nas plantas cultivadas *in vitro*, a sinuosidade não foi observada. Considerando que a sinuosidade pode também ser decorrente das condições de luminosidade e umidade (Watson, 1942; Esau, 1985) e como, no ambiente de cultura *in vitro*, as taxas de umidade relativa são elevadas, este pode ser um dos fatores responsáveis pela formação de paredes sem sinuosidades. Se a sinuosidade das paredes pode prevenir o colapso parietal, a ausência deste caráter tornaria as plantas cultivadas *in vitro* menos tolerantes a uma situação de estresse hídrico, comprometendo o estabelecimento *ex vitro* (Cassels & Walsh, 1994).

As folhas de plantas de *R. mucosa* cultivadas *in vitro* apresentaram densidade estomática maior do que as folhas de outras origens. A alta densidade estomática de plantas cultivadas *in vitro* seria uma característica anatômica correlacionada à maior suscetibilidade à dessecação (Wetzstein & Sommer, 1982), a qual pode ser revertida durante a etapa de aclimatização. Estômatos levemente projetados e abertos, com diferentes tamanhos e formatos, também foram observados por Donnelly & Vidaver (1984) em culturas de *Rubus idaeus*. Também estômatos abertos, circulares, não uniformemente distribuídos e mais numerosos, são descritos para plantas de *Rosa* cultivadas sob condições *in vitro* (Johansson *et al.*, 1992). Segundo os autores, o fato dos estômatos permanecerem abertos em plantas cultivadas *in vitro*, está relacionado ao alto grau de umidade registrado no interior dos frascos de cultura, comportamento que também pode ser revertido durante as fases de aclimatização.

Por mostrarem-se razoavelmente constantes, os caracteres epidérmicos têm significado taxonômico nas Annonaceae (Olowokudejo, 1990). Em *R. mucosa* verificou-se que as células anexas não atingem as extremidades das células estomáticas, as quais podem apresentar projeções em direção às células epidérmicas adjacentes, confirmando a descrição feita por Patel (1971) e Kook-Noorman (1992) para a família Annonaceae. Comunicações foram encontradas entre a célula estomática e a anexa em todas as situações estudadas, que, segundo Esau (1977), podem ser interpretadas como plasmodesmos. Estas comunicações foram relacionadas ao desenvolvimento incompleto do complexo estomático, uma vez que no exemplar arbóreo, a ocorrência de tais comunicações é menos freqüente, principalmente quando folhas mais expandidas ou mais velhas são analisadas.

Uma característica favorável à utilização das

plantas de *R. mucosa* cultivadas *in vitro* é a organização do mesófilo, com parênquima paliádico diferenciado e sem exibir grandes espaços intercelulares, à semelhança daquele encontrado nas plantas oriundas das outras condições de cultivo. Este aspecto favorece à fase de aclimatização dessas plantas, pois nas espécies cultivadas *in vitro*, com ausência desta organização, esta etapa não foi alcançada, representando uma limitação à micropropagação (Brainerd *et al.*, 1981; Wetzstein & Sommer, 1982; Grattapaglia & Machado, 1998).

O mesófilo de espécies pertencentes ao gênero *Rollinia* consiste de duas a três camadas de parênquima paliádico e um parênquima lacunoso frouxamente arrumado ou compacto (Koek-Noorman, 1992). Em *R. mucosa*, foi possível constatar nas folhas do espécime arbóreo, uma camada subepidérmica de células em paliçada e um segundo estrato com elementos mais curtos caracterizando um estrato coletor. Nas folhas das plantas das outras duas origens, o primeiro estrato apresenta células mais curtas com formato triangular à semelhança de um estrato coletor, ou elementos curtos com extremos arredondados. Dessa forma, os elementos típicos de uma paliçada só foram observados no exemplar arbóreo, assim como a ocorrência de nervuras transcurrentes.

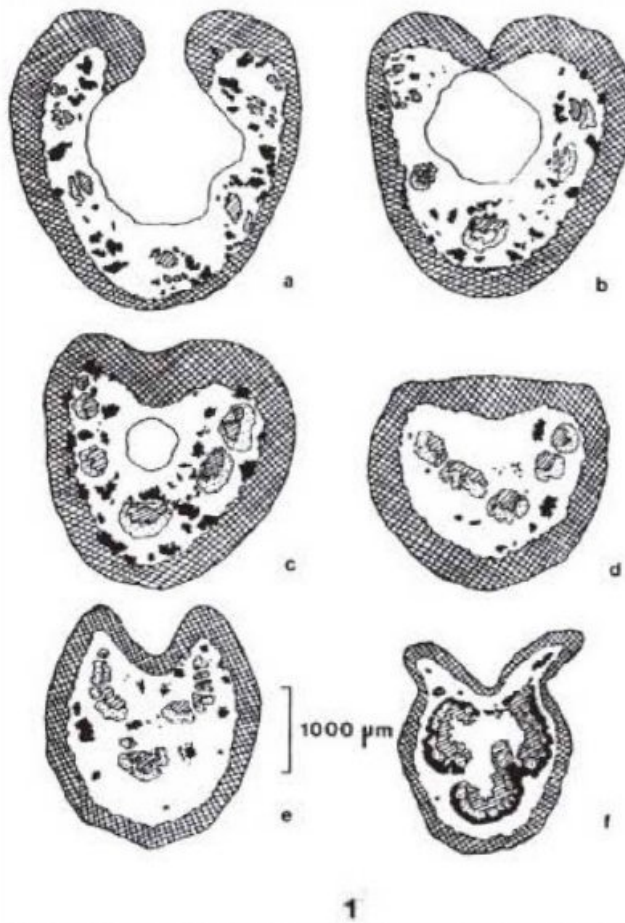
A presença de extensões de bainhas de feixe atingindo a epiderme, é uma característica freqüente dentro do gênero *Rollinia*, valiosa na identificação de espécies (Koek-Noorman, 1992). A nervura principal em Annonaceae tem uma forma bastante comum, visivelmente saliente na face dorsal da lâmina foliar, apresentando fibras situadas acima e abaixo do floema (Mauseth, 1988). Nesta organização, constatada na folha do exemplar arbóreo de *R. mucosa*, observaram-se também grupos de esclereídes. Estes são encontrados nas porções proximais da nervura e diminuem à medida em que se atinge as regiões mediana e distal, sendo a sua ausência compensada pelo aumento das fibras perivasculares. O sistema vascular nas plantas propagadas *in vitro* mostrou um reduzido número de elementos condutores, mesmo em

comparação com as plantas de sementeira. Cozza *et al.*, (1997) atribuem estas características às condições nutricionais, à influência do processo de diferenciação vascular em relação ao meio de cultivo e ao genótipo da planta. O reduzido número de elementos condutores pode ser considerado um dos fatores de risco ao processo de aclimatização, devido à precária conexão vascular estabelecida entre o caule e o sistema radicular (Johansson *et al.*, 1992; Grattapaglia & Machado, 1998). Porém os autores informam que durante o processo de aclimatização, o enraizamento pode ocorrer simultaneamente, se as plantas provenientes do ambiente *in vitro* são tratadas como micro-estacas em substrato adequado na casa de vegetação.

Mais externamente à região perivascular, uma faixa de células colapsadas na face abaxial é verificada, sendo mais definida no exemplar arbóreo e nas plantas propagadas *in vitro*. Koek-Noorman (1992) cita esta região como uma zona de células achatadas, freqüentemente encontrada no tecido parenquimático que circunda abaxialmente a nervura principal de espécies de *Rollinia*. Em *R. dolabripetala*, Silva (1982) refere-se a esta região como um parênquima fundamental com células de contornos irregulares e paredes delgadas, entre as quais ocorrem meatos. Com base nessas citações e nos resultados aqui obtidos, esta característica também demonstra ser de valor diagnóstico.

O estudo da anatomia foliar de *R. mucosa* permitiu verificar a ocorrência de características histológicas que acham-se geneticamente fixadas, independente do estágio de desenvolvimento e da condição de cultivo. Com relação às plantas cultivadas *in vitro*, observaram-se caracteres que possibilitam a sua sobrevivência após a transferência para condições não estéreis.

Considerando todos esses aspectos, o conhecimento prévio dos caracteres anatômicos de *R. mucosa* torna promissora a propagação da espécie através da cultura de tecidos vegetais, garantindo material disponível e em boas condições fitossanitárias para os estudos que venham explorar as potencialidades da espécie como planta medicinal.



2

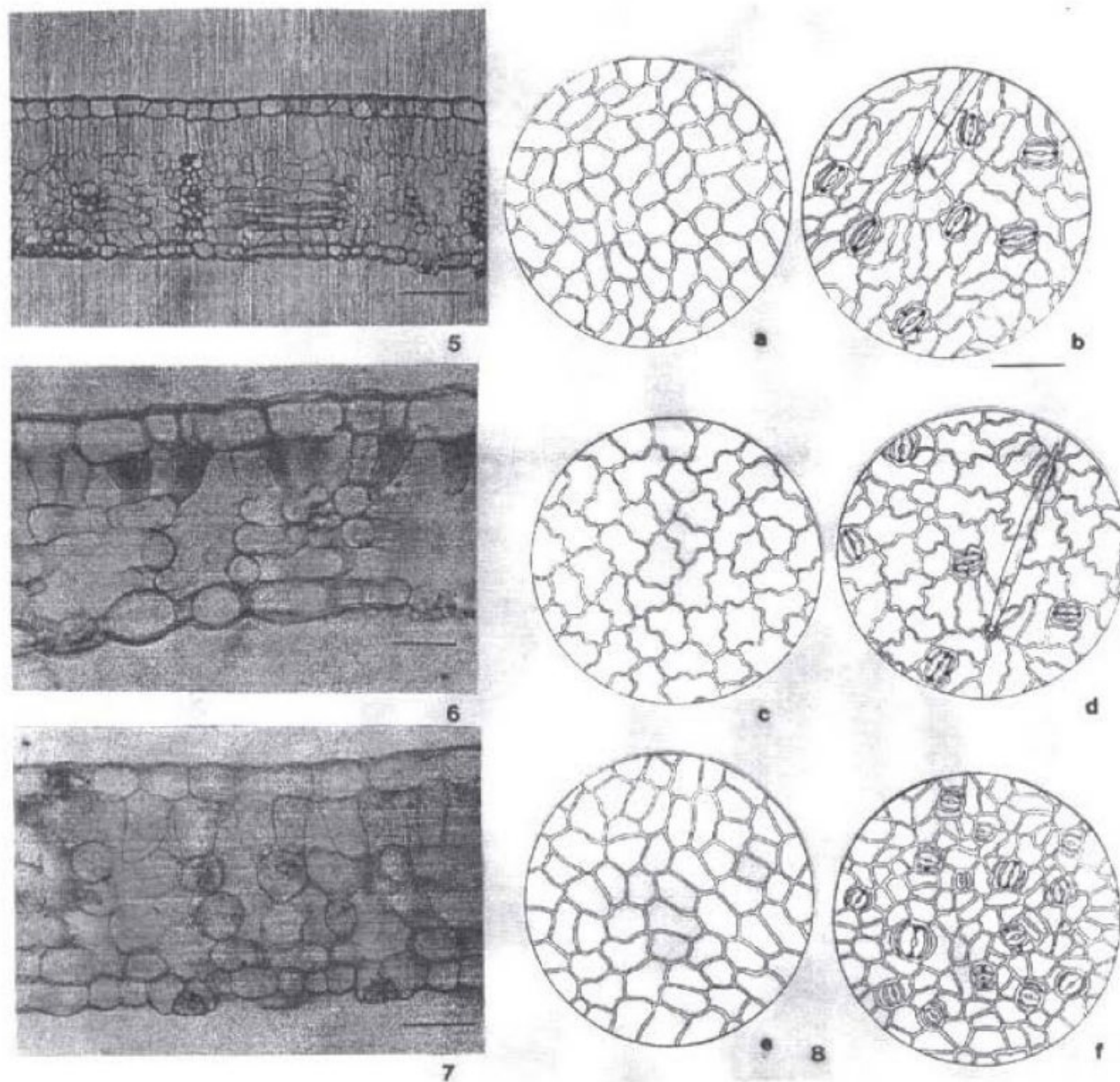


3

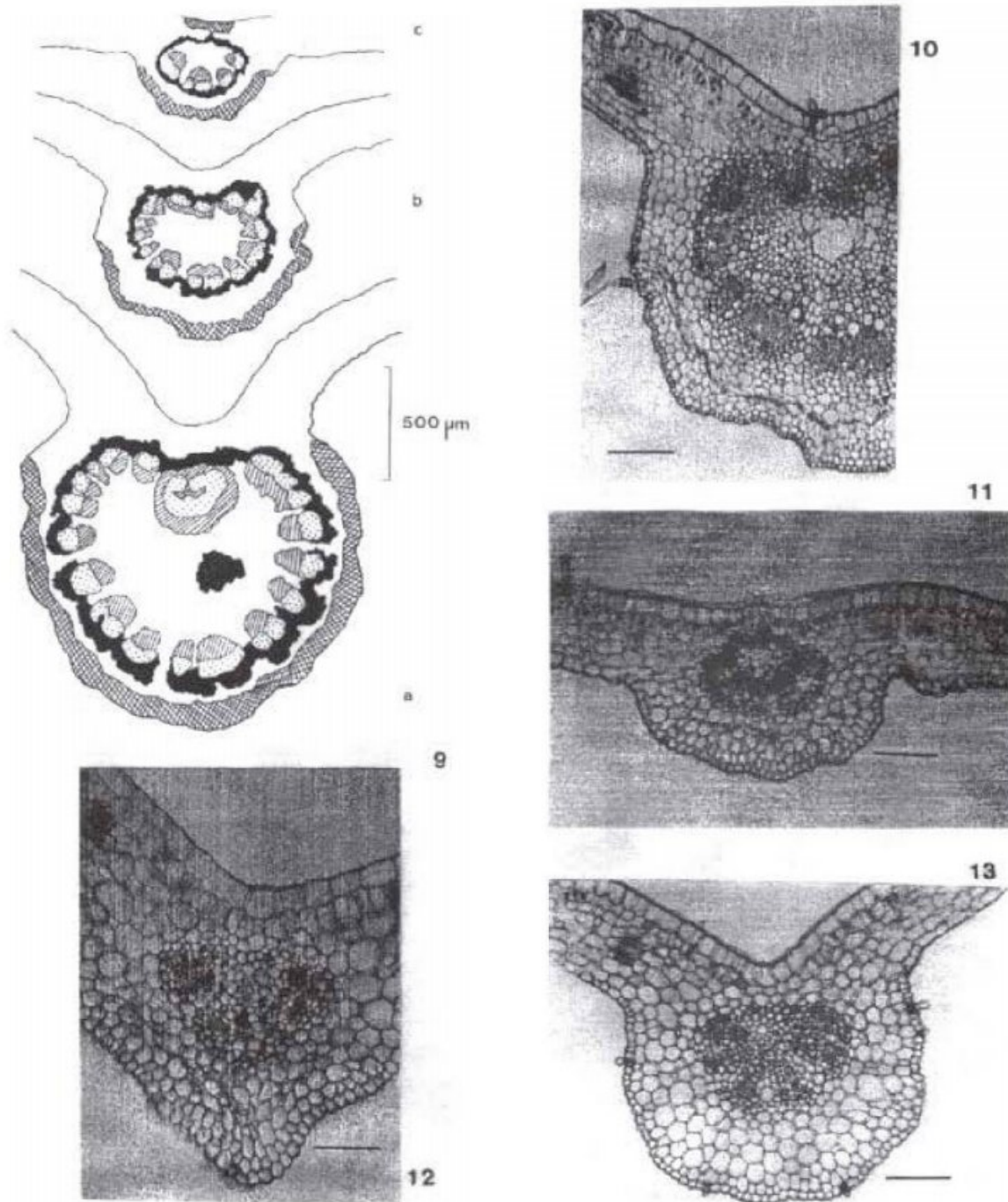


4

FIGURAS 1 a 4 - Pecíolo de *R. mucosa* em ST.
FIGURA 1 - Esquema seqüencial do exemplar arbóreo mostrando a disposição do sistema vascular e a distribuição de esclerêdeos. **1a a 1d -** Região proximal, desde a zona de inserção no ramo; **1e -** Região mediana; **1f -** Região distal.
FIGURA 2 - Terço distal no exemplar arbóreo (Barra = 131,2 μ m). **FIGURA 3 -** Hemi-seção do TM de planta cultivada em sementeira (Barra = 132 μ m). **FIGURA 4 -** TM de planta propagada *in vitro* (Barra = 142,5 μ m)



FIGURAS 5 a 8 - Lâmina foliar de *R. mucosa* ao nível do TM. **FIGURA 5** - ST do exemplar arbóreo (Barra = 87,5 μ m). **FIGURA 6** - ST da planta cultivada em sementeira (Barra = 41 μ m). **FIGURA 7** - ST da planta propagada *in vitro* (Barra = 34,2 μ m). **FIGURA 8** - Esquema das epidermes em VF. **8a e 8b** - Exemplar arbóreo; **8c e 8d** - Planta cultivada em sementeira; **8e e 8f** - Planta propagada *in vitro* (Barra = 50 μ m).



FIGURAS 9 a 13 - Nervura principal de *R. mucosa* em ST. **FIGURA 9** - Esquema do exemplar arbóreo. **FIGURA 9a** - Região proximal; **FIGURA 9b** - Região mediana; **FIGURA 9c** - Região distal. **FIGURA 10** - Hemi-secção do TM do exemplar arbóreo (Barra = 278,4µm). **FIGURA 11** - TM da planta cultivada em sementeira (Barra = 144µm). **FIGURA 12** - TM da planta propagada *in vitro* (Barra = 86,5µm). **FIGURA 13** - Região proximal da planta propagada *in vitro* (Barra = 84,5µm).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALBARELLO, N., FIGUEIREDO, S. F. L., NEVES, L. J. Análise histoquímica das folhas se *R. mucosa* (Jacq.) Bail. considerando as condições de cultivo *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.77, n.2, p.59-64, 1996.
- AMOROZO, M. C. M. & GELLY, A. Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo amazonas. Barbacena, PA, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v.4, n.1, p. 47-131, 1988.
- BEJOY, M. & HARIHARAN, M. *In vitro* plantlet differentiation in *Annona muricata*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.31, p. 245-247, 1992.
- BRAGA, M. M. N. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. **Acta amazônica**, v.3, p. 5-74, 1977.
- BRAINERD, K. E., FUCHIGAMI, L. H., KWIATKOWSKI, S., CLARK, C. S. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured "Pixy" plum grown under different environments. **Horticulture Science**, v.16, p. 173-175, 1981.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen Zur Doppelfarbnung Astrablau-Safranin. **Mikrokosmos**, v. 61, n.8, p. 255, 1972.
- CASSELLS, A.C., WALSH, C. The influence of gas permeability of the culture lid on calcium uptake and stomatal function in *Dianthus* microplants. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** v.37, p.171-178, 1994.
- CAVALCANTE, P. B. Frutas comestíveis da Amazônia. **Publicações avulsas do Museu Goeldi**, v.17, p.23-29, 1972.
- CHACUR, F. Contribuição ao estudo da nervação foliar das Acanthaceae, Anacardiaceae e Annonaceae dos cerrados. **Arquivos de Botânica do Estado de São Paulo**, v.4, n.3, p. 141-52, 1968.
- CHÁVEZ, D., ACEVEDO, L. A. & MATA, R. Jimenezin, a novel annonaceous acetogenin from seeds of *R. mucosa* containing adjacent tetrahydrofuran-tetrahydropyran ring systems. **Journal of Natural Products**, v.61, p.419-421, 1998.
- CHÁVEZ, D., ACEVEDO, L. A., MATA, R. Tryptamine derived amines and acetogenins from the seeds of *R. mucosa*. **Journal of Natural Products**, v.62, n.8, p.1119-1122, 1999.
- CHEN, Y. Y., CHANG, F. R., YEN, H. F., WU, Y. C. Epomusenins A and B, two acetogenins from fruits of *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v.42, n.4, p.1081-1083, 1996.
- CLEMENT, C. R. Frutos da Amazônia. **Ciência Hoje**, v.14, n.83, p.28-37, 1992.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984. v.1. 747p.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2 ed., Lisboa, Fundação Calouste Gulbekian. 1982. v.3. 1032p.
- COZZA, R., TURCO, D., BATI, C.B., BITONTI, M.B. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.51, p.2185-223, 1997.
- CUTTER, E. G. **Plant Anatomy: experiment and interpretation**. London, William Clones & Sons Limited, 1971. 304p.
- DONNELLY, D. J. & VIDAVER, W. E. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v.109, p.172-6, 1984.
- DOP, P. & GAUTIÉ, A. **Manuel de Technique Botanique**. 2 ed. Paris, J. Lamarre Ed., 1928. 594 p.
- ENCINA, C.L., BARCELÓ-MUÑOZ, HERRERO-CASTÑO, PLIEGO-AFARO F. *In vitro* morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill. Bud explants. **Journal of Horticulture Science**, v. 69, n.6, p. 1053-59, 1994.
- ESAU, K. **Anatomy of seed plants**. 2. ed. New York, John Wiley & Sons Inc., 1977. 550p.
- ESAU, K. **Anatomia vegetal**. Trad. Dr. Jose Pons Rossel. 3. ed. Barcelona, Omega, 1985. 779p.
- FIGUEIREDO, S. F. L. FIGUEIREDO, S.F.L., VIANA, V.R.C., SIMÕES, C., ALBARELLO, N., TRUGO, L.C., KAPLAN, M.A.C., KRUL, W.R. Lignans from leaves, seedlings and micropropagated plants of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. - Annonaceae. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.56, p. 121-4, 1999.
- FIGUEIREDO, S.F.L., ALBARELLO, N. VIANA, V.R.C. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. **In Vitro and Developmental Biology Plant**, v. 37, n.4, p.471-475, 2001.
- GEORGE, A. P. & NISSEN, R. J. Propagation of *Annona* species: a review. **Scientia Horticultural**, v.33, p. 75-85, 1987.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. & BUSO, J. A. (eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA-CNPq, 1998. p.99-169.
- GU, Z. M., ZHOU D. W., LEWIS, N. J., WU, J., SHI, G. E. & MCLAUGHLIN, J. L. Isolation of new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by liquid chroma-tography mass spectrometry. **Bioorganism Medical Chemistry**, v.5, n.10, 1911-16, 1997.
- HABERLANDT, G. **Physiological Plant Anatomy**. 4. ed. Trad. Montagu Drummond. London, Macmillan & Co. Ltda., 1928. 324p.
- HOSFORD, D., MENCIA-HURTA, J.M., PAGE, C., BRAQUET, P. Natural antagonists of platelet activating factor. **Phytoterapy research**, v.2, n.1, p.1-24, 1988.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco, W. H. Freeman & Co., 1962. 408 p.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 1. ed. New York and London, MacGraw - Hill Book Company, Inc., 1940. 523 p.
- JOHANSSON, M., KRONESTEDT-ROBARDS, E.C., ROBARDS, A. W. Rose leaf structure in relation to different stages of micropropagation. **Protoplasma**, v.66, p. 165-176, 1992.
- JONES, L. H. P. **Microscopical technique**. 3. ed. New York., 1950. 523.
- JORDAN, M. Multiple shoot formation and rhizogenesis from cherimola (*Annona cherimola* L.) hypocotyls and petiole explants. **Gartenbauwissenschaft**, v.53, n.5, p.234-7, 1988.

- JORDAN, M., ARCE, P., GUTIÉRREZ, A., ROVERARO, C. Inducción de respuestas morfológicas "in vitro" mediante co-cultivo de diferentes especies frutales. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.17, n.1-2, 13-17, 1990a.
- JORDAN, M., ARCE, P., ROVERARO, C. Micropropagación "in vitro" de algunas especies frutícolas de Chile. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.17, n.3, p.111-6, 1990b.
- KOEK-NOORMAN, J. & MAAS, P. J. M. Systematic position and subdivision of *Rollinia*. In: MAAS, P. J. M. & WESTRA, L. Y. T. (eds). **Flora Neotropica**: Monograph 57, *Rollinia*. New York: The New York Botanical Garden, Copyright, 1992. p.55-59.
- LEMOS, E.E.P. & BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and adult *Annona squamosa*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.46, p.77-9, 1996a.
- LEMOS, E.E.P. & BLAKE, J. Micropropagation of juvenile and adult *Annona muricata*. **Journal of Horticultural Science**, v.71, n.3, p.395-403, 1996b.
- MAAS, P. J. M. & WESTRA, L. Y. T. **Flora Neotropica**: Monograph 57, *Rollinia*. New York: The New York Botanical Garden, Copyright, 1992. 188 p.
- MAUSETH, J. D. **Plant anatomy**. California, The Benjamin/Cumming Publishing Company: Inc. Copyright, 1988. 560 p.
- METCALFE, C. R. & CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Oxford, Clarendon Press, 1950. 1500 p.
- NAIR, S., GUPTA, P.K. & MASCARENHAS, A.F. Haploid plants from *in vitro* anther culture of *Annona squamosa* Linn. **Plant Cell Reports**, v.2, p.198-200, 1983.
- NAIR, S., GUPTA, P. K., SHIRGURKAR, M. V., MASCARENHAS, A. F. *In vitro* organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* Linn. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.3, p.29-40, 1984a.
- NAIR, S., GUPTA, P.K. & MASCARENHAS, A.F. () *In vitro* propagation of *Annona* hybrid *Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* L.. **Indian Journal of Horticultural**, v.41, n.3/4, p.160-5, 1984b.
- NAIR, S., SHIRGURKAR, M.V. & MASCARENHAS, A.F. Studies on endosperm culture of *Annona squamosa* Linn. **Plant Cell Reports**, v. 5, p.132-5, 1986.
- NGIEFU, C. K., PAQUOT, C., VIEUX, A. Les plants à huile du Zaïre. II. - Familles botaniques fournissant des huiles d'insaturation moyenne. **Oléagineux**, v.31, n.12, p. 545-7, 1976.
- OLWOKUDEJO, J. D. Comparative morphology of leaf epidermis in the genus *Annona* (Annonaceae) in west Africa. **Phytomorphology**, v. 40, n.3-4, 407-2, 1990.
- PATEL, R. J. Epidermal structure and developments of stomata in some Annonaceae. **Annals of Botany**, v.35, n.14, p. 1205-12, 1971.
- PAULO, M. Q., KAPLAN, M. A., LAPRÉVOTE, O., ROBLLOT, F., HOCQUEMILLER, R., CAVÉ, A. Lignans and other non-alkaloidal constituents from *Rollinia mucosa*, Annonaceae. **Fitoterapia**, v.62, n.2, p.150-1, 1991.
- PAULO, M. Q. **Estudo químico-ecológico de Annonaceae**. Tese de doutorado, Rio de Janeiro: UFRJ, 1992. 152p. NPPN /Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- PETTIT, G. R., CRAGG, G. M., POLONSKI, J., HERALD, D. L., GOSWAMI, A., SMITH, C. R., MORETTI, C., SCHMIDT, J. M., WEISLEDER, D. Isolation and structure of rolliniastatin 1 from the South American tree *Rollinia mucosa*. **Canadian Journal of Chemistry**, v.65, n. 1433-3, 1988.
- PRANCE, G. T. & SILVA, M. F. **Árvores de Manaus**. Manaus, INPA, 1975. 312P.
- PORTO, P. C. Plantas indígenas e exóticas provenientes da Amazônia, cultivadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Rodriguesia**, v.2, n.5, 1936. 194 p.
- SASS, J. S. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Iowa, Press Building, Ames, 1951. 228 p.
- SOLEREDER, H. Annonaceae. In: **Systematic anatomy of dicotyledons**. Oxford, Clarendon Press, 1908. 1182 p.
- SILVA, M. M. **Considerações sobre a anatomia foliar de duas Annonaceae do Maciço da Tijuca**. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: UFRJ, 1982. 111p. Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- VAN COTTHEM, W. R. J. A classification of stomatal types. **Botanical Journal of Linnaeus Society**, v. 63 n.3, p. 235-46, 1970.
- WATSON, R. W. The effect of cuticular hardening on the form of epidermal cells. **New Phytologist**, v. 41, p. 223-2, 1942.
- WETZSTEIN, H. Y. & SOMMER, H. E. Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. **American Journal of Botany**, v. 69, n.10, p.1579-86, 1982.
- ZÁCHIA, R. A. **Estudos taxonômicos na família Annonaceae Juss. no Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre: UFRGS, 1994. 366 p. Instituto de Biociências, Departamento de Botânica.