

BIBLIOTECA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**Embriogênese em *Ilex paraguariensis* St. Hil.
Aspectos do Suspensor e Endosperma**

Eliane D. Heuser

TESE BOT/176
H5958

Universidade Federal do R. G. S.
INSTITUTO DE BOTÂNICA
Departamento de Botânica
BIBLIOTECA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Botânica.

Orientador

Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Porto Alegre, março de 1999

AGRICULTURA

SEI VORIAS... do R. G. S.
INSTITUTO PRODUÇÃO
Departamento de Botânica
BIBLIOTECA

A

Carlos (Alemão), João e Martina

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath, por toda contribuição na minha formação científica, dedicação e ao exemplo como profissional.

Ao Prof. Dr. Alfredo Elio Cocucci, pela análise crítica de determinadas fases deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao colega MSc. Rinaldo Pires dos Santos, pelo companheirismo, auxílio na parte técnica e troca de idéias.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal, pelo estímulo e bons momentos passados no ambiente de trabalho.

Ao Prof. Dr. Miguel Porto, do Departamento de Fitopatologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS, pela cedência de uso do ultramicrotomo Reichert Ultracut-E, do "Knifemaker" e cedência de vidro especial para confecção de navalhas.

Ao Prof. Dr. Felipe L. Schneider, na época Coordenador do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Ciências Morfológicas - UFRGS, pela acesso ao uso dos equipamentos daquela Laboratório, na fase de pré-microscopia (M.E.T.).

Ao Prof. Dr. Severo Sales de Barros, na época, responsável pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria, e das funcionárias do mesmo Laboratório, pelo uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Ao Prof. José R. R. Coiro consultor do Laboratório de Microscopia Eletrônica da ULBRA, pela dedicação na tentativa de solucionar problemas técnicos no decorrer da pesquisa e por oportunizar a utilização do Microscópio Eletrônico de Transmissão daquele Laboratório.

À Prof. Dra. Ivana B. Mânica da Cruz e ao Prof. Dr. Emilio Jeckel Neto, por ter possibilitado a realização de testes imunológicos no Laboratório de Geriatria e Gerontologia do Instituto de Pesquisa Biomédica - PUCRS.

Ao Prof. Dr. Emilio Jeckel Neto, pela troca de idéias e discussões sobre "Apoptose", que muito contribuíram no desenvolvimento deste tema.

À Bibliotecária Débora Kraemer de Araujo, pela revisão e orientação quanto à apresentação das referências bibliográficas.

À MSc. Bibiana Cassol, Técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela eficiência, cooperação e amizade.

À Técnica Christiane de Queiroz Lopes, pelo auxílio e incentivo recebidos durante a fase execução das tarefas referentes ao preparo do material para análise em Microscopia Eletrônica de Transmissão, tanto na UFRGS como ULBRA.

À Raquel Mattos Oliveira, Técnica do Laboratório de Geriatria e Gerontologia do Instituto de Pesquisa Biomédica – PUCRS pelo auxílio na realização dos Testes Imunológicos.

À Fundação Zoobotânica do Estado do Rio Grande do Sul, em especial ao Técnico Cleonir José Mansan, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela obtenção das eletromicrografias.

Ao Prof. Georg Hennig, diretor executivo do Jardim Botânico da FZB-RGS, pela autorização para a realização de coletas, nos anos de 1992 e 1993, nas plantas pistiladas de *Ilex paraguariensis*, localizadas nesta instituição.

Ao Prof. Ivo Krauspenhar, diretor executivo do Jardim Botânico da FZB-RGS, pela autorização para a realização de coletas, nos anos de 1994 a 1998, nas plantas pistiladas de *Ilex paraguariensis*, localizadas nesta instituição.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS, pelo apoio recebido.

À PUCRS, pela redução de minha carga didática, o que contribuiu para a conclusão deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - pelo período de Bolsa de Doutorado concedido.

Ao meu pai (*in memoriam*) pelo exemplo de dedicação e amor à profissão.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para execução deste trabalho.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE PESQUISA BIOMÉDICA
DEPARTAMENTO DE HISTÓRIA
BIBLIOTECA

Resumo

Estudos realizados no gênero *Ilex*, família Aquifoliaceae, ordem Celastrales, mostram que embriões pertencentes a este gênero permanecem rudimentares, em estágio de coração, quando os frutos estão maduros, sendo que as sementes necessitam de um período de 6 a 8 meses para germinar, com uma taxa de germinação muito baixa. As características apresentadas fazem com que a produção de mudas de erva-mate seja lenta e a quantidade não suficiente para a demanda.

A análise morfoanatômica do embrião e endosperma de *Ilex paraguariensis*, durante a embriogênese tardia, mostram a presença de suspensor, mesmo em fases mais avançadas. Apresenta também modificações nas reservas do endosperma nessas fases.

Tendo por base essa análise, o presente trabalho objetiva apresentar um estudo criterioso do suspensor desta espécie, desde sua formação, até sua degradação durante a embriogênese final, bem como do embrião e endosperma, na embriogênese.

As diferentes fases da embriogênese e endospermogênese foram analisadas e descritas utilizando métodos anatômicos tradicionais, para microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão.

Acompanhando o desenvolvimento ontogenético desta espécie, o trabalho caracteriza o ciclo reprodutivo, as flores pistiladas, o processo de fecundação, os frutos, bem como o embrião e o endosperma. O endosperma é classificado como celular, segundo o sistema EODP. O tipo de divisão celular, que ocorre na embriogênese inicial, permite classificar o desenvolvimento embrionário como pertencente ao tipo Cariofiláceo.

Durante a embriogênese inicial, as fases analisadas vão desde a formação do zigoto, passando por proembrião bicelular até proembrião

pós-octante. Durante a embriogênese final, as fases analisadas vão desde embrião piriforme até embrião em estágio de torpedo (maduro), quando ocorre a germinação.

O aporte de nutrientes ao embrião esporofítico, nas fases iniciais de seu desenvolvimento, ocorre predominantemente via suspensor, pois o embrião xenofítico não está totalmente desenvolvido. Quando o embrião xenofítico apresenta as reservas estruturadas, a utilização destas é observada através das modificações de suas características morfológicas que obedecem a um gradiente, tanto no sentido micrópila-calaza como no sentido tegumento-embrião. Suas variações de síntese, absorção e translocação morfológicamente são: (1) formação de vesículas de membrana simples que se fundem formando vacúolos; (2) deposição de proteína amorfa no seu interior; (3) surgimento de adensamentos protéicos (globóides ou pró-globóides) na massa fundamental; (4) formação de lipídios ao longo de toda a margem do vacúolo protéico; (5) início da cavitação interna do vacúolo, evidenciando sinais de reutilização das reservas; (6) fragmentação do conteúdo protéico; (7) adensamento do material fragmentado com visualização óptica ou eletro-transparente do vacúolo, com início da degradação dos lipídios; (8) vacúolo com pouco material adensado no seu interior e proteína identificada no citoplasma como fragmentos ou adensamentos, sem qualquer sinal de lipídios contornando a estrutura; (9) vacúolo sem qualquer material protéico individualizado no seu interior, sendo constituído apenas por uma matriz solúvel.

Em particular, o suspensor assume três distintos padrões de comportamento: (1) a lise através de Morte Celular Programada da célula basal e das células contíguas a esta, durante a embriogênese inicial, (2) a lise caracterizada por rompimento das paredes das células de comunicação entre a hipófise e embrião, na embriogênese final, e (3) a permanência do suspensor íntegro, em embriões em estágio de torpedo. A manutenção do suspensor para a continuidade do desenvolvimento embrionário, tanto quanto a dinâmica das reservas lipoprotéicas e seu processo de translocação, são de fundamental importância para a conclusão do desenvolvimento embrionário.

Abstract

Previous papers on the *Ilex* genus, Aquifoliaceae family, Celastrales order have shown that the embryos stay rudimentary, in the heart shaped stage, even when the fruits are ripe. The seeds need a period of 6 to 8 months to germinate, with a very low germination rate. Due to these facts, the production of seeds of maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) is slow and scarce.

The morphoanatomical analysis of the embryo and endosperm, during late embryogeny, has shown the presence of the suspensor even in advanced stages. This analysis has also shown changes in the storage and translocation of the endosperm reserves.

Based on these results, the present work aims to detail the embryo and endosperm ontogeny, and the entire suspensor development, from its origin to degradation.

The different stages of embryo and endosperm development were analyzed and described using the traditional anatomical methods for optical, as well as scanning and transmission electron microscopy.

Along the ontogenetic development, the work describes the reproduction cycle of this species, its pistillate flowers, fruits, fertilization process, and embryo and endosperm ontogeny. The endosperm was classified as cellular, according to the EODP system. The type of cellular division during early embryogeny leads to the classification of the embryo development as being of Caryophyllad type.

During early embryogeny, different stages were analyzed, beginning with zygote formation, then bicellular stage all the way to the post-oc-tant proembryos. During late embryogeny, the analysis was performed of stages ranging from the pyriform to the ripe torpedo embryos, when germination occurs.

The increase of nutrients to the sporophytic embryo during early stages of development occurs mainly through the suspensor. This is be-

cause the xenophytic embryo is not completely developed. When the xenophytic embryo contains structured reserves, their mobilization is observed through the characteristic morphological changes. These changes follow a gradient in the micropyle-chalaza direction, as well as in the integument-embryo direction. Different steps of syntheses or translocation of reserves can be classified as: (1) formation of single membrane vesicles binding into vacuoles, (2) deposition of amorphous protein into them, (3) appearance of proteinous spots (globoids or pro-globoids) in the ground mass, (4) formation of lipids around the proteinous vacuole, (5) beginning of the internal cavitation of the vacuole, showing signs of reserve degradation and translocation, (6) fragmentation of the proteinous bodies, (7) adhesion of fragmented material with optically or electrotransparent visualization of the vacuole, and the beginning of lipid degradation, (8) vacuoles with little dense material and protein identified in the cytoplasm as fragmentary or adhesion masses, without any sign of lipids around them, (9) vacuoles without any sign of proteinous material, being solely constituted by a soluble matrix.

The suspensor showed three distinct developmental behavior patterns: (1) the lysis by programmed cell death of the basal cell and its contiguous cells during early embryogeny, (2) the lysis by the breaking of the cell wall between hypophysis and embryo during late embryogeny, and (3) the maintenance of the intact suspensor in embryos until the torpedo stage. The suspensor is not only a characteristic structure during early embryogeny stages, but its maintenance as well as the dynamics of lipid and protein storage, and the translocation process are essential for the conclusion of embryo development.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	ASPECTOS GERAIS SOBRE O GÊNERO E A ESPÉCIE	1
1.2	PESQUISAS REALIZADAS NO GÊNERO	1
1.3	EMBRIOLOGIA.....	2
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1	COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	6
2.2	PREPARAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA.....	7
2.3	PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	9
2.4	PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	9
2.5	TESTES CITOQUÍMICOS	10
2.6	CLARIFICAÇÃO	11
2.7	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS FRUTOS	11
2.8	MONTAGEM DO EXPERIMENTO PARA ANÁLISE MORFOHISTOLÓGICA DAS SEMENTES, DURANTE PARTE DA EMBRIOGÊNESE FINAL.....	11
2.9	TÉCNICAS UTILIZADAS PARA SOLUCIONAR PROBLEMA DA NÃO PENETRAÇÃO DE FIXADORES E RESINAS, TANTO PARA OBSERVAÇÃO EM MICROSCOPIA ÓPTICA COMO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	12
3	RESULTADOS.....	14
3.1	FASES DO CICLO REPRODUTIVO EM <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>	14

3.2	CARACTERIZAÇÃO DA FLOR PISTILADA, EM ANTESE, E FRUTO.....	15
3.3	EVENTOS RELACIONADOS À FECUNDAÇÃO E PÓS-FECUNDAÇÃO.....	17
3.4	ENDOSPERMOGÊNESE.....	19
3.5	EMBRIOGÊNESE INICIAL.....	23
3.5.1	Zigoto.....	23
3.5.2	Proembrião com duas células.....	24
3.5.3	Proembrião linear com três células.....	24
3.5.4	Proembrião linear com cinco células.....	25
3.5.5	Proembrião linear com sete células.....	25
3.5.6	Proembrião quadrante.....	25
3.5.7	Proembrião octante.....	26
3.5.8	Proembrião pós-octante.....	26
3.6	EMBRIOGÊNESE FINAL.....	27
3.6.1	Embrião piriforme.....	27
3.6.2	Embrião globular.....	27
3.6.3	Embrião cotiledonar.....	30
3.6.4	Embrião cordiforme.....	30
3.6.5	Embrião cordiforme tardio.....	31
3.5.6.	Embrião torpedo.....	33
4	DISCUSSÃO.....	35
4.1	CICLO REPRODUTIVO EM <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> ST. HIL.....	35
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA FLOR PISTILADA EM ANTESE E FRUTO.....	35
4.3	ETAPAS DO PROCESSO DA FECUNDAÇÃO.....	39
4.3.1	Germinação do andrófito e passagem do tubo polínico através do tecido transmissor.....	39
4.3.2.	Singamia.....	41
4.4	ENDOSPERMOGÊNESE.....	44
4.4.1	Tipologia das reservas e organelas associadas.....	48
4.4.2	Utilização das reservas.....	54
4.5	EMBRIOGÊNESE.....	58
4.5.1	Embriogênese inicial.....	59
4.5.2	Embriogênese final.....	62
4.5.3	Suspensor.....	66
4.5.4	Morte celular programada.....	71
5	CONCLUSÕES.....	78

6 FIGURAS 80

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 130

Introdução

1.1. APLICABILIDADE DA PSICOLOGIA

A psicologia é uma ciência que estuda o comportamento humano e os processos mentais. Ela é aplicada em diversas áreas, como a educação, a saúde, o trabalho e o esporte. A psicologia ajuda a entender como as pessoas aprendem, se desenvolvem e se relacionam com o mundo ao redor. Ela também é usada para tratar problemas emocionais e comportamentais. A psicologia é uma ciência que busca entender a mente e o comportamento humano. Ela é aplicada em diversas áreas, como a educação, a saúde, o trabalho e o esporte. A psicologia ajuda a entender como as pessoas aprendem, se desenvolvem e se relacionam com o mundo ao redor. Ela também é usada para tratar problemas emocionais e comportamentais.

1.2. PSICOLOGIA QUANTITATIVA NA CINQUÉTIMA

A psicologia quantitativa é uma abordagem que utiliza métodos estatísticos para estudar o comportamento humano. Ela é baseada em dados numéricos e busca estabelecer relações causais entre variáveis. A psicologia quantitativa é usada para testar hipóteses e generalizar resultados para grupos maiores de pessoas. Ela é aplicada em áreas como a psicologia experimental, a psicologia social e a psicologia da educação. A psicologia quantitativa é uma abordagem que utiliza métodos estatísticos para estudar o comportamento humano. Ela é baseada em dados numéricos e busca estabelecer relações causais entre variáveis.

Introdução

1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE O GÊNERO E A ESPÉCIE

Ilex paraguariensis St. Hil. pertence à família Aquifoliaceae, sendo que o gênero está representado por cerca de 660 espécies (Edwin & Reitz, 1967), 70 destas encontradas no Brasil (Löfgren, 1917). Para o Estado do Rio Grande do Sul, foram descritas oito espécies nativas de *Ilex* (Coelho, 1995). A Erva-mate é considerada árvore símbolo do Estado do Rio Grande do Sul, conforme lei nº 7439 (Rio Grande do Sul, 1980). O nome *Ilex paraguariensis* foi atribuído pelo naturalista Auguste Saint-Hilaire em 1822, sendo este o nome correto. Em 1818, Aimé Bonpland descreveu botanicamente a espécie nomeando-a *Ilex theaezans* Bonpl. Ex Miers, tendo este nome se tornado inválido pois já havia outra espécie com a mesma nomenclatura (Giberti, 1990). É uma espécie dióica, com árvores perenifólias, alcançando mais de 15 metros de altura, com flores imperfeitas estaminadas que possuem ovário rudimentar não funcional e flores imperfeitas carpeladas com estaminódios.

1.2 PESQUISAS REALIZADAS NO GÊNERO

O primeiro trabalho mais extenso sobre o gênero, no Brasil e na América do Sul, foi realizado por Reissek (1861). Devido a importância econômica desta planta, esta desperta interesse em várias áreas de pesquisa. Salientando a importância da utilização das folhas desta espécie como bebida, Kramer (1997), se deteve no estudo da distribuição de saponinas. No intuito de auxiliar na solução dos problemas relacionados à adulteração dos subprodutos do beneficiamento da erva-mate, Coelho

(1995) realizou estudos da anatomia e morfologia foliar das espécies rio-grandenses.

A variabilidade genética intra e interpopulacional está sendo estudada por Winge e cols. no Departamento de Genética da UFRGS. Devido às dificuldades de germinabilidade apresentadas por esta planta, o comportamento germinativo de sementes, em laboratório e a campo, está sendo avaliado por pesquisadores da FEPAGRO. Motivados a solucionar o mesmo problema de germinabilidade desta espécie, Ferreira e cols. desenvolvem pesquisas com cultura *in vitro* de embriões de diferentes populações e desenvolvimento de plantas *ex vitro*, no Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRGS. A resposta morfoanatômica para as dificuldades apresentadas por esta espécie, estão sendo tratadas por Mariath e cols. no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFRGS, através de estudos da morfologia quantitativa, embriologia e embriogênese. Pesquisadores da Faculdade de Farmácia da UFRGS se detiveram no estudo de saponinas e xantinas.

Estudos específicos da biologia reprodutiva da erva-mate foram realizados por Mariath (1997), salientando aspectos do andrófito e embriogênese desta espécie, sendo que Ferreira (1997) abordaram a estrutura e o desenvolvimento da semente e embrião. Ainda há uma grande lacuna no que se refere aos aspectos histológicos da embriogênese. Barret (1962) através de estudos detalhados realizados com *Ilex opaca* serviu como referência para análises comparativas da embriologia de outras espécies deste gênero, porém se deteve em estudos da embriogênese inicial. Importantes estudos foram realizados por Hu & Ferreira (1989), caracterizando a embriogênese *in vitro* do gênero. Heuser (1990) analisou endosperma e embrião durante a embriogênese tardia, mostrando, após este estudos, a importância da caracterização de fases iniciais da embriogênese desta espécie.

1.3 EMBRIOLOGIA

No gênero *Ilex*, os embriões entram em estado de dormência e permanecem rudimentares, em estágio de coração, quando os frutos já estão maduros (Hu & Ferreira, 1989).

Esta natureza rudimentar dos embriões prejudica o maior incremento da cultura de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate), cujas folhas são utilizadas, não só por brasileiros mas também por uruguaios, ar-

gentinos e paraguaios, no preparo do chá (bebida), chamado chimarrão. Apesar de estar sendo exportada, por vezes sua produção é insuficiente para o abastecimento do mercado interno. Seu consumo vem crescendo nos últimos anos, sendo o 3º produto agrícola em rentabilidade no Brasil.

As sementes dessas plantas necessitam de um período de 6 a 8 meses para germinar e a taxa de germinabilidade é baixa. Sendo assim, a produção de mudas de erva-mate é lenta e a quantidade não é suficiente para a demanda.

A partir da cultura *in vitro*, já foi possível abreviar o período de germinação, mas não existe um protocolo estabelecido para a transferência destas mudas para campo, que tenha sido totalmente exitosa. A perda das mudas nessa fase é crítica.

As causas deste longo período e baixa taxa de germinabilidade ainda não estão bem esclarecidas. Segundo Hu e Ferreira (1989), o período de quiescência de embriões de *Ilex* parece ser essencialmente uma dormência imposta, e não uma característica hereditária das células embrionárias. Além disto, os autores citam que devem haver fatores presentes, no endosperma e/ou endocarpo que inibam o posterior desenvolvimento *in situ* de embriões em estágio de coração, porém, não comprovam a origem ou composição química desses inibidores.

A embriogênese em *Ilex* divide-se em duas fases: embriogênese inicial, que vai da fase de proembrião bicelular até proembrião em estágio octante e a embriogênese final, que se inicia no estágio de embrião piriforme, se estendendo até o estágio de torpedo (embrião maduro) antes da germinação, (Johri, 1982; Barret, 1962). Dessas duas fases, apenas esta última é constantemente referida na literatura. Entretanto, pouco ou nada é conhecido sobre a embriogênese inicial dessa espécie.

Heuser (1990) observou a presença de suspensor, mesmo em fases mais avançadas da embriogênese final e também modificações nas reservas do endosperma nessas fases, tendo sido sugerido que o suspensor poderia ter função de nutrição também em estágios mais avançados, não restringindo essa atividade metabólica à embriogênese inicial. Yeung & Sussex (1979), sugerem que o suspensor atue na síntese e/ou secreção de substâncias utilizáveis para o desenvolvimento do embrião. Steves & Sussex (1989) citam que a progressiva independência

do embrião em relação ao suspensor sugere que ele se tenha tornado autosuficiente para giberelinas. Há evidências de que o endosperma não estaria bem desenvolvido quando o embrião atinge o estágio globular, sendo consumido apenas em estágios mais tardios da embriogênese, quando cessa a atividade do suspensor. Heuser (*loc.cit.*), caracteriza endosperma e embrião de *Ilex paraguariensis* durante esta fase, sendo que, após a conclusão do trabalho, observou necessidade de serem realizados estudos que caracterizassem a embriogênese inicial desta espécie, ou seja, desde o momento da fecundação até a maturidade dos frutos.

Já foi provado por Dmitrieva *et al.* (1984) que existe transformação das proteínas em tecidos de reserva durante a germinação. As organelas incham, seguindo-se degradação interna das proteínas, fusão dos vacúolos e surgimento de massas de proteínas parcialmente degradadas e/ou corpos protéicos (Ashton, 1976).

Yeung & Clutter (1979), encontraram no suspensor, organelas especializadas como os polissomos e núcleos com cromossomas politênicos, não encontrados no embrião. Estas características sugerem o suspensor como sítio de atividades metabólicas que não ocorrem no embrião (Newcomb & Fowke, 1974), sendo um órgão muito especializado. As células do suspensor sintetizam proteínas e lipídios e provavelmente produzem hormônios e enzimas. Em particular elas incorporam triptofano, um precursor do ácido indol-acético, entre outras substâncias (Buvat, 1989). Devido a estes aspectos citofisiológicos, duas funções foram atribuídas ao suspensor: a de fornecer nutrientes ao embrião e a de secretar hormônios e enzimas (Nagl, 1973).

Em muitas espécies, o suspensor de embriões em estágio de pré-coração começam a degenerar, indicando o término de sua vida funcional (Steeves & Sussex, 1989), sendo que em *Ilex paraguariensis* foram encontrados embriões em estágio de torpedo com suspensor não-degenerado.

O que determina a longevidade destas células ainda é desconhecido. Como se comportam ao longo do desenvolvimento e que transformações ocorreram no seu interior, também permanece obscuro. A relação entre a longevidade do suspensor e a dormência ou quiescência sugerida por outros autores não foi esclarecida, bem como o ciclo de utilização das reservas.

Na tentativa de esclarecer alguns deste itens acima mencionados, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos deste trabalho:

1. Descrever as etapas de desenvolvimento embrionário.
2. Acompanhar e detalhar a formação do suspensor.
3. Descrever a formação do endosperma e acompanhar a utilização de suas reservas.

Material e métodos

2.1. COLTEJA DO MATRIZ - OBTENÇÃO

Para obtenção das coltejas, foram utilizadas as sementes de milho amarelo (Zea mays L.) da variedade Golden Wonder, com 10 dias de germinação em condições de luz e temperatura de 25°C. As coltejas foram obtidas a partir das raízes das plantas, sendo utilizadas as partes situadas entre os nós 17 e 22, com comprimento médio de 1,5 cm. As coltejas foram lavadas com água corrente e desinfetadas com álcool 70% por 30 segundos. Após a lavagem, as coltejas foram colocadas em solução de água destilada com 0,1% de ácido bórico e 0,1% de ácido salicílico, para controle de fungos e bactérias. As coltejas foram colocadas em solução de água destilada com 0,1% de ácido bórico e 0,1% de ácido salicílico, para controle de fungos e bactérias. As coltejas foram colocadas em solução de água destilada com 0,1% de ácido bórico e 0,1% de ácido salicílico, para controle de fungos e bactérias.

A preparação do meio de cultura foi realizada de acordo com o protocolo descrito por ... com material original de ... em 1974. O meio de cultura foi preparado a partir de ... e ... e ... Este protocolo foi utilizado para a obtenção e manutenção de coltejas de milho amarelo em condições de cultura in vitro.

Material e métodos

2.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram utilizados frutos de *Ilex paraguariensis*, coletados de árvores localizadas no Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Estado do Rio Grande do Sul, nos meses de setembro a março de 1993 a 1998 (fig.21 e 22). Neste local, ocorriam dois indivíduos pistilados e um estaminado, plantados em 1977, originários de Palmeira das Missões, RS. As árvores pistiladas estavam identificadas, pela instituição, através dos números 17 e 32. Optou-se pela coleta de material da árvore 32, pois esta se mostrava mais vigorosa. Comparações foram feitas, esporadicamente, entre os dois indivíduos, para verificar se ocorriam diferenças morfoanatômicas na mesma fase de desenvolvimento, o que não foi observado. Estes exemplares foram escolhidos, para atender as necessidades de coleta em curto intervalo de tempo e acompanhamento do desenvolvimento dos embriões.

A complementação do estudo da embriogênese final foi realizada com material oriundo de Venâncio Aires, RS 428, km 18, coletados no mês de março de 1996, sendo as sementes extraídas dos frutos, semeadas e, periodicamente retiradas para análise, conforme descrito no item 2.8. Este procedimento se fez necessário pois frutos maduros ainda apresentavam suspensor e, o plantio permitiria o acompanhamento da degradação desta estrutura.

O material testemunho dos exemplares analisados foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica da UFRGS – Herbário ICN sob os números 96710 (Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS) e 111878/111879 (Venâncio Aires, RS). As coletas e identificação do material botânico, foram realizadas pela autora deste trabalho, bem como a classificação dos frutos, segundo Spjut (1994).

2.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA

Após a coleta dos frutos, retirou-se o pedúnculo, cálice e parte do tecido adjacente a este, para exposição máxima dos rudimentos seminiais ao agente fixador. Em determinada fase, quando ocorre a lignificação do endocarpo, houve necessidade da dissecação dos pirenos para exposição das sementes, sob Microscópio Estereoscópio, marca Wild, modelo M7A. Os pirenos isolados foram seccionados transversalmente, ao seu eixo maior, sendo desprezada a região calazal. A seguir, duas incisões longitudinais descartaram parte do endosperma e o endocarpo. Esta técnica para a dissecação dos pirenos foi a mesma utilizada e ilustrada por Hu (1978).

O material foi fixado em solução de glutaraldeído 2%, em tampão fosfato 0.1M, com pH 6,8 (Gabriel, 1982) ou em solução de glutaraldeído 1% e formaldeído 4%, em tampão fosfato 0.1M (McDowell, 1978), durante 2 horas, à temperatura ambiente; lavado em tampão fosfato pH 6,8, por 1 hora, à temperatura ambiente; desidratado em série de álcool etílico ou de acetona, à temperatura ambiente em concentrações crescentes, 15min cada etapa. Após a última etapa da desidratação, utilizou-se solução de etanol absoluto mais clorofórmio, na proporção de 3:1; 1:1 e 1:3 pois o material, em determinada fase de desenvolvimento, apresentou problemas na infiltração da resina.

Como meio de inclusão foi utilizado hidroxietilmetacrilato (Historesina Jung – Gerrits & Smid, 1983), sem adição de polietilenoglicol 400 e água, sendo polimerizado à temperatura ambiente.

As sementes foram orientadas horizontalmente nos blocos, de maneira que o capuz de células lignificadas da região micropilar permitisse sua orientação voltada para a direita, quando observada sob Microscópio Estereoscópio. Desta maneira, quando realizadas secções longitudi-

nais, haveria a exposição das sinérgides e da oosfera em vista frontal, padronizando a observação das amostras. Este mesmo procedimento permite a observação padronizada das fases iniciais da embriogênese, bem como estágios mais avançados.

O material foi seccionado longitudinalmente, com espessura de 4 a 8 μm , em micrótomo de guias, marca Leitz, modelo 1400, equipado com navalha de aço, tipo D. Os cortes foram distendidos em água destilada à 28°C e aderidos à lâminas histológicas sobre placa aquecedora, marca Olidef, modelo CZ, à temperatura de 50°C.

Para a coloração das secções foram utilizados Azul de Toluidina O (C.I. 52040) em concentração de 0,05% em tampão benzoato, pH 4,4 (O'Brien e McCully, 1981), Giemsa (Lillie, 1965) e Tionina (Gerlach, 1977).

Os tempos de coloração variavam de 5 a 10 minutos, dependendo da fase de desenvolvimento do material. Após a coloração, as lâminas foram lavadas sob fluxo de água corrente durante um minuto e secas sobre placa aquecedora. Os três corantes utilizados facilmente são degradados na presença da luz, no intervalo de 3 a 6 meses, obrigando o registro fotográfico do material analisado em curto intervalo de tempo, muitas vezes necessitando a recoloração do mesmo. Como meio de montagem entre lâmina e lamínula foi utilizado bálsamo do Canadá sintético, marca Merck.

As observações e análises das secções foram realizadas em microscopia de campo claro, utilizando microscópio óptico Leitz, modelo Dialux 20EB acoplado com sistema fotográfico Leica, modelo MD2 para as fotomicrografias e câmara clara para as representações diagramáticas. No registro fotomicrográfico foi utilizado filme negativo a cores Ektar ou Gold, ASA 100 ou preto e branco TMAX, ASA 100 e filme positivo Ektachrome, ASA 64, todos da marca Kodak. As revelações e ampliações foram realizadas em estabelecimento comercial especializado.

Um total de, aproximadamente, 2000 lâminas foram incorporadas ao laminário do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da UFRGS.

2.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As flores pistiladas foram coletadas logo após a antese e processadas segundo a seguinte técnica: fixação em glutaraldeído 2%, por 2h, seguida por três lavagens em tampão fosfato pH 6,8 (O'Brien & McCully, 1981), desidratação em série ascendente de acetona, transferência para dimetoximetano "over-night" e secagem em Ponto Crítico, marca Balzers, modelo CPD 030. O material assim desidratado foi aderido a suportes de alumínio e metalizados em sistema "sputtering", marca Balzers, modelo SCD 050. As observações e eletromicrografias foram realizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura, marca Jeol, série 300, utilizando filme negativo TMAX, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Fundação Zoobotânica do Estado do Rio Grande do Sul - FZB.

2.4 PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para análise em M.E.T., foram realizadas coletas e dissecação do material como descrito para a microscopia óptica, com redução das dimensões das amostras a cerca de 1 mm³.

A fixação foi efetuada em solução de glutaraldeído 2% em tampão fosfato 0.1M, pH 6,8 (Gabriel, 1982) ou solução de glutaraldeído 1% e formaldeído 4% (McDowell, 1978) em tampão fosfato 0.1M, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após, o material foi lavado em tampão fosfato pH 6,8, por 1 hora e pós-fixado por 1h em Tetróxido de Ósmio 1% em solução tampão fosfato 0,1M, pH 6,8, na mesma temperatura. Seguiu-se lavagem em água destilada durante uma hora e contrastação, em bloco, em solução aquosa de Acetato de Uranila 2% (Gabriel, 1982).

O material foi desidratado em álcool etílico ou em acetona, à temperatura ambiente, em concentrações crescentes por 30min em cada etapa. Após, passagem em etanol absoluto mais clorofórmio, na proporção de 3:1; 1:1 e 1:3 pois o material, em determinada fase, apresentou problemas na infiltração. Procedeu-se a infiltração e inclusão em resina epoxi de baixa viscosidade (Spurr, 1969), mistura padrão. A resina foi infiltrada de maneira gradativa, sendo o álcool substituído pela resina na proporção de 1 parte de etanol para 3 de resina, após 1:7, seguindo 1:15 e resina pura, permanecendo no mínimo uma hora em cada etapa.

Para melhor infiltração da resina, foi testada a utilização de aparelho de rotação, no qual os tubos de ensaio contendo material, eram colocados durante o período de infiltração. Na última etapa, o material botânico foi colocado em moldes, orientados e colocados para polimerização em estufa à 70°C, por 8 horas.

Os blocos, assim obtidos, foram seccionados com o auxílio de ultramicrotomo, marca Reichert, modelo Ultracut-E, equipado com navalha de vidro para secções semi-finas (0,9µm) e de diamante para secções ultrafinas (70 nm). No primeiro caso, os cortes foram montados em lâminas histológicas e corados com Azul de Toluidina. No segundo caso, os cortes foram montados sobre "grids" de cobre, com abertura oval de 1x2 mm, recobertos com um filme de Formvar e contrastados com citrato de chumbo (Venable e Coggeshall, 1965)

As observações, análise e registro eletromicrográfico, foram realizadas em equipamento marca Zeiss, modelo EM-10, sob 60kV.

2.5 TESTES CITOQUÍMICOS

Para a realização dos testes citoquímicos foram utilizadas várias técnicas, dependendo a fase de desenvolvimento analisada. Proteínas totais identificadas através da reação com Coomassie Blue Brillhante R-250 (C.I. 42660) 0,1% em solução acética 7% (Southworth, 1973). Polissacarídeos totais identificados através do ácido periódico-reativo de Schiff - PAS (O'Brien e McCully, 1981). Amido identificado através do reativo lugol (Jensen, 1962) e a reação PAS (O'Brien & McCully, 1981), além da demonstração de sua presença através da luz polarizada, utilizando microscópio metalográfico marca Zeiss Jena, modelo Amplival pol.u..

Para análise dos corpúsculos vináceos presentes na região micropilar e cristais presentes tanto no rudimento seminal como no tecido lignificado, utilizou-se o mesmo microscópio acima citado e reação química ao ácido acético e ácido sulfúrico, para testar a presença de oxalato ou carbonato de cálcio (Chamberlain, 1932).

Para a detecção do fenômeno da apoptose, realizou-se teste para detecção de fragmentos do DNA através do kit "KLENOW FragEL", produzido pela Calbiochem.

2.6 CLARIFICAÇÃO

Para análise das fases iniciais da embriogênese, utilizou-se como metodologia a clarificação de rudimentos seminiais através da solução de clarificação padrão 4 ½ (Herr, 1971). Após clarificados, os rudimentos foram observados sob microscopia de contraste de fase, utilizando microscópio óptico marca Zeiss Jena, modelo Nf. As fotomicrografias foram obtidas acoplando-se máquina fotográfica marca Leica, modelo MD2.

2.7 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DOS FRUTOS

De setembro a março de 1993, foram realizadas medidas de comprimento e largura dos frutos, em intervalos de 4 dias. Para isto utilizou-se paquímetro Mitutoyo, sendo tomada como largura a maior medida de diâmetro do fruto e como altura a medida da base do cálice ao ápice do estigma.

Estas variáveis morfométricas não foram correlacionadas com as diversas fases do desenvolvimento embrionário pois, dentro de uma mesma população, ocorreu uma variação muito grande destas medidas, como ilustram as figuras 21 e 22. Cabe ressaltar que após a lignificação do endocarpo, as estruturas internas sofrem mudanças significativas, enquanto que a morfologia externa permanece praticamente estável.

2.8 MONTAGEM DO EXPERIMENTO PARA ANÁLISE MORFOHISTOLÓGICA DAS SEMENTES, DURANTE PARTE DA EMBRIOGÊNESE FINAL

Para realização deste experimento, foram utilizados frutos brancos, róseos e vináceos, coletados em Venâncio Aires (ver item 2.1.). Estes frutos foram macerados sob água corrente, para retirada da polpa e separação dos pirenos. Foram tomados lotes de 3g de pirenos, o que corresponde a, aproximadamente, 300 unidades. Estes foram colocados em sacos de tela plástica de 10x10cm, misturados com solo comercial enriquecido - humoso conforme experimentos realizados com a mesma espécie por Heuser (1990). Foram colocados 9 sacos contendo frutos pretos, 6 contendo frutos rosas e 6 contendo frutos brancos.

Estes sacos foram dispostos em uma sementeira de 55cm de comprimento x 36cm de largura por 15cm de altura, recobertos pelo mesmo solo utilizado anteriormente. A sementeira foi colocada ao ar livre, em local sombreado e mantida úmida (fig. 4).

A retirada das amostras priorizou os pirenos oriundos de frutos vináceos, em intervalos de, aproximadamente, quinze dias, ao longo de nove meses, sendo retirados 20 pirenos. Estes foram dissecados conforme descrito no item 2.2., fixados e processados para análise em microscopia óptica. Após a retirada da amostra, o saco foi novamente colocado na sementeira. A análise das sementes pertencentes a frutos de coloração rosa e branca foi esporádica, tendo sido constatado que apenas as sementes de frutos vináceos completaram seu desenvolvimento e germinaram.

2.9 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA SOLUCIONAR PROBLEMA DA NÃO PENETRAÇÃO DE FIXADORES E RESINAS, TANTO PARA OBSERVAÇÃO EM MICROSCOPIA ÓPTICA COMO MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A partir de uma determinada fase do desenvolvimento embrionário, partes da semente se tornam impermeáveis a agentes fixadores e resinas, devido a formação de proteínas que não se deixam penetrar pelos mesmos (Ashton, 1976; Otegui *et al.*, 1998). Na tentativa de transpor estas dificuldades, várias metodologias foram utilizadas na desidratação, na inclusão, no tempo e temperatura da fixação e desidratação e, no modo de polimerizar. Apesar das tentativas, não foi possível estabelecer um protocolo que solucionasse as dificuldades encontradas nesta fase. Tanto material preparado para análise em MO como em M.E.T ficaram prejudicados devido a este(s) fator(es).

Abaixo relacionamos as diversas técnicas utilizadas:

- Agentes desidratantes: série etílica, acetona, éter, Ter-butanol e clorofórmio.
- Resinas: Unicryl, Spurr, Araldite e Epon.
- Extração de proteínas – ácido trifluoroacético e técnica utilizada para extração de proteínas totais, por Moon (1997) – Depto. de Genética, USP (comunicação pessoal).
- Inclusão utilizando válvula “Spindle”, com pressão positiva ou negativa.
- Desidratação e infiltração em dessecador e em aparelho de rotação.
- Infiltração em aparelho de ultrassom.

- Desidratação e polimerização em Criostato, a temperatura de - 40°C.
- Polimerização da resina a altas temperaturas, 50°C, 60°C, 70°C.
- Polimerização da resina a baixas temperaturas, 4°C, sob luz ultra violeta.

Resultados

3.1. FASE DO CICLO REPRODUTIVO

As flores pistadas de *Passiflora ligularis* foram coletadas no final do mês de setembro, quando as flores estavam abertas, quando estas já estavam começando a fechar, quando estas estavam começando a abrir e quando estas estavam começando a fechar simultaneamente. As flores foram coletadas durante o dia e as flores já abertas foram coletadas durante a noite. As flores das frutas, sendo que as flores estavam abertas durante o dia também estão presentes no material coletado durante a noite.

Comparando-se a morfologia das flores pistadas com as das flores das frutas, verificamos que as flores pistadas, inicialmente, são mais abertas e as flores das frutas são mais fechadas.

Os primeiros resultados obtidos no período de setembro (Fig. 1a) com a caracterização do material de referência (Fig. 1b) foram obtidos na segunda quinzena de setembro. Os resultados obtidos (Fig. 2a) em diversos pontos de coleta durante o período de setembro foram obtidos com o uso de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) com uma tensão de 15 kV e uma corrente de 100 µA. Os resultados obtidos com o uso de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) com uma tensão de 15 kV e uma corrente de 100 µA foram obtidos com o uso de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) com uma tensão de 15 kV e uma corrente de 100 µA.

Resultados

3.1 FASES DO CICLO REPRODUTIVO EM *ILEX PARAGUARIENSIS*

As flores pistiladas de *Ilex paraguariensis*, analisadas, iniciam antese em final do mês de setembro estendendo-se até a primeira quinzena de outubro, quando estas já se encontram fecundadas, apresentando verticilos protetores senescentes (fig. 1). A antese, em um mesmo indivíduo, não é simultânea. Em um mesmo ramo encontramos desde botões jovens até flores já abertas. Este comportamento se repete na maturidade dos frutos, sendo possível encontrar frutos brancos em ramos onde também estão presentes frutos de coloração vinácea (fig. 2).

Comparando-se o início de antese entre árvores portadoras de flores pistiladas com as portadoras de flores estaminadas, observou-se que as estaminadas, iniciavam antese alguns dias após as pistiladas.

Os primeiros resultados obtidos, no período da antese (fig.3.1), foram a caracterização do momento da fecundação (fig. 3.2). Após este evento, na segunda quinzena do mês de outubro, observou-se o zigoto (fig. 3.3a) em diversas fases de desenvolvimento, sendo que este apresenta uma dormência relativa, no sentido de não sofrer divisão celular, porém demonstra modificações internas, rearranjo metabólico e alongamento desta célula. Neste período, as fases iniciais da endospermogênese se sucedem (fig. 3.3b), até a formação de endosperma com cerca de oito células. Quando este tecido de reserva apresenta estas características, inicia-se a divisão do zigoto, dando origem ao proembrião bicelular

(fig. 3.4), constituído por uma célula basal e uma apical. Durante a primeira quinzena do mês de novembro, observa-se o proembrião com duas a três células (fig. 3.5). Já na segunda quinzena deste mês, ocorre um período de desenvolvimento contínuo, sendo observadas fases de proembrião linear com quatro (fig. 3.6) a sete (fig. 3.7) células, derivadas da célula apical. Em uma mesma coleta foi possível observar as fases acima citadas, proembrião linear de três a sete células. Após a fase de proembrião linear com sete células, inicia-se a divisão longitudinal/oblíqua da célula apical derivada, para dar origem ao proembrião quadrante (fig. 3.8). Este evento ocorre na primeira quinzena do mês de dezembro. Neste mesmo período, o desenvolvimento prossegue, observando-se proembriões octantes (fig. 3.9), embriões piriformes (fig. 3.10) e globulares (fig. 3.11). As fases seguintes, ou seja, embrião cotiledonar (fig. 3.12), cordiforme (fig. 3.13), cordiforme tardio (fig. 3.14) são observadas entre a segunda quinzena do mês de dezembro e o início do mês de janeiro, em intervalos de, aproximadamente, uma semana. Os embriões permanecem nestes dois últimos estágios, cordiforme e cordiforme tardio (fig. 3.15), até o fruto completar a maturação, ou seja, adquirir a coloração vinácea. Este processo de modificação na coloração dos frutos, inicia-se na segunda quinzena do mês de janeiro. Estas modificações na coloração são acompanhadas de alteração na consistência do mesocarpo. Os estágios de desenvolvimento, passíveis de serem observados, durante um período de oito meses, de março a novembro, foram de cordiforme a cordiforme tardio, em frutos semeados. No mês de novembro, os embriões reassumem a atividade metabólica, iniciando o processo germinativo (fig. 3.16). Foi possível, neste último período, observar uma grande quantidade de embriões germinando e plântulas (figs.5-6), bem como alguns embriões que permaneciam em estágio de cordiforme e cordiforme tardio.

Deste ciclo, serão caracterizados, citológica- e histologicamente, diferentes fases deste processo de desenvolvimento, com ênfase em aspectos da antese, fecundação, embriogênese e endospermogênese.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA FLOR PISTILADA, EM ANTESE, E FRUTO

As flores pistiladas desta espécie são actinomorfas, com cálice gamosépalo de quatro peças de coloração verde e corola rotada, gamopétala, em geral com quatro pétalas de coloração branca (fig. 1), com epiderme

de células papilosas apresentando estrias epicuticulares na sua face adaxial (fig. 8). A flor pistilada possui quatro estaminódios alternipétalos (fig. 9), que diferem morfológicamente dos estames férteis das flores estaminadas por apresentarem ápice cônico e esporângios não-diferenciados, porém de dimensões semelhantes às anteras das flores estaminadas. O ovário é súpero (fig. 10), sincárpico, tetracarpelar, tetralocular, traspérmico. Não raro foi observada a presença de ovários pentacarpelares e pentaloculares (fig. 7), bem como pirenos bisseminados, com um único embrião por semente.

O estigma é sessil e tetralobado, classificado como do tipo úmido, devido a presença de células secretoras papilosas (figs. 10, 11 e 13), cuja secreção é acumulada nas regiões laterais do tecido estigmático, adjacente ao ovário. Durante a fase receptiva desta estrutura, foram observados grãos de pólen germinados, tanto em M.E.V. como em M.O., como demonstrado nas figuras 12 e 23.

Na porção superior dos lóculos observa-se a presença de um côm-pito, região desprovida de células, resultante da fusão dos quatro carpelos, de ocorrência comum em ovários gamocarpelares (fig. 10 e 11).

A cavidade locular, que abriga o rudimento seminal, é delimitada pela parede interna do carpelo (figs. 10), constituída por uma camada de células de contorno isodiamétrico, em secção longitudinal, ordenadamente dispostas e de menores dimensões do que as células do tecido ovariano (fig. 16).

O rudimento seminal é do tipo anátropo, unitégmico, com obturador funicular, composto por células papilosas, próximo da região micropilar, em continuidade com o tecido transmissor da região estigmática (fig. 17 e 18). Ao longo da região dorsal do rudimento seminal ocorre um feixe vascular único, ramificado em sua porção calazal (fig. 17). A face interna do tegumento, limitante do endosperma e tecido nucelar, está constituída por células diferenciadas das demais células tegumentares, originando um endotélio (figs. 19 e 20).

O fruto é do tipo drupa, normalmente com 4 pirenos, sendo que sua largura na maturidade é de aproximadamente 0,7 cm e comprimento 0,6 cm. A dimensão dos frutos maduros varia entre as árvores de uma mesma população. Isto foi observado nos frutos das árvores de Venâncio Aires bem como nas do Jardim Botânico da Fundação Zoo-

botânica do Rio Grande do Sul. Neste local a diferença morfológica entre os frutos das duas árvores pesquisadas é representativa, como mostram as figuras 21 e 22. Os frutos da árvore identificada localmente pelo número 32 são arredondados enquanto que os da árvore 17, alongados. Histologicamente não foram observadas diferenças significativas entre os dois diferentes tipos morfológicos, durante o período pesquisado. Os frutos, durante seu desenvolvimento, alteram a coloração, desde verde quando imaturos, passando a branco e por várias tonalidades de rosa, até adquirirem a coloração vinácea quando maduros.

O pireno, unidade de dispersão desta planta, se origina do rudimento seminal unitégmico, envolvido por estruturas carpelares. Analisando a ontogenia da semente, nas fases iniciais da embriogênese, observou-se que a partir da primeira semana do mês de novembro, quando o proembrião apresenta duas a três células, inicia-se a lignificação das células que compõe a parede interna do ovário (endocarpo). Na maturidade do fruto, estas células apresentam-se totalmente lignificadas, formando uma camada rígida, externamente ornamentada, formando três pares de estrias no eixo maior do pireno (fig. 5). Na região micropilar, observa-se um orifício, formado pelo canal micropilar e células adjacentes. Este torna o pireno permeável a trocas gasosas com o meio e à hidratação.

3.3 EVENTOS RELACIONADOS À FECUNDAÇÃO E PÓS-FECUNDAÇÃO

Para que ocorra a fecundação há necessidade de ter havido a polinização das flores pistiladas. Os grãos de pólen, quando em contato com o estigma destas flores, sofrem hidratação, tendo sido observada a emergência do tubo polínico através do colporo, este penetrando apoplásticamente o tecido estigmático. Na fase de fixação no estigma, o andrófito encontra-se em estágio bicelular, com um núcleo vegetativo envolvendo parcialmente a célula generativa, formando a unidade generativa masculina. O crescimento do tubo polínico se dá através do tecido transmissor até atingir o lóculo do ovário (figs. 24 e 25). Este tecido se estende desde a região estigmática até a base micropilar dos rudimentos seminiais (fig. 10 e 11) que, juntamente com o obturador funicular, forma um tecido secretor especializado contínuo (figs. 13 e 15). Este tecido é composto por células papilosas (fig. 13, 15 e 16), com paredes espessadas quando observadas em secção transversal (fig. 14). Estas pa-

redes reagem ao Azul de Toluidina, tornando-se esverdeadas, indicando a presença de compostos fenólicos (fig. 14). O produto secretado por estas células é de polissacarídeos, comprovado pela coloração rósea sob ação do mesmo corante (figs. 14 e 15).

No tecido transmissor, foi possível observar tubos polínicos bicelulares, apresentando a célula vegetativa e a generativa, bem como tubos polínicos tricelulares, apresentando a célula vegetativa e as duas células gaméticas, idênticas morfológicamente (figs. 24 e 25). A divisão da célula generativa, com conseqüente formação dos dois gametas, ocorre durante a trajetória apoplástica, do tubo polínico através do tecido transmissor. A penetração de um ou mais tubos polínicos, no rudimento seminal, ocorre através do canal micropilar. Este é retilíneo, composto por células que não apresentam características diferenciadas como as células do endotélio, sendo que na extremidade interna deste canal, se localiza o ginófito, mais especificamente o aparelho fibrilar, com suas paredes especializadas (fig. 18).

Em todo este processo, foi possível observar a presença de cristais, do tipo drusa, de oxalato de cálcio, presentes ao longo do tecido vascular, do estigma e tecido transmissor (figs. 26, 28), no parênquima fundamental, entre o feixe vascular e o tecido transmissor (figs. 26, 29), na parede do ovário (fig. 27), bem como nos rudimentos seminais (figs. 27, 28). Além dos cristais, também foram observados corpos protéicos em células da parede do ovário (figs. 30, 31).

Durante o momento da descarga do tubo polínico no aparelho oosférico, ocorre a fusão dos núcleos polares com formação do núcleo secundário (sincário-pró-endospérmico), apresentando um nucléolo de dimensões bem maiores do que o da oosfera. Este núcleo migra para uma localização mais próxima da oosfera aguardando o momento da fecundação por um dos gametas.

As sinérgides apresentam, no polo micropilar, parede primária especializada, com acréscimo de substâncias pécticas, formando o aparelho fibrilar (fig. 35). Estas células possuem um grande vacúolo no polo calazal e núcleo deslocado para o polo micropilar. Diversas amostras analisadas demonstraram que as sinérgides se mantêm citologicamente intactas (fig. 35), após a descarga do tubo polínico, não ocorrendo a penetração das mesmas. A figura 34 demonstra a descarga do tubo polínico sob forma de massas coradas de azul intenso de localização lateral

às sinérgides, dificultando sobremaneira a observação e análise dos gametas e do núcleo da célula vegetativa.

Em vista frontal, a oosfera encontra-se entre as sinérgides, em posição mais calazal, apresentando um grande vacúolo no polo micropilar (fig. 32, 33).

As células que compõe o aparelho oosférico e a célula média possuem grãos de amido como substância de reserva (fig. 35), produzidas após um ciclo de amilogênese que se inicia antes da fecundação e se conclui na fase de proembrião bicelular com endosperma possuindo cerca de oito células.

As antípodas apresentam vida curta, sem qualquer diferenciação particular digna de nota, iniciando processo de degeneração ao mesmo tempo que o endosperma progride em seu desenvolvimento (fig. 40).

Com a ocorrência da dupla fecundação, importantes modificações ocorrem, não apenas no interior do ginófito, com também no tecido tegumentar. As células do tegumento, próximas à região micropilar do rudimento seminal, continuam seu processo de diferenciação. Seu conteúdo celular passa a ser altamente sensível ao Azul de Toluidina, apresentando coloração azul intenso (fig. 36). Em fases posteriores, a lignificação das paredes se completa, resultando uma acentuada redução do lume celular e paredes espessas com pontoações simples, de coloração azul-esverdeado em reação ao mesmo corante (fig. 37). Este conjunto de células forma uma espécie de capuz cobrindo a região micropilar. Nesta fase ocorre, também, o acúmulo de oxalato de cálcio, sob forma de drusas, no interior de algumas células deste capuz micropilar, bem como em células contíguas a esta região (fig. 38).

No interior do saco embrionário, os gametas deslocam-se para próximo da oosfera e da célula média ocorrendo a plasmogamia e cariogamia. Concluído este evento, surgem dois zigotos, um deles que seguirá o processo da embriogênese, formando o embrião esporofítico e o outro que seguirá o processo da endospermogênese, formando o embrião xenofítico.

3.4 ENDOSPERMOGÊNESE

Após a fecundação do núcleo secundário da célula média do saco embrionário – sincário-pró-endospermico – por um dos gametas masculi-

nos, origina-se o núcleo endospermogênético – zigoscárico-pró-endospermico (fig. 39), cujas dimensões são, aproximadamente, o dobro do volume do núcleo do zigoto. Este por divisão transversal, dá origem as duas primeiras células do endosperma. Nesta fase a formação das paredes é facilmente identificada pois há presença de fragmoplasto conspícuo, como mostra a figura 40, ficando também evidente a placa equatorial. Observou-se a reorganização dos cromossomos para dar origem as duas novas células do endosperma. Após esta divisão, fica estabelecida uma região bicompartimentada (fig. 41). A parte superior, micropilar, apresenta-se com maior volume celular do que a parte inferior, calazal (fig. 41). Até esta fase, as antípodas ainda podem ser identificadas (fig. 40). A segunda divisão é transversal na célula do compartimento da região micropilar e longitudinal na célula do compartimento calazal (fig. 42). Observa-se, nesta fase, novo ciclo amilogênico no endosperma juvenil, caracterizado pela presença de amiloplastos no citoplasma destas células (fig. 42). Este tipo de padrão de divisão celular nos permite classificar o endosperma de *Ilex paraguariensis* como sendo do megátipo Celular, tipo isopolar, subtipo translongitudinal.

O endosperma constituído por quatro células estabelece três novos compartimentos celulares, o primeiro com a célula do endosperma em contato com o zigoto (fig. 42, célula **a**), o segundo constituído pela célula intermediária do endosperma (fig. 42, célula **b**), e o terceiro formado pelas duas células que mantêm contato com as antípodas e coluna hipostática (fig. 42, células **c** e **d**). A coluna hipostática está constituída por células do nucelo, com citoplasma denso, núcleo proeminente e paredes espessas (fig. 19). Com a expansão das células do endosperma, estas células vão sendo comprimidas e degradadas, nutrindo o tecido endospermico em formação. Como característica citológica deste processo de degeneração, observou-se a picnose dos núcleos, o adensamento citoplasmático e a compressão de suas células.

A fase seguinte observada foi de endosperma com oito células que segue dividindo-se anticlinal e periclinalmente, formando um conjunto de células de paredes delgadas, com grande vacúolo e núcleo ocupando posição lateral (figs. 43 e 44). O número de divisões celulares é maior nas regiões micropilar e calazal do que na porção central ou mediana do endosperma, resultando assim, um endosperma com três zonas distintas de tipos celulares, com padrões particulares de diferenciação.

As células que circundam o proembrião, na região micropilar (fig. 45), são alongadas no sentido radial, apresentam conteúdo citoplasmático denso, amido como substância de reserva, vacúolos pequenos no polo micropilar e maiores na região de contato com as células da região mediana. As paredes primárias apresentam-se espessadas com grande quantidade de substâncias pécnicas na lamela média, indicando ser esta uma zona de altos níveis de translocação de substâncias. As células da região mediana (fig. 44), apresentam paredes delgadas, grande vacúolo, citoplasma pouco denso e núcleo proeminente, ambos em posição parietal. São células mais longas e maiores do que aquelas das duas outras regiões citadas, representando a maior parte do tecido endospermico no eixo micropila-calaza. As células da região calazal (fig. 46), apresentam aspecto fusiforme, paralelo ao eixo longitudinal do rudimento seminal. Estas penetram no tecido calazal do rudimento seminal, apresentam as paredes primárias também espessadas com maior quantidade de substâncias pécnicas, conteúdo citoplasmático denso, pequenos vacúolos no polo calazal, sendo estes de maiores dimensões na região em contato com as células da região mediana do endosperma. Estas características lhes conferem, também, uma provável função de translocação de nutrientes.

Não podemos deixar de acrescentar que os dois polos do endosperma têm características similares, atuando sobre o tegumento ou a calaza na medida que este tecido se expande, com acréscimo de células na região central ou mediana do endosperma. Estas diferenças citológicas das células da região micropilar e da região calazal são mantidas até o proembrião atingir a fase de octante, sendo que as substâncias de reserva do tipo amido, somente são observadas até o proembrião atingir a fase bicelular. Em fases mais avançadas da embriogênese, de embrião pós-octante e seguintes, estas diferenças não são mais observadas, de modo tão acentuado, entre as células da região calazal e mediana do endosperma (figs. 47, 48), iniciando então divisões e modificações no conteúdo das células de todo o tecido xenofítico, constatadas através da síntese e acúmulo de substâncias lipoprotéicas. Estas divisões das células do endosperma teriam como finalidade expandir lateralmente o volume do endosperma, aproximando-se do seu volume definitivo. O primeiro sinal aparente destas modificações é a compartimentação interna das células do endosperma (fig. 49), formando um complexo vacuoma, cujas dimensões vacuolares são mais reduzidas e/ou ocorre de-

sidratação do vacúolo com conseqüente coagulação de proteínas. Uma fase seguinte do processo de acúmulo de reservas pode ser verificada na figura 50, onde as células do endosperma além de apresentar os vacúolos com uma leve granulação interna, resultado da concentração de proteínas, surgem no citoplasma o início da formação de corpos lipídicos dispersos pelo mesmo e também é observada a presença de proplastídios e retículo endoplasmático rugoso, que demonstra alta atividade de síntese de substâncias de reserva nestas células. Nesta fase de diferenciação do endosperma, o embrião encontra-se na etapa globular de seu desenvolvimento. Segue-se o aumento da quantidade e dimensões destes corpos, bem como um adensamento maior do conteúdo protéico dos vacúolos (fig. 51). Os corpos lipídicos concentram-se em torno dos vacúolos protéicos, além de dispersarem-se pelo citoplasma das células do endosperma. Poucas organelas protoplasmáticas são visíveis devido ao adensamento de substâncias de reserva presentes nestas células.

As paredes das células do endosperma se modificam, tornando-se mais entumecidas, provavelmente devido à hidratação das camadas que as compõe, ricas em pectinas, através da água liberada pelos vacúolos internos armazenadores de proteínas. De modo correspondente, o embrião encontra-se na fase cordiforme de desenvolvimento. Ainda nesta fase de desenvolvimento, o endosperma mais próximo ao embrião apresenta o conteúdo protéico mais adensado, com proteína condensada sob forma amorfa (fig. 52) ou granulosa (fig. 53), no interior do vacúolo. A quantidade de corpos lipídicos é tal que o vacúolo protéico apresenta um contorno ondulado, devido ao contato com os mesmos (fig. 53). Na fase de embrião cordiforme tardio, o endosperma apresenta coalescência de corpos lipídicos, reduzindo o número destes, presentes no seu citoplasma, redução esta compensada pelo aumento de suas dimensões (figs. 54, 55). Dependendo a localização desta célula, em relação ao embrião, é perceptível um "halo" nos corpos lipídicos, provavelmente indicando ação enzimática marginal sobre estas estruturas. Observam-se poucos dictiossomas, retículo endoplasmático rugoso e ribossomos (fig. 54). Também nos vacúolos protéicos é visível a cavitação interna, resultado da ação de digestão das proteínas e um maior número de adensamentos protéicos (globóides) – (fig. 55). Da mesma forma, a estrutura interna do citoplasma é muito pouco perceptível, devido ao excesso de substâncias de reserva no seu interior. Em células, localizadas nas pro-

ximidades da cavidade digestora, percebe-se a redução do número de corpos lipídicos e a expansão dos vacúolos protéicos, cujo conteúdo de contorno mais irregular, torna-se mais granuloso. No citoplasma são visíveis proplastídios e um estroma com material granuloso sem estrutura de membrana. As paredes celulares apresentam sinais de ação pectolítica, tornando-se mais frouxas, inclusive com sinuosidades que se invaginam nas células do endosperma (fig. 57).

Numa última etapa, antes da lise total da célula, poucas estruturas podem ser identificadas no estroma celular. Alguns corpos lipídicos estão presentes na periferia da célula e cristais, provavelmente protéicos, são evidenciados no interior dos vacúolos. As paredes celulares apresentam-se mais frouxas com sinais de lise de estrutura fibrilar (fig. 56). Este processo de diferenciação bem como a dinâmica de utilização das reservas deste tecido, serão caracterizadas, detalhadamente, nas diversas fases da embriogênese, descritas nas seções que seguem.

3.5 EMBRIOGÊNESE INICIAL

3.5.1 Zigoto

O aparelho oosférico após a fecundação apresenta o zigoto, célula diplóide resultante da fecundação da oosfera por um dos gametas masculinos. Ficou evidenciada nesta fase, a presença, no zigoto, de núcleo com dois nucléolos, de tamanhos diferentes, um pertencendo a oosfera outro ao gameta masculino (fig. 58), indicando que, apesar de ter ocorrido cariogamia, os nucléolos preservam sua individualidade. O zigoto permanece sem se dividir, em estado de relativa quiescência, evidenciando um estágio de reorganização metabólica, durante as fases iniciais da endospermogênese. Este se localiza no limite interno do canal micropilar, limitado lateralmente pelas sinérgides degeneradas e restos da descarga do tubo polínico, identificáveis pela coloração distinta que assumem em resposta aos corantes utilizados (figs. 59).

Somente quando o endosperma torna-se multicelular, com oito ou mais células, o zigoto apresenta a forma alongada, com núcleo proeminentemente deslocado para o polo calazal devido a vacuolação mais acentuada em sua posição micropilar. Nesta fase se estabelece a polaridade do zigoto. O citoplasma contém grânulos de amido contornando o núcleo, como observado nas figuras 59 e 60. No momento da divisão mitótica

desta célula apenas foi visualizado o vacúolo micropilar que acarreta a concentração do protoplasto no polo calazal (fig. 61-em evidência a placa equatorial).

A dissincronia entre o desenvolvimento do endosperma (xenófito) e embrião (esporófito) é evidente, porém demonstra claramente "timing" distintos de diferenciação destas duas gerações.

3.5.2 Proembrião com duas células

A primeira divisão mitótica do zigoto é transversal e assimétrica, formando um proembrião com duas células, constituído por uma célula basal-*cb*, mais próxima da região micropilar e uma célula apical-*ca*, mais alongada, voltada para a região calazal, com aproximadamente 1/3 do comprimento da anterior. A *cb* apresenta núcleo proeminente, polo micropilar vacuolado e paredes espessadas. A *ca* apresenta núcleo em posição calazal, citoplasma denso, polo micropilar vacuolado e paredes menos espessadas. Nesta fase não se observam mais restos das sinérgides, sendo o proembrião circundado pelas células do endosperma da região micropilar (fig. 62).

3.5.3 Proembrião linear com três células

Na seqüência ontogênica é a *ca* que, ao se dividir, originará as células *l* e *l'*. Analisando as células que compõe o proembrião nesta fase, observa-se que a *cb*, possui maior comprimento quando comparada com as células *l* e *l'*. Uma característica que definiu a classificação do padrão de divisão de proembrião bicelular, para dar origem ao de três células, foi a análise comparativa das paredes que limitam a célula *cb* à *l* e *l'*. Esta análise nos mostrou que a parede limitante das células *cb* e *l* apresenta-se mais espessa quando comparada a parede que limita a célula *l* à *l'*. Isto evidencia a divisão da *ca* dando origem às células *l* e *l'*, sendo que a *cb* permanece indivisa, tornando-se parte do suspensor (fig. 63).

O citoplasma das células *cb* e *l* apresentam reservas protéicas sob forma de massas não-definidas, com coloração vinácea. O mesmo tipo de reserva é observado em células do tegumento, na região micropilar. Estas três células apresentam, ainda, polissacarídeos como substâncias de reserva.

O embrião neste estágio se desenvolve em contato com dois tipos celulares do endosperma, quais sejam, as células da região micropilar e as células da região mediana do mesmo.

3.5.4 Proembrião linear com cinco células

O proembrião linear com cinco células é originado a partir de divisões da célula derivada l' , fato este evidenciado pela tendência acrópeta no estabelecimento da divisão celular, resultado de uma relação núcleo/citoplasma mais propícia para este evento. A cb apresenta paredes transfusoras na região em contato com a micrópila, caracterizando a necessidade de aumento de superfície de absorção e/ou translocação de nutrientes e água. No citoplasma desta célula observam-se massas protéicas, o mesmo sendo encontrado nas células do tegumento, na região micropilar. O núcleo das células que compõe este proembrião, em geral se posiciona mais próximo ao polo calazal da célula, com diferenciação de vacúolo(s) no polo micropilar. As células recém formadas do suspensor e a célula de posição mais calazal estão inseridas na região mediana do endosperma (fig. 64).

3.5.5 Proembrião linear com sete células

O proembrião linear com sete células apresenta as mesmas características citológicas descritas na fase anterior (fig. 65). Ocasionalmente, foi observada uma divisão longitudinal da célula subterminal do proembrião linear de sete células (fig. 66). Este número total de células também foi comprovado através do método de clarificação, não sendo utilizado para a análise das fases seguintes por não acrescentar maior volume de informações e clareza na observação. O endosperma apresenta as mesmas características da fase anterior.

3.5.6 Proembrião quadrante

Em geral, após o proembrião linear atingir o número de sete células, iniciam-se as divisões da célula que se encontra em posição calazal, formando o embrião propriamente dito. Esta célula se divide longitudinal- e transversalmente, resultando inicialmente o proembrião de quatro células, sendo uma delas a célula de ligação entre o suspensor e o futuro embrião, constituindo a célula da hipófise (fig. 67).

As células que o compõem apresentam citoplasma denso, núcleo proeminente situado em posição central, característico de células meristemáticas (fig. 68 e 69). As células localizadas acima do embrião quadrante, constituem o suspensor linear unisseriado com número aproximadamente constante, de sete células, podendo ocorrer casos com cinco a oito células. Ainda não são observadas modificações nas células do endosperma nesta fase do desenvolvimento embrionário.

3.5.7 Proembrião octante

O proembrião octante é formado a partir de divisões longitudinais das células do proembrião quadrante, com características citológicas semelhantes às da fase anterior e organização ainda linear das mesmas (fig. 70). O suspensor permanece com o mesmo número de células. O endosperma se apresenta com as mesmas características descritas anteriormente.

3.5.8 Proembrião pós-octante

Seguindo sua ontogênese, o proembrião pós-octante não mais possui a forma linear, tornando-se arredondado, devido a divisões anticlinais na camada superficial de suas células, que originarão a protoderme, enquanto que internamente iniciam-se divisões anticlinais e periclinais que darão origem ao meristema fundamental (fig. 71). O suspensor apresenta a *cb* com, aproximadamente, o dobro do tamanho das demais células que compõem esta estrutura e grande vacúolo de posição micropilar.

Estas etapas da embriogênese inicial e o tipo de divisão celular descrito até esta fase, permite classificar o desenvolvimento embrionário como pertencente ao tipo Cariofiláceo (ver sumário destas etapas nas figuras 125a-i).

No endosperma, ainda são perceptíveis células diferenciadas na região micropilar e o restante do endosperma de aspecto uniforme em contínuo processo de divisão celular. O aporte de nutrientes ao embrião, nesta fase, parece proveniente do suspensor e tecido adjacente, evidenciado através de grande quantidade de corpúsculos vináceos ocorrentes no tegumento, endosperma da região micropilar e suspensor (fig. 72). Cabe ressaltar que o restante das células do endosperma apa-

renta um estágio de desenvolvimento mais retardado para a função de reserva a ser desempenhada pelo mesmo.

3.6 EMBRIOGÊNESE FINAL

3.6.1 Embrião piriforme

Esta denominação foi utilizada para descrever embriões que visivelmente se caracterizam por apresentar protoderme e meristema fundamental, com predomínio de expansão lateral, resultante do maior número de divisões celulares de células desta região (fig. 73). A hipófise, célula limite entre o embrião e o suspensor linear, é evidente. As células do embrião apresentam citoplasma denso, núcleo proeminente localizado na posição central da célula, não sendo identificadas substâncias de reserva. É perceptível o início de digestão celular na porção mais castral do embrião em contato com o endosperma. As células do endosperma e tegumento, na região micropilar, mostram características comuns à fase anterior, com a presença dos mesmos corpúsculos vináceos e material dissolvido, não-polimerizado, de reação química similar ao corante utilizado, tanto em vacúolos como entre as células.

As células da região mediana do endosperma continuam a se dividir, dando origem a células-filhas que apresentam a metade do tamanho da célula que lhes deu origem, com vacúolos de pequena dimensão e citoplasma denso. Nestes vacúolos serão acumulados, em fases posteriores, os produtos da síntese de substâncias lipoprotéicas que caracterizam a reserva deste tecido, a partir desta fase (fig. 49).

3.6.2 Embrião globular

Divisões anticlinais e periclinais se sucedem, dando origem ao embrião globular, com suspensor linear, com células altamente vacuoladas (figs. 74, 75, 78). As células que compõe o embrião, nesta fase, se caracterizam por apresentar citoplasma denso, núcleo proeminente e início de acúmulo de substâncias lipídicas. A protoderme e o meristema fundamental são claramente evidentes (figs. 78, 81, 81a, 81b), com frequência de divisões celulares, perceptível através da presença de placa equatorial. Nesta situação evidencia-se grande quantidade de dictiossomos, fluxo de vesículas oriundas dos mesmos, orientadas por microtúbulos para a formação da placa e núcleo com cromatina ainda adensada (fig.

81a). Nesta figura fica evidente a presença de retículo endoplasmático rugoso e alta quantidade de ribossomos, plasmodesmos, proplastídios, bem como lipídios. Na figura 81b, de uma célula recém dividida, observam-se expansões de extremidades de cisternas do retículo endoplasmático rugoso que drenam substâncias lipoprotéicas, organizando-se sob forma de enovelados de membranas, provavelmente sendo utilizadas na diferenciação subsequente destas células. As reservas lipídicas existentes nas células em pré e pós-divisão não são visíveis em suas derivadas, durante o processo da formação da parede celular, reaparecendo na nova interfase.

Quando o embrião atinge este estágio, a lise das células do endosperma não se restringe apenas ao polo calazal do embrião, mas também é observada em todas as células do endosperma que envolvem o mesmo (figs. 74, 78 e 81). As paredes destas células tornam-se altamente hidratadas, sendo que ao final do processo lítico, não é mais possível observar a lamela média ou as microfibrilas que compõe a parede celular (fig. 76, 81d, 81e, 81f). Enquanto é observada a degradação de parede, o conteúdo destas células apresenta reservas lipídicas sendo que as proteínas provavelmente devem ter sido degradadas e assimiladas pelo embrião (fig. 76, 81d, 81e). A ação pectolítica, provavelmente induzida pelo próprio embrião, atua de forma dual, tanto no sentido de proporcionar um espaço necessário para seu desenvolvimento, como de liberar polisacarídeos úteis para sua diferenciação. Esta cavidade aumenta de volume durante o desenvolvimento embrionário. Nas regiões afastadas da cavidade digestora, ocorre diferenciação das células do endosperma, sendo caracterizada pela presença de um sistema de vesículas originadas a partir de dilatações das extremidades do retículo e do Complexo de Golgi, que convergem em determinada área, onde se fusionam, formando pequenos vacúolos no citoplasma, que iniciam a acumular proteínas de reserva no seu interior. Circundando a região dos vacúolos em formação, concentram-se várias mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (fig. 81c). Esta especialização ocorre no sentido centrífugo. Inicialmente as células mais internas do endosperma, junto ao embrião sofrem especialização, havendo um gradiente no qual as células que estão na periferia da semente são as menos especializadas, apresentando características da fase anterior do desenvolvimento (fig. 74, 76, 77; 78, 80). Observa-se uma camada de cutícula na região limítrofe entre o te-

gumento e a epiderme do endosperma e acúmulo de substâncias róseas nas células do tegumento (fig. 77).

O suspensor apresenta as mesmas características descritas nas fases anteriores. Na célula basal, evidencia-se um grande vacúolo no polo calazal, as paredes com vilosidades características de células de transfusão, o citoplasma denso, grande quantidade de mitocôndrias, dictiosomos e pequenas vesículas, aparentemente relacionadas a fenômenos de endocitose da membrana plasmática, junto ao polo micropilar e vesículas relacionadas a processos de exocitose no polo calazal, indicando que esta célula apresenta translocação de substâncias na direção do embrião. No núcleo, a cromatina apresenta-se parcialmente adensada (fig. 81g). As demais células do suspensor apresentam grande vacúolo, geralmente de posição micropilar e núcleo em posição oposta (fig. 75, 78, 81h). A análise destas células em M.E.T. (fig. 81h), nos mostra que o fluxo de vesículas de translocação continua a ser através de endo e exocitose, isto comprovado pela presença de pequenas vesículas originadas a partir da plasmalema, ou fusionando-se a ela, respectivamente. Observam-se dictiosomos concentrados em ambas as extremidades das células e pouca quantidade de retículo endoplasmático rugoso próximo a periferia das mesmas. Várias mitocôndrias estão presentes dispersas pelo citoplasma e alguns poucos plastídios com polissacarídeos de reserva. Foram também encontrados alguns corpos lipídicos, não observados em microscopia óptica. Aparentemente, as vesículas oriundas da endocitose trafegam no citoplasma através do retículo endoplasmático e dos dictiosomos, transferindo o conteúdo protéico para compartimentos pré-vacuolares, identificados como vacúolos em M.O., devido a sua transparência. Não foi identificada a formação de um tonoplasto contínuo circundando esta região. As reservas protéicas são transferidas para as mesmas organelas já citadas, na extremidade oposta da célula, liberando novas vesículas que realizam o processo de exocitose junto à plasmalema, passando para a célula seguinte. O orientação predominante da translocação é auxiliada pela presença de plasmodesmos nas paredes transversais, não ocorrendo esta estrutura entre as células do suspensor e o endosperma circundante, o que comprova o sentido preponderante da translocação de substâncias nutritivas da célula basal em direção ao embrião.

É precisamente nesta fase que as diferenças entre esporófito e xenófito são evidentes, destacando o endosperma como geração de reserva, e, embrião como a futura geração esporofítica viável.

3.6.3 Embrião cotiledonar

Este tipo de embrião se caracteriza pela emergência lateral dos primórdios cotiledonares, evento que marca a transição do tipo de simetria, anteriormente radial para bilateral durante o desenvolvimento morfogênico. Inicia-se, simultaneamente, a diferenciação do procâmbio a partir de derivadas do meristema fundamental (fig. 82).

Nas células do endosperma observa-se grande quantidade de vacúolos de contorno esférico com conteúdo protéico, demonstrado através da reação ao Coomassie Blue. Também são observados corpúsculos menores, de conteúdo lipídico, conforme mostra a figura 83. A formação destas reservas obedece o mesmo padrão descrito para a fase globular da embriogênese (fig. 84). Na cavidade digestora, observa-se que algumas células do endosperma foram totalmente degradadas (fig. 82).

3.6.4 Embrião cordiforme

Nesta fase do desenvolvimento embrionário ocorre o acréscimo de células aos tecidos pró-meristemáticos já existentes, permitindo a visualização de uma porção cortical do meristema fundamental, destacada da porção medular, formadora do procâmbio (fig. 85). Na região próxima ao suspensor, o embrião inicia a diferenciação do primórdio da coifa (fig. 85) mantendo a conexão via hipófise (fig. 88).

A medida que os cotilédones se desenvolvem, observa-se nas células do endosperma, na região micropilar, um acúmulo de corpúsculos protéicos de coloração vinácea em reação ao corante Azul de Toluidina (figs. 89, 90). Estes corpúsculos, se observados sob microscopia de polarização, desviam o plano da luz, provocando refringência, indicando desta maneira serem proteínas que durante esta fase do desenvolvimento se apresentam sob forma de cristais orgânicos. Estas substâncias não reagiram positivamente quando submetidas, tanto ao ácido sulfúrico quanto ao ácido acético. O teste utilizado para constatar a presença de polissacarídeos totais apresentou resultado negativo a estas substâncias.

A especialização das células do endosperma torna-se mais evidente, ocorrendo nítidas modificações morfofisiológicas observáveis nas células da região micropilar, com modificação das reservas para possível utilização pelo embrião (figs. 89, 91). Observa-se grande quantidade de vacúolos que reagem intensamente ao Coomassie Blue (fig. 86, 87), indicando síntese e acúmulo de grande quantidade de proteínas de reserva. A cavidade digestora não mais se localiza somente na região adjacente e abaixo dos cotilédones, mas envolve todo o embrião (fig. 85). As células do suspensor também apresentam corpúsculos vináceos, em menor quantidade se comparado com as células do endosperma (figs. 90, 91), ocorrendo um gradiente de intensidade destas substâncias, que se direciona das células mais distais do suspensor, às mais próximas do embrião.

Em M.E.T., observou-se dois momentos na ontogênese das células do suspensor, do embrião nesta fase do desenvolvimento. Na primeira delas (fig. 88) observa-se o máximo de acúmulo de reservas lipídicas e protéicas preenchendo todo o conteúdo celular. Os vacúolos protéicos podem apresentar dimensões maiores que os núcleos, sendo contornados por corpos lipídicos, que também se distribuem por toda a célula. No citoplasma cortical concentram-se mitocôndrias, plastídios com amido de reserva, enovelados de membrana, dictiossomos e poucas cisternas de retículo endoplasmático. Numa fase mais avançada, as proteínas da célula basal do suspensor apresentam-se cristalizadas (fig. 92), sendo visíveis em M.O. através do sistema de polarização, tendo sido caracterizadas, anteriormente, como substâncias vináceas. Nas demais células as reservas lipoprotéicas encontram-se com características semelhantes às descritas para o momento ontogenético anterior. Todas estas células apresentam invaginações de parede, caracterizando sua função tranfusora.

3.6.5 Embrião cordiforme tardio

O desenvolvimento observado nesta fase não ocorre tanto por acréscimo de células através de divisões celulares mas, sim, pela sua diferenciação, expressa através do aumento de volume celular e presença de substâncias ergásticas.

Os tecidos embrionários estão bem estabelecidos como mostra a figura 93. As substâncias vináceas presentes no endosperma e suspen-

sor, são também observadas no embrião, acumuladas na porção cortical (figs. 93, 94), na cavidade digestora (fig. 94) e em pequena quantidade nos vacúolos das células do endosperma (fig. 95). Em M.E.T o parênquima cortical em diferenciação, apresenta células em fase inicial (fig. 96) e mais avançada (fig. 97) de acúmulo de proteínas e uma abundância de corpos lipídicos distribuídos pelo citoplasma da célula. O sistema de membranas foi pouco preservado possibilitando apenas a identificação de plastídios com amido de reserva e núcleos.

O acúmulo dos grânulos vináceos nas células do endosperma (proteínas), acarreta grande dificuldade de penetração das substâncias fixadoras e da resina para emblocamento do material, resultando no rompimento do tecido no momento da secção (figs 98, 99). Nestas células, o conteúdo de proteínas vináceas encontra-se sob forma de filamentos, dissolvido ou polimerizado nos vacúolos (fig. 101) ou condensado junto ao tonoplasto (fig. 103, 104), formando corpos protéicos que dificultam a penetração destas mesmas substâncias. Também foram visualizadas proteínas cristalizadas, sob forma de espículas (fig. 102). Uma das tentativas para solucionar este problema foi a extração de proteínas conforme descrito no Material e Métodos, porém, apesar das técnicas utilizadas, parte do material protéico permanece no interior das células do endosperma, mantendo a dificuldade acima descrita (fig. 100).

No material analisado, até o mês de janeiro, as células do suspensor apresentam aspecto citológico normal, inclusive com núcleo presente e funcional (fig. 106). A partir deste período, foram observadas algumas modificações significativas como a presença de grandes vacúolos contendo proteínas, que apresentam coloração rósea em reação ao corante Giemsa (figs. 105, 107). Ao redor destas células, na região micropilar, bem como nas células da epiderme interna do tegumento, ocorre a concentração de compostos fenólicos, identificados pela coloração verde em reação ao corante Azul de Toluidina, quando os embriões estão em estágio cordiforme e cordiforme tardio. Estas modificações indicam o início do processo de Morte Celular Programada - MCP.

As análises do material coletado a partir desta etapa do desenvolvimento, apresentavam características morfológicas peculiares ao final do processo de MCP. A maior parte dos embriões analisados apresentavam a célula basal do suspensor com fragmentação do núcleo (fig. 108),

condensação do citoplasma (fig. 109), adensamento protéico (figs. 109, 110) redução do volume celular (figs. 111, 112), alteração da estrutura da parede celular e presença de alta concentração de compostos fenólicos, além de vilosidades, próximas a região da micrópila (figs. 112, 114). Em M.E.T. a célula basal apresenta um início de desorganização de seu sistema de membranas, poucas mitocôndrias, vestígios de proteínas de reserva e ausência de lipídios. Por outro lado, as células subseqüentes do suspensor apresentam estrutura preservada similar ao suspensor descrito anteriormente, exceto pela presença de amiloplastos (fig. 114).

Naquelas células que já haviam passado pelo processo de apoptose, não mais foi possível observar conteúdo citoplasmático (figs. 111, 113) e não foi possível documentar esta fase em M.E.T..

Por outro lado, alguns embriões ainda mantêm o suspensor com características não-apoptóticas e os frutos com aspecto maduro. Tendo em vista os objetivos do trabalho, após semeadura e extração periódica de exemplares para análise, observou-se três tipos de comportamento relacionado a presença ou não do suspensor:

1. Nos embriões que permaneceram em estágio cordiforme tardio, a célula basal e a seguinte apresentavam característica de MCP: núcleo ausente ou presença apenas de cromatina sob forma de massa amorfa; citoplasma com aspecto coagulado; paredes celulares espessadas. Nestas sementes, o endosperma apresentava grande quantidade de proteínas sob forma de corpúsculos vináceos (figs. 115, 116).
2. Em alguns embriões em estágio cordiforme tardio, ocorreu degradação de paredes, tanto da célula mais distal do suspensor, em contato com embrião, como das células da coifa, ocasionando a interrupção da conexão entre embrião e suspensor (figs. 117, 118).

Embriões que mantiveram o suspensor, completaram seu desenvolvimento em aproximadamente quinze dias, passando à fase de torpedo da embriogênese e conseqüente germinação (figs. 119, 120).

3.5.6. Embrião torpedo

Os embriões em estágio de torpedo, decorridos oito meses do plantio, pouco antes da germinação, apresentavam suspensor com cerca de sete células, vivas, sem características citológicas de MCP, com a célula ba-

sal envolta ou não por substâncias coradas de esverdeado (compostos fenólicos) e núcleo ativo, intacto ou com cromatina adensada (figs. 121, 122). Nesta fase, os tecidos meristemáticos tais como protoderme, meristema fundamental e procâmbio são evidentes, sendo que entre o suspensor e o centro quiescente, abaixo da protoderme, houve desenvolvimento da coifa, originada a partir do centro quiescente (fig. 123). As células do endosperma não apresentavam corpúsculos vináceos como substância de reserva, apenas vacúolos contendo proteína amorfa (fig. 124). Mesmo nos embriões onde já ocorreu a emergência da radícula, observou-se que o endosperma permanecia com suas células vivas, não tendo sido degradado.

Além deste tipo de embrião, também foram observados embriões em estágio cordiforme e cordiforme tardio com os mesmos sinais morfológicos descritos anteriormente que caracterizaram o processo apoptótico, sendo provavelmente esta a justificativa para o comportamento cíclico da germinação desta espécie.

As etapas da embriogênese final estão sumariadas nas figuras 125j-o concluindo todo o ciclo embriogênico da *Ilex paraguariensis*.

Discussão

4.1 CICLO REPRODUTIVO EM *ILEX PARAGUARIENSIS* ST. HIL.

Segundo Cocucci (1986) o ciclo biológico das Angiospermas é considerado um dos mais complexos entre os seres vivos pois nele observa-se a existência de três gerações. Uma sexuada que produz gametas (gametofítica), uma assexuada que forma esporos (esporofítica) e uma geração auxiliar que não forma estruturas reprodutivas próprias (xenofítica). O diagrama da figura 3 procura ilustrar de maneira sucinta estas etapas, caracterizando temporalmente as fases do desenvolvimento de um árvore ginospangiada, a formação e desenvolvimento do gametófito feminino, e, a maturação das estruturas carpelares e do rudimento seminal na formação da unidade de dispersão fruto/semente de *Ilex paraguariensis*. Somente foram detalhadas, fases do ciclo reprodutivo consideradas mais representativas para o objetivo proposto neste trabalho, sendo o esquema útil também para a identificação de fases importantes para estudos de melhoramento genético, cultura de tecidos, cultivo e outros.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA FLOR PISTILADA EM ANTESE E FRUTO

Copeland (1963) se refere ao gênero *Ilex* como possuindo flores com nível primitivo de desenvolvimento, pois são actinomorfas, perianto e estames hipóginos, e, verticilos florais de número fixo. Neste contexto, *Ilex*

parece pertencer a subdivisões primitivas, pelo fato de cada carpelo possuir suprimento vascular individual, sendo que a vascularização se desenvolve do funículo em direção ao tegumento (Mauritzon, 1936; Mariath *et al.*, 1995; Ayub *et al.*, 1992). Mauritzon (*loc.cit.*) se refere ao rudimento seminal como sendo unitégmico em *Ilex*, por concrecimento dos tegumentos, sendo esta uma característica considerada mais evoluída e segundo Cronquist (1988) de origem independente. Esta tendência evolutiva, relacionada ao desenvolvimento ontogenético, está amplamente de acordo com os modelo de evolução propostos na atualidade (Bouman, 1984; Cronquist, 1988).

Os estaminódios que ocorrem nestas flores, foram considerados por Schoenberg & Dinouti (1989) como expansões petalóides ou estames modificados em um pétalo, o que não corresponde ao observado. Greenberg (1996) descreveu o aborto de estames, em flores unissexuais, através do processo de Morte Celular Programada. Este processo poderia condicionar a forma rudimentar desta estrutura ao longo do seu desenvolvimento, porém não comprovada histologicamente para a espécie em questão.

O estigma de uma planta dióica é extremamente importante para garantir a fixação do grão de pólen que está sendo transportado pelo agente polinizador. Segundo Heslop-Harrison & Shivanna (1997), o estigma de *Ilex paraguariensis* seria classificado como sendo úmido quanto ao aspecto geral. Investigações recentes (Heslop-Harrison, 1981) revelaram uma importância taxonômica e filogenética levando em consideração aspectos morfológicos e fisiológicos. Quanto a morfologia, as superfícies estigmáticas devem ser avaliadas quanto a disposição das células da superfície receptora e característica das papilas. Em *Ilex paraguariensis*, um estigma sêssil, tetralobado avança marginalmente, aproximando-se da borda do ovário, a semelhança do descrito por Edwin & Reitz (1967). As células papilosas do estigma se conectam diretamente ao tecido transmissor, tecido este diferenciado após a maturação e concrecência dos carpelos. A presença deste tecido transmissor também foi evidenciada em *Ilex opaca* (Barret, 1962).

Após a polinização, predominantemente entomófila (melitofilia e miofilia – segundo Ayub, comunicação pessoal), com alto percentual de indivíduos fecundados, parece haver um estímulo para que as células do estigma e do tecido transmissor produzam secreção de enzimas ou

mucilagem que provoca um afastamento das células através da hidratação da lamela média e posterior lise. Tal processo facilita e orienta a passagem do tubo polínico, conduzindo-o desta maneira, via apoplasto, até o rudimento seminal, para que ocorra a fecundação. Wang *et al.* (1996) sugere que possa ocorrer Morte Celular Programada no tecido transmissor, através do qual o tubo polínico irá se desenvolver. Segundo este autor, este processo de dissolução pode ocorrer por estímulos químicos, de substâncias produzidas no momento da polinização. Havendo compatibilidade entre pólen e estigma, ocorre formação de substâncias que irão atuar neste tecido, facilitando a penetração e orientação do tubo polínico. Este processo é seletivo, pois o tecido que circunda o tecido transmissor, no pistilo, permanece intacto. A morte destas células parece estar relacionada com o crescimento do tubo polínico, uma vez que pólen incompatível (que inicia a germinação mas cujo tubo polínico não se desenvolve) não provoca morte celular. O etileno está envolvido em parte deste processo de morte celular pois o bloqueio dos etileno-receptores faz com que o tecido transmissor sofra parte do processo de MCP. Uma das possibilidades é a de que o tecido transmissor que está sofrendo MCP sirva de nutrição ao tubo polínico em desenvolvimento. Segundo Herrero (1992) a Morte Celular Programada também é importante para a acomodação física do tubo polínico em desenvolvimento e proteção contra a ação de patógenos. Em *Ilex paraguariensis* não foram observadas modificações nas células do tecido transmissor, que caracterizassem a Morte Celular Programada.

A secreção das papilas e do tecido transmissor extravasa, localizando-se na margem do estigma, zona onde o pólen permanece retido para a germinação. Este comportamento não foi ainda descrito para qualquer espécie do gênero.

Partindo do estigma, em direção aos lóculos do ovário, observa-se o tecido transmissor convergindo em direção ao cômputo, também denominado de átrio por Schoenberg & Dinouti (1989), região característica de ovários eussincárpicos, que propicia a chegada de tubos polínicos em cada um dos lóculos a partir de um único evento de polinização (Denffer *et al.* 1976)

Segundo Van Vent & Willemse (1984), o estigma pode fornecer nutrientes ao pólen e diretamente ao tubo polínico para seu desenvolvimento, como também estar envolvido na regulação do metabolismo da

flor. Tanto a superfície do pólen quanto do estigma estão envolvidos no reconhecimento e recepção de sinais através da interação de polipeptídeos e lipoproteínas.

Bouman (1984) cita que em algumas espécies vegetais, para que o tubo polínico transponha a placenta e alcance a micrópila, existem estruturas especializadas tais como obturador e papilas, que servem para orientar o tubo polínico e facilitar sua entrada através da micrópila. Este mesmo autor, caracteriza os diferentes tipos de obturadores, conforme sua posição, em: obturadores funiculares, em rudimentos seminiais com funículo bem desenvolvido, e, obturadores que derivam da placenta ou da combinação da placenta e funículo, em rudimentos seminiais sésseis. A espécie em questão se enquadra no primeiro tipo citado, conforme já descrito em Mariath *et al.* (1995).

O endotélio, caracterizado em *Ilex paraguariensis*, é referido por Fahn (1989), como tapete tegumentário, sendo que em algumas espécies, ocorrem casos de poliploidia devido a binucleação ou multinucleação, o que não ocorre na espécie em estudo. Já Herr (1961) caracteriza o gênero como possuindo esta camada de células com parede celular e núcleos mais corados e, ocasionalmente, binucleadas. Foi constatada a presença de tanino em células da epiderme interna e externa do tegumento em *Ilex aquifolium* (Copeland, 1963), a semelhança do que foi encontrado em *Ilex paraguariensis* através da coloração esverdeada do conteúdo de compostos fenólicos das células desta camada, em reação ao corante padrão, porém não foram utilizados testes histoquímicos específicos para este tipo de composto.

Edwin & Reitz (1967) classificam o fruto desta espécie como sendo uma baga-drupa. Diapp (1984), o classifica como nuculanídio, baseando-se na classificação de Hertel (1954). Neste trabalho adotamos a classificação de Spjut (1994) que o denomina como drupa (sinonímia nuculanêo), descrevendo os frutos com pericarpo carnosos, com uma a cinco sementes (pirenos). Esta classificação é a que melhor caracteriza o fruto desta espécie, além de ser a referência mais atual sobre a tipologia dos frutos.

Durante a formação do pireno a lignificação das células do endocarpo de *Ilex paraguariensis* já foi descrita por Mariath *et al.* (1995), analisando a ontogênese do fruto. Estes autores demonstram que em fases iniciais de desenvolvimento, ocorre a formação de fibras pectoce-

lulósicas revestindo o endocarpo que também envolvem os feixes vasculares e que no fruto maduro estas se tornam lignificadas dando a consistência rígida a esta camada, envolvendo totalmente a semente. Apesar desta lignificação foi constatada a manutenção de um orifício não-lignificado na região micropilar, permitindo que a semente mantenha trocas, tanto gasosas como de água e nutrientes, com o meio. Esta camada foi considerada, como motivo da dormência encontrada nestas sementes (Reitz *et al.*, 1983). Porém, a possibilidade de interação da semente com o meio externo, apesar da presença de uma camada de células lignificadas sobre a região micropilar, enfraquece a hipótese sobre a dormência ou quiescência imposta por estruturas carpelares.

4.3 ETAPAS DO PROCESSO DA FECUNDAÇÃO

No ciclo de vida das plantas, a fecundação é, invariavelmente, associada à reprodução sexual, representando trocas genéticas que dão início à fase diplóides ou esporofítica do desenvolvimento (Raghavan, 1997).

Entre o século XIX e começo do presente, foram caracterizados os fenômenos fundamentais da fecundação em Angiospermas, com o estabelecimento da duplafecundação, sendo este um passo importante que serviu de base aos estudos realizados até a atualidade (Jensen, 1998). Estudos recentes mostram que este não é um processo exclusivo das Angiospermas, tendo sido constatado também em *Ephedra* e *Gnetum*, porém, originando como produto final, além do zigoto, resultado da primeira fecundação, um zigoto supranumerário, resultado da segunda fecundação, sem a formação de endosperma, como nas Angiospermas (Friedman, 1998). Este fenômeno engloba desde a polinização, o acoplamento, a cópula, a descarga dos gametas e a singamia (Cocucci, 1995). Em *Ilex paraguariensis*, as diferentes fases identificadas, que compõe este processo, serão discutidas a seguir.

4.3.1 Germinação do andrófito e passagem do tubo polínico através do tecido transmissor

O estigma, em Angiospermas, é uma estrutura eficiente com adaptações morfológicas e fisiológicas que permitem a captura, hidratação e germinação do pólen. A superfície estigmática pode desempenhar função vital, no controle da hibridização interespecífica e na regulação da compatibilidade entre espécies (Heslop-Harrison, 1992).

A superfície estigmática de *Ilex paraguariensis*, apresenta abundante secreção. O exudado estigmático proporciona um meio adequado para a germinação do pólen cuja composição é água e nutrientes Linskens (1969). Se trata de um meio complexo, que contém glicídios e substâncias protéicas, algumas das quais atuam como estimulantes e outras como inibidoras da germinação do andrófito (Cocucci, 1981). Isto faz com que ocorra a hidratação do andrófito e germinação do mesmo se houver compatibilidade. Dumas *et al.* (1984), citam que a superfície estigmática parece regular a relação de hidratação entre estigma e pólen, sendo que a chegada de pólen no estigma desencadeia uma série de interações mutuas para uma polinização efetiva. Já Maheshwari (1950), contrapondo o citado pelos autores anteriores, coloca que apesar do estigma ter supostamente uma função importante na germinação do grão de pólen, em algumas plantas esta germinação pode ser induzida em uma solução açucarada na dosagem adequada. A germinação de grãos de pólen de *Ilex paraguariensis* pode ocorrer também *in vitro* (Santos, 1995), porém a interação grão de pólen-estigma certamente ativa a produção de substâncias que fazem com que haja a hidratação e dissolução da lamela média das papilas estigmáticas e do tecido transmissor, ou ative a secreção de substâncias que, antes da polinização, não ocorreriam, permitindo o deslocamento do tubo polínico através deste tecido.

Cocucci & Di Fulvio (1969) sugerem que existem pontos-chave no desenvolvimento do tubo polínico no estigma, passando através do tecido transmissor, alcançando o rudimento seminal e ginófito que são controlados por uma variedade de estímulos, dependendo do local e tempo. Um destes estímulos é o Cálcio, sob forma de gradiente direcionando ou promovendo a elongação do tubo polínico (Ilarslan *et al.*, 1997; McAnish & Hetherington, 1998) ou presente nas sinérgides (Ilarslan *et al.*, 1997; Kapil & Bhatnagar, 1981). Segundo Ilarslan *et al.* (1997), o oxalato de cálcio é um produto onde os íons de Ca^{+2} são provenientes da absorção de sais e água do solo e os derivados de oxalato (ácido oxálico) são produtos do metabolismo vegetal, sendo que sua presença pode ser benéfica em uma ou mais fases do ciclo de vida da planta ou pode ser a fonte de indução da MCP do suspensor e tecido transmissor, uma vez que desencadeia este processo ativando a síntese de endonucleases. A degradação do oxalato é regulada pelo desenvolvimento e tem papel importante, tanto na parte bioquímica da parede

celular como na remodelagem de tecidos. Como resultado da degradação do oxalato, ocorre liberação de Ca^{+2} e H_2O_2 , sendo que estes podem desencadear fatores importantes na transdução de sinais para as plantas. Em *Ilex paraguariensis* observou-se a presença de oxalato de cálcio sob forma de drusas, em tecido carpelar, na região abaixo do estigma, principalmente acompanhando o tecido de condução. Estas evidências sugerem que o cálcio seja necessário para processos que ocorrem nesta fase da fecundação, sendo o excesso depositado sob forma de cristais.

Este processo permite a penetração de um ou vários tubos polínicos, como o encontrado em *Ilex paraguariensis*, confirmando os dados obtidos por Herr (1961). Durante seu percurso, a unidade generativa masculina descrita por Santos (1995), altera sua morfologia básica, não perdendo o caráter associativo, garantindo assim o transporte simultâneo da carga genética masculina.

4.3.2. Singamia

O processo de fecundação é um processo chave no estabelecimento de sementes nas Angiospermas (Knox & Singh, 1987). Entretanto, profundas modificações estruturais ocorrem devido a descarga do tubo polínico e degeneração de uma das sinérgides (Cocucci & Di Fulvio, 1969), bem como modificações na organização e interação de material, tanto do gameta masculino como feminino (Johri, 1984) que resultam em drásticas modificações nas propriedades de coloração do citoplasma destas células, tornando-se assim difícil a interpretação desta fase quando analisada sob microscopia óptica. Cocucci (1981) cita que nas diferentes formas de produzir a descarga do tubo polínico, as consequências são as mesmas, no que se refere as modificações que sofrem o protoplasma do tubo e sinérgide penetrada, ocorrendo uma desorganização de todo o sistema de membranas de maneira que não se observam os limites das distintas organelas celulares. Barret (1962), analisando *Ilex opaca* durante a fecundação, se refere a análise da fusão dos gametas como sendo difícil devido a intensa coloração assumida pela degradação das sinérgides e expulsão do conteúdo do tubo polínico, o que ocorreu de modo similar em *Ilex paraguariensis* no presente trabalho. Este mesmo autor, apesar das dificuldades, caracterizou o núcleo dos gametas masculinos como sendo elipsoidais antes da fusão e esféricos logo após a fusão, confirmando nossas observações.

Dumas *et al.* (1984) propuseram o termo unidade generativa feminina para designar o aparelho oosférico e célula média, caracterizada pela ausência de parede celular na zona de contato com os gametas masculinos. Apesar deste termo ser apropriado para caracterizar este conjunto de células, não o utilizamos por considerarmos este um sistema estático e não móvel como o considerado para a unidade generativa masculina.

A fase de acoplamento do tubo polínico ocorre na porção micropilar do aparelho oosférico porém sem formação do tubo copulador. Aparentemente, o tubo polínico aproxima-se do aparelho oosférico e se rompe ao simples contato com as extremidades de suas células. A descarga do conteúdo do tubo polínico ocorre lateralmente sem penetração em qualquer das sinérgides, evidenciado pela manutenção do aspecto citológico intacto de suas células. Estas células, em *Ilex paraguariensis*, possuem espessamento representativo de pectina em seu polo micropilar, formando o aparelho fibrilar. Esta pectina se hidrata e intumescce durante o processo da fecundação, provavelmente apenas orientando o tubo polínico. Este tipo de comportamento é similar ao aparelho fibrilar ou modificações similares em paredes celulares de Angiospermas desprovidas de sinérgides, onde a parede da oosfera diferencia um aparelho fibrilar com função de atrair o tubo polínico ao ginófito (Russel, 1992).

Jensen (1972) caracteriza o aparelho fibrilar como sendo uma estrutura particularmente importante do ponto de vista da penetração do tubo em uma das sinérgides, sendo que necessariamente, para penetrar no ginófito, o tubo polínico deve penetrar no aparelho fibrilar. Segundo Johri (1984) as sinérgides sintetizam substâncias quimiotrópicas que são secretadas para o interior do aparelho fibrilar e a partir daí, são exteriorizadas através da micrópila.

Van Went (1992) sugere que o aparelho fibrilar desempenha um papel importante na interação entre gameta masculino e feminino, permitindo a penetração do tubo polínico através de forças mecânicas resultantes da composição específica e propriedades fisiológicas desta estrutura. Outra possibilidade é a de que o tubo polínico secrete enzimas que transformem o aparelho fibrilar em uma região que atraia o tubo polínico. É conhecido que tubos polínicos que estão se desenvolvendo no tecido transmissor (estilete), produzam e secretem enzimas, como pectinases, capazes de degradar substâncias intercelulares do tecido

transmissor. Tais características histológicas citadas pelo autor foram observadas na espécie em estudo, pois o percurso do tubo polínico, do estigma até atingir o ginófito, se dá via apoplasto. Cocucci (1981) se refere ao aparelho fibrilar como uma estrutura especializada para a recepção do tubo polínico, onde ocorrem complicados processos enzimáticos, relacionados ao tubo copulador que atravessará o aparelho fibrilar, no momento da descarga dos gametas.

Por outro lado, Barret (1962), em *Ilex opaca*, constata que as sinérgides estão em estágio inicial de degradação antes da fecundação, portanto sem participação do aparelho fibrilar neste processo.

Maheshwari (1950) menciona que a penetração do tubo polínico pode ocorrer entre as sinérgides ou entre uma sinérgide e a oosfera. Em ambos os casos as sinérgides são consideradas não-penetradas e o tubo polínico é descarregado no ginófito. Um terceiro caso é a penetração e descarga do tubo polínico em uma das sinérgides. Além destes três padrões, Kapil e Bhatnagar (1975) ainda caracterizam a penetração entre a oosfera e sinérgides, entre a parede do ginófito e uma ou ambas as sinérgides, e, entrada direta no citoplasma da sinérgide já degenerada. Mais comumente, ocorre a degradação de uma sinérgide sendo que o estímulo para que isto ocorra ainda não é bem conhecido. A degradação da sinérgide pode ocorrer antes da polinização como em algodão ou após este evento, momentos antes da fecundação, como em cevada (Jensen, 1972).

Após a descarga do tubo polínico, foi possível observar a fusão de um gameta masculino com a oosfera e o outro gameta com a célula média, através da presença de dois nucléolos envoltos por uma só carioteca, em cada uma das células, pois estes se fundem posteriormente. Segundo Gerassimova (1933) a presença de dois nucléolos torna possível distinguir uma oosfera fecundada de uma não-fecundada, pois a cromatina do gameta masculino torna-se indistinta da cromatina da oosfera logo após a cariogamia, mas não o seu nucléolo, que antes de se fundir aumenta em tamanho, tornando-se claramente visível. A fase perceptível da fecundação se encerra exatamente no momento da fusão dos dois nucléolos. O mesmo autor menciona que embora a fecundação sempre se inicie primeiro no núcleo da oosfera, a fase de fusão completa dos núcleos é, freqüentemente, simultânea ou algumas vezes se completa antes no núcleo do endosperma. A célula média constitui-se no

segundo gameta feminino, sendo que a fusão deste com o gameta masculino originará um zigoto $3n$, conhecido como célula endospermogênica que formará, mais tarde, uma geração auxiliar, o xenófito ou endosperma (Cocucci, 1981).

O resultado do processo da fecundação acarreta modificações, não apenas no ginófito, como acima discutido, mas também no rudimento seminal, através da lignificação de células do tegumento, formando um "capuz micropilar" também descrito por Herr (1961), para duas das seis espécies estudadas do gênero *Ilex*. Este mesmo autor, refere casos raros de lignificação de células ao redor de todo o rudimento seminal, como eventualmente foi constatado em *Ilex paraguariensis*. Além disso, também menciona a presença de drusas na região micropilar e lateral, adjacentes ao endosperma, da mesma forma identificada na espécie em estudo. A função da especialização nas paredes desta região, não foi discutida pelo autor, mas aparentemente atua como uma barreira mecânica de proteção do embrião e endosperma

4.4 ENDOSPERMOGÊNESE

O endosperma é considerado um embrião de uma geração auxiliar ou xenófito. Esta geração é característica das Angiospermas, não forma estruturas reprodutoras próprias, nem se conecta diretamente com a alternância de gerações, servindo apenas de sustento ao embrião em (Cocucci & Mariath, 1995).

Ontogênicamente, o início da formação do endosperma ocorre após a fecundação do sincário-pró-endospérmico (núcleo secundário da célula média) por um dos gameta masculino, durante o processo da dupla fecundação. Após este fenômeno, têm início as divisões do núcleo endospermogênico (zigosincário-pró-endospérmico). Segundo Raghavan (1997), os padrões de divisão desta célula servem de base para a classificação do endosperma em três tipos básicos: nuclear, celular e helobial. Com base nesta classificação, concluímos que o endosperma da espécie em estudo é do tipo celular. A orientação e disposição das células do endosperma, durante a divisão, na fase inicial da endospermogênese, constitui importante caráter taxonômico. Através do estudo ontogênico do endosperma de *Ilex paraguariensis* este foi classificado como sendo do megátipo celular, tipo isopolar, subtipo translongitudinal, segundo o sistema EODP (Di Fulvio, 1985). Herr (1961) cita que os mem-

bro da Ordem Celastrales possuem formação do endosperma do tipo nuclear, sendo que considera *Ilex* um tipo em transição entre nuclear e celular pois, freqüentemente, ocorre um lapso de tempo entre a mitose e a citocinese durante as fases iniciais de desenvolvimento. Mauritzon (1936) e Davis (1966) citam, para a família Aquifoliaceae, a formação de endosperma do tipo celular *ab initio*.

Os padrões observados nas divisões iniciais da endospermogênese, da espécie em estudo, foram comparados a estudos realizados por Herr (1961) em seis espécies do subgênero *Euilex* e *Prinos* que representam o gênero. Estas apresentam variações no desenvolvimento do endosperma, em fases iniciais, quanto ao padrão de orientação nos planos de divisão e formação das paredes celulares. Após as primeiras divisões, formam-se três compartimentações que servem de referência para a classificação e são consideradas padrão. A principal variação foi observada em *Ilex opaca*, por Barret (1962), na qual somente dois compartimentos são formados antes da divisão vertical, o que pode reduzir o comprimento total do tecido endospérmico. Schürhoff (1921) relata para *Ilex aquifolium* a formação de quatro compartimentos antes da divisão longitudinal a semelhança do observado em *Ilex verticillata*, inferindo que o compartimento micropilar deve ter se formado subsequente à divisão vertical do compartimento calazal com deslocamento do núcleo durante a formação do endosperma. Estes estudos comparativos, nos levaram a concluir que durante a endospermogênese inicial, *Ilex paraguariensis* segue o padrão descrito para o gênero ou seja, a formação de três compartimentos em seqüência linear. Apesar das diferenças iniciais do desenvolvimento, em fases mais avançadas todas as espécies já analisadas apresentam grande similaridade na estrutura deste tecido.

Schürhoff (1921), afirma para o gênero *Ilex*, que as antípodas não são mais observáveis quando o endosperma apresenta 4 células. Estas degeneram sem deixar vestígios. As mesmas características observadas pelos dois autores acima mencionados foram observadas na espécie em estudo.

Herr (1961) analisando o gênero *Ilex* e Chamberlin & Horner (1993) em soja, observaram que o endosperma atinge avançado estágio de desenvolvimento antes das fases iniciais da embriogênese do zigoto. O mesmo conclui Raghavan (1997), o qual se refere genericamente à divi-

são do núcleo do endosperma primário como precedendo a do zigoto, caracterizando este comportamento como uma permuta no balanço de competição dos genomas, como no caso de *Triticum aestivum*, onde ocorre uma grande diferença em relação a atividade mitótica, sendo que em plantas mantidas a 20°C, o núcleo primário do endosperma iniciou sua divisão 6 horas após a polinização, enquanto que o zigoto só se dividiu após 22 horas. Em *Ilex paraguariensis* esta diferença é muito acentuada, o zigoto só inicia divisão após o endosperma possuir mais de 8 células. Em princípio, este comportamento caracterizaria uma dormência, porém, considerando o endosperma como um tecido de reserva, cuja finalidade é a de nutrir o embrião, esta diferença observada somente tornaria mais evidente sua função, havendo a necessidade de um período maior para que este tecido xenofítico se modifique estruturalmente para cumprir seu papel. A diferenciação destas células é direcionada no sentido de produzir reservas, sendo considerado por Raghavan (1997) um tecido simples e amorfo, com a presença de pequeno número de células diferenciadas.

A presença de uma coluna hipostática nas fases iniciais da endospermogênese em *Ilex paraguariensis* também foi comprovada por Niklas (1987) e para a família Aquifoliaceae por Davis (1966). Barret (1962) cita, para *Ilex opaca*, a presença de hipóstase bem desenvolvida, que é digerida e consumida durante o desenvolvimento do endosperma. Copeland (1963), refere-se a hipóstase em *Ilex aquifolium* e *I. cornuta* como um corpo globular com células de paredes espessadas que se diferencia na região calazal, com função discutível. Kapil & Bhatnagar (1981), sugerem que a hipóstase seja resultado da compressão das células do nucelo ou um centro ativo de nutrição do endosperma em formação. Segundo o observado em *Ilex paraguariensis* este tecido atua ativamente no fornecimento de nutrientes aos embriões, não constituindo-se uma barreira morfológica ao avanço do endosperma. A medida em que as células do endosperma se dividem, as que se localizam na região calazal se especializam, demonstrando a participação ativa na função de translocação.

Outro componente importante que deve ser considerado, durante o desenvolvimento do endosperma/embrião, é a presença de uma camada densamente osmiofílica, depositada entre a parede interna do tegumento e o endosperma, porém ausente na região micropilar e calazal do

nucelo, sendo resistente a ação de celulases e pectinases. Esta camada constitui-se uma cutícula que foi observada por Jensen (1972), Otegui *et al.* (1998) em *Myrsine laetevirens*, sem discutir a provável função da mesma, e, por Chamberlin & Horner (1993), em soja, na interface entre tegumento e nucelo. Estes autores sugerem um tipo bipolar de fluxo de nutrientes nestas fases iniciais do desenvolvimento embrionário, motivadas pela barreira imposta por esta camada, similar a cutícula, na interface entre o tegumento interno e saco embrionário, até a fase de embrião globular, quando esta é degenerada. Desta forma, segundo esta interpretação, haveria o condicionamento da entrada de nutrientes apenas através do polo micropilar e calazal, havendo isolamento das porções laterais do endosperma/embrião. No caso de erva-mate, esta camada se mantém até, pelo menos, embrião cordiforme.

Em fases mais avançadas da endospermogênese (mais de oito células), o número de divisões celulares é maior na região micropilar e calazal do que na porção central, resultando assim, endosperma com três tipos distintos de células posicionadas nas regiões acima citadas. Barret (1962) descreve para *Ilex opaca* esta mesma caracterização do endosperma em três distintas zonas, após este tecido ter se tornado multicelular. Modificações citológicas deste tecido foram observadas em erva-mate quando o embrião encontra-se em estágio globular a piriforme. Nesta fase, não mais se distinguem as três zonas com características morfocitológicas distintas. O início da especialização deste tecido é observado através de novas divisões na região mediana, vacuolação das células e síntese de substâncias de reserva.

Hu & Ferreira (1989), analisando o endosperma de frutos imaturos de várias espécies de *Ilex*, observaram que as células deste tecido eram transparentes (translúcidas) e ricas em um fluido aquoso no período antes do embrião atingir o estágio cordiforme. A maior parte das substâncias de reserva, no endosperma maduro, aparentemente, acumulam durante o estágio de cordiforme inicial do embrião. O endosperma se torna opaco e contendo lipídios quando o embrião atinge o estágio de cordiforme intermediário. As características histológicas observadas por estes autores, corroboram o observado em *Ilex paraguariensis*, onde a especialização das células do endosperma, no sentido de sintetizar e armazenar as substâncias de reserva, ocorre exatamente nesta fase. Em

1979, Hu *et al.*, descrevem para espécies do gênero *Ilex* a presença de reservas lipoprotéicas no embrião.

Heuser (1990), analisando *Ilex paraguariensis*, menciona que a maior quantidade de substâncias de reserva das sementes encontra-se no endosperma, sendo estas de natureza lipoprotéica durante a embriogênese tardia e que, somente durante a embriogênese inicial, são observados polissacarídeos do tipo amido.

4.4.1 Tipologia das reservas e organelas associadas

4.4.1.1 Proteínas

Guillermond (1908) lança a teoria de que os corpos protéicos são originados no vacúolo central da célula, sendo confirmado posteriormente por vários autores, tanto por evidências diretas quanto indiretas.

Rost (1971, 1972) descreve os corpos protéicos como organelas de reserva, de membrana simples, classificando as proteínas das Angiospermas em três grupos, de acordo com o tipo de subunidades presentes nos corpos protéicos, a saber, *Tipo 1*— corpos protéicos sem inclusões; *Tipo 2*— corpos protéicos com subunidade globóide e *Tipo 3*— corpos protéicos com subunidades globóides e cristalóides. Em *Ilex paraguariensis* foram observadas proteínas do *Tipo 1*, apresentando uma matriz que variava morfológicamente dependendo o estágio de degradação e do *Tipo 2*, que aparentavam ter subunidades, sem caracterização da composição deste conteúdo (apenas adensamentos protéicos).

Ashton (1976) afirma que as proteínas de reserva na maioria das sementes ocorre em distintas organelas, que são comumente chamadas de corpos protéicos. Outros termos como grânulos protéicos, vacúolos protéicos, corpos de aleurona, vacúolos de aleurona ou grãos de aleurona, são freqüentemente usados. São encontrados tanto em tecido haplóide, diplóide como triplóide. Corpos protéicos são organelas esféricas ou ovais que contêm proteínas de reserva e outras substâncias unidas por uma membrana simples, difícil de ser identificada em fotomicrografias. Segundo estes autores estudos ultraestruturais mostram que nem todas as proteínas se assemelham, variando quanto a estrutura interna e dimensões. Os corpos mais simples tem matriz de forma granular ou homogênea, sem subunidades, enquanto que os mais altamente estru-

turados apresentam uma ou mais subunidades embebidas em uma matriz protéica finamente granulada.

Vijayaraghavan & Prabhakar (1984) referem-se às proteínas de reserva como sendo amplamente acumuladas no endosperma durante a formação da semente e que a síntese destas proteínas ocorre no RER e acumuladas em organelas especializadas das células, os corpos protéicos. Estes são envoltos por uma membrana simples e contém uma matriz na qual encontram-se inclusões apenas do tipo globóide, globóide e cristalóide ou amorfa. Estes corpos protéicos são formados através de diversos mecanismos que envolvem a participação do RER, vacúolos e dictiosomos, sendo constituídos de proteínas de reserva e fitina.

Alvarez & Guerra (1985) citam que podem ser observados três tipos de corpos protéicos em sementes de lentilha (*Lens culinaris*): o primeiro com material uniforme, o segundo com material coagulado e semi-coagulado e o terceiro com inclusões que podem ser globóides eletro-transparentes, acrescentando que existem corpos protéicos com diferenças estruturais ou de composição.

Owens *et al.* (1992), citam que os corpos protéicos no embrião e megagametófito de *Pseudotsuga menziesii*, apresentam uma matriz interna heterogênea, com porções eletrodensas, floculadas e cavidades globulares.

Quanto ao tipo de proteínas, Mohr & Schopfer (1995) referem-se a um grupo especial de proteínas denominado proteínas de armazenamento ou reserva que são codificadas no núcleo, sintetizadas em polissomos agregados ao Retículo Endoplasmático e secretadas no lume do RE e transportadas via aparelho de Golgi. Estas proteínas não possuem atividade enzimática ou função estrutural, mas são utilizadas exclusivamente para o armazenamento de aminoácidos no endosperma ou tecidos funcionalmente relacionados. A síntese ocorre em determinados estágios da ontogênese, ativada pela síntese massiva de RNAs mensageiros, especialmente durante a maturação da semente, como ocorre em *Ilex paraguariensis*. As proteínas de armazenamento em vegetais superiores consiste de uma mistura de diferentes polipeptídeos que normalmente são combinados em complexos de alto peso molecular.

Bewley (1997) afirma que a síntese de proteínas de reserva, sua transformação em corpos protéicos em uma conformação que seja com-

petente para translocação e finalmente seu transporte ao sítio onde será acumulada, ocorrem de maneira muito complexa sendo que mesmo nos sistemas mais bem estudados, algumas incertezas permanecem a respeito do processo.

Raghavan (1997), quanto a origem, cita que as proteínas de reserva são sintetizadas e depositadas em vacúolos sob forma de corpos protéicos, sendo bem evidente o acúmulo de proteínas pouco depois do endosperma se tornar celular, aumentando logo após as dimensões e número dos corpos protéicos.

Segundo Chen *et al.* (1998), a síntese de proteínas é proporcionada por ativação gênica, como observado em soja, sendo seu produto transportado para o tonoplasto sob forma de vesículas, derivadas do aparelho de Golgi. A fusão das vesículas com o tonoplasto descarrega as proteínas de reserva dentro do lume do vacúolo, resultando na formação de discretos corpos protéicos. Estas proteínas contêm regiões eletro-transparentes e regiões eletro-densas que depositam fitina, constituindo globóides, com ou sem pequenos cristais dispersas na matriz proteinácea. Esta diferença encontrada em soja, quanto a morfologia dos cristais, foi observada na região micropilar de sementes da espécie em estudo, tanto no suspensor como no endosperma adjacente a este, variando desde pequenos grânulos que polarizam quando observados sob Microscópio de Polarização, até cristais maiores, poliédricos.

Segundo Hara-Nishimura, *et al.* (1998) vegetais superiores apresentam dois tipos de vacúolos, um deles que acumula proteínas de reserva, se desenvolvendo em órgãos de reserva, como sementes e o outro que contém várias enzimas líticas, se desenvolvendo em órgãos vegetativos. Em cevada, as proteínas são sintetizadas no RER, armazenadas e transportados aos respectivos vacúolos via aparelho de Golgi (vesículas densas). A maturação das proteínas de reserva ocorre em vacúolos de reservas protéicas, através da ação de uma enzima vacuolar de processamento.

Miller & Anderson (1999) mencionam que embora seja conhecido que alguns mecanismos de tráfego de proteínas são conservadores entre todos os eucariotas, as plantas parecem possuir rotas particulares e altamente complexas de sítios vacuolares. Um pressuposto aceito de forma generalizada é de que as proteínas são exportadas do retículo endoplasmático e passam via Golgi ao vacúolo, e, que em sementes, as

proteínas de reserva se agregam ao retículo endoplasmático e formam corpos protéicos densos que fundem-se diretamente ao vacúolo sem passar através do Golgi.

A síntese de reservas em sementes de *Ilex paraguariensis* aparentemente segue estas rotas mencionadas, originando inicialmente, no endosperma, um vacuoma nas células da região micropilar, contendo matriz protéica, que após transformações originam grânulos, corpúsculos, espículas e cristais poliédricos protéicos. Em zonas afastadas da micrópila, o acúmulo de reservas protéicas se dá através da formação de vesículas originárias do retículo endoplasmático, acrescido de vesículas derivadas do Golgi. O tráfego de proteína é mantido através de endo- e exocitoses com formação de vesículas junto à plasmalema, estruturas estas provavelmente constituídas de "vesículas revestidas de clatrina", conforme sugerem Miller & Anderson (1999). Esta síntese ocorre na fase final da endospermogênese e modificações nas reservas são observadas quando o fruto está maduro e o embrião encontra-se em estágio cordiforme a cordiforme-tardio.

Por outro lado, após a fecundação ter ocorrido em erva-mate, a ocorrência de vacúolos contendo corpos protéicos também foi constatada no tecido do mesocarpo (parênquima do ovário), tanto em M.E.V. como em Microscopia Óptica. Estas estruturas em M.E.V. apresentam a mesma morfologia encontrada por Chen *et al.*(1998), para os corpos protéicos. A ocorrência de corpos protéicos na parede carpelar foi apenas referida para as fases iniciais da fecundação, devido ao fato de trabalharmos apenas com os pirenos, facilitando a inclusão e corte do material. Aparentemente, o padrão de acúmulo de reserva na parede carpelar deve seguir o modelo do endosperma e embrião.

4.4.1.2 Lipídios

Ashton (1976) encontrou lipídios presentes no globóide, e substâncias desconhecidas no cristalóide, que se coram de verde na presença de Azul de Toluidina. Estas substâncias também são encontradas no tegumento de *Ilex*.

Owens *et al.* (1992, 1997) referem-se a abundância de corpos lipídicos nos embriões e megagametófitos de *Pseudotsuga menziesii* e *Agathis australis*, que observadas em M.E.V. se acumulam sob forma de

roseta ao redor dos grandes corpos protéicos. O mesmo foi observado na espécie em estudo.

Stone & Gifford (1997) citam que as primeiras substâncias de reserva encontradas em sementes de *Pinus taeda*, são lipídios e proteínas.

Sitte *et al.* (1998) mencionam que os lipídios de reservas que são utilizados na síntese e troca de energia, fazem parte dos lipídios e óleos apolares, conseqüentemente insolúveis em água. São observáveis ao microscópio, sob forma de pequenas gotas de óleo (oleossomos ou plastoglobulos) encontrados no citoplasma ou em plastídios e por serem insolúveis em água são osmoticamente inativos, não afetando células nem organelas. Pelo efeito hidrofóbico, os oleossomos assumem aspecto arredondado. Existem também os lipídios membranáceos, cuja molécula contém substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas e é formado por uma dupla membrana lipídica. Tais moléculas são denominadas de anfipolares e não são utilizadas como reservas nem para fornecer energia.

Em *Ilex paraguariensis* as reservas lipídicas são encontradas em todas as células da semente, sendo seu acúmulo mais acentuado no endosperma nas fases mais avançadas da embriogênese final (a partir de embrião cordiforme). Não foi evidenciada a origem precisa destes corpos lipídicos, porém Prego *et al.* (1998), analisando *Chenopodium quinoa* demonstra a formação de corpos protéicos cercados por lipídios, semelhante ao encontrado em erva-mate, sem informar a origem dos mesmos. Bethke *et al.* estudando grãos de aleurona em cereais, afirma que os vacúolos que armazenam proteínas também são o sítio de armazenamento de lipídios neutros. Segundo estes autores, é amplamente aceito que os triglicerídios são sintetizados nas membranas do retículo endoplasmático e depositados em oleossomos, sendo formados entre as membranas do retículo endoplasmático liso. Entretanto, há uma divergência entre diferentes autores de como os oleossomos se tornam associados aos vacúolos protéicos. O modelo tradicional sugere que os oleossomos são liberados na superfície do retículo endoplasmático e se fusionam com a membrana vacuolar. Por outro lado, estes autores sugerem uma nova interpretação, na qual os oleossomos não se desprendem do retículo endoplasmático, mas sim que a membrana do retículo endoplasmático sintetiza lipídios neutros, bem como serve de sítio de acúmulo de proteínas de reserva.

Em erva-mate os corpos lipídicos aparentemente não apresentam membrana, porém problemas de fixação do material podem mascarar sua visualização. Fica evidente a presença de lipídios na margem da célula, cuja origem pode estar associada ao retículo endoplasmático distribuído nesta região, e, lipídios associados aos vacúolos protéicos em formação, sendo a origem destes últimos muito provavelmente derivada da membrana deste vacúolo, formando inclusive, a mesma figura em roseta identificada na espécie em estudo. A mesma dificuldade para observação da presença ou não de membrana envolvendo os lipídios foi constatado por Jacobsen *et al.* (1971), analisando a estrutura e composição de grãos de aleurona em cevada, circundados integralmente por esferossomos.

Outro estudo, bastante recente, realizado por Serrato-Valenti *et al.* (1998), em endosperma de *Phacelia tanacetifolia*, demonstra em M.E.V. a formação de corpos protéicos com globóides na margem destas estruturas, sendo englobados pela massa protéica interna. Como o processamento utilizado pelos autores não preserva lipídios, a interpretação pode ter sido equivocada, pois a superfície “papilosa” apresentada em suas eletromicrografias, bem podem estar demonstrando o início da síntese lipídica exteriorizada do tonoplasto do corpo protéico. As figuras descritas como digestão de proteína, mais se assemelham a “moldes” dos lipídios extraídos durante o processamento, deixando clara a formação também em roseta deste mesmo tipo de reserva.

4.4.1.3 Amido

Em sementes de *Ilex paraguariensis*, as primeiras substâncias de reserva a serem observadas, no zigoto e durante a embriogênese inicial, são polissacarídeos do tipo amido. Em fases mais avançadas da endospermogênese, quando este tecido é composto por dezesseis ou mais células e apresenta-se diferenciado em três zonas com características histológicas distintas, apenas na região micropilar são observados polissacarídeos do tipo amido. Nas regiões mediana e calazal do endosperma não se observa síntese de reservas.

Esta substância serve como fonte de energia em fases específicas, pois apresenta baixo peso molecular, sendo facilmente degradada, transformada e translocada, para utilização imediata.

Owens *et al.* (1997), mencionam o aparecimento de amido de reserva, como um produto armazenado por curto espaço de tempo, em *Agathis australis*, em fases avançadas dos desenvolvimento embrionário e em células adjacentes do megagametófito colapsado, porém, afirma que sem dúvida precursores solúveis estão presentes nas fases iniciais, sem identificação histoquímica.

Kapil & Bhatnagar (1981), referindo-se a diversas espécies vegetais, citadas por diversos autores, confirmam a presença de quantidades representativas de amido na oosfera, a ser utilizado no momento da fecundação e nas fases iniciais de desenvolvimento do embrião. Somente após a fase de embrião globular a piriforme, teria início a síntese de reservas lipo-protéicas.

Ao longo do desenvolvimento este tipo de reserva é substituída por lipídios e proteínas, sendo as proteínas convertidas a aminoácidos e os lipídios convertidos a carboidratos solúveis, suprindo integralmente as necessidades energéticas do embrião, como observado por Stone & Gifford (1997), em sementes *Pinus taeda*, durante a germinação e desenvolvimento da plântula jovem.

Este comportamento das reservas, apresentando amido nas fases iniciais e reservas lipo-protéicas em fases mais avançadas é similar ao encontrado em erva-mate.

4.4.2 Utilização das reservas

Segundo Guillermond (1908) a degradação de corpos protéicos provavelmente se inicia dentro da massa protéica ou na sua periferia.

Rost (1972) cita que durante a germinação de *Setaria lutescens* (Gramineae) ocorre degradação, usualmente precedida por entumescimento e coalescência dos corpos protéicos, sendo que a matriz protéica se fraciona internamente formando padrão irregular que geralmente não parte da periferia dos corpos protéicos. Após a digestão completa dos corpos protéicos, só restam os vacúolos. Descreve ainda que embriões dormentes não apresentam quebra de lipídios ou outras substâncias de reserva, nem apresentam formação de poliribossomos e outras organelas como leucoplastos e glioxissomos. Portanto, a causa da dormência está mais relacionada a processos que envolvem a síntese *de novo* de novas proteínas e não ao controle de enzimas já existentes.

Bewley & Black (1978), afirmam que a utilização das reservas do endosperma é controlada pelo embrião que secreta fatores controladores como giberelinas, que são sintetizadas pelo próprio embrião, antes da mobilização das reservas do endosperma, sendo de grande importância como suprimento de compostos nitrogenados e minerais, necessários ao estabelecimento de plântulas. Estes mesmos autores se referem a degradação das proteínas em cotilédones de *Lupinus albus* como ocorrendo seqüencialmente, obedecendo um gradiente que vai da epiderme ao interior do cotilédone, sendo que desta maneira, várias fases de degradação são passíveis de serem observadas em uma mesma seção. A primeira fase da digestão ocorre com as proteínas hidratadas, observando-se que as mesmas **coalescem**. Após ocorre **vacuolação** e **fragmentação** das proteínas nos corpos protéicos sendo que na fase final de degradação apenas restam fragmentos de corpos protéicos. Este gradiente também foi encontrado em *Agathis australis* entre a parte externa e interna do megagametófito (Owens *et al.*, 1997) e em *Myrsine laetevirens* entre a camada interna e externa do endosperma (Otegui *et al.*, 1998).

Em erva-mate, também foram observados dois gradientes morfológicos nas reservas do endosperma. Um deles, no sentido micrúpila-calaza, sendo que as modificações eram perceptíveis inicialmente no polo micropilar (presença de substâncias vináceas – proteína). Outro, no sentido tegumento-embrião, sendo caracterizado por nítidas diferenças morfológicas nas reservas deste tecido, mais especificamente, uma menor concentração de reservas constituídas na periferia do endosperma e corpos protéicos definidos junto à cavidade digestora.

Schulz & Jensen (1969) citam para *Capsela bursa-pastori*, que o endosperma se desenvolve até depois da fase embrião cordiforme e provavelmente não contribui significativamente na sua nutrição nesta fase. Em *Ilex paraguariensis* a função nutrícia do endosperma, aparentemente, inicia após a fase de embrião globular, quando é observada especialização deste tecido. Em fases anteriores, a nutrição se realiza via suspensor pois o endosperma ainda não está apto, ou seja, não possui as substâncias necessárias à função que irá desempenhar. As substâncias utilizadas para o desenvolvimento embrionário, nesta fase, são translocadas do tegumento e células adjacentes e/ou sintetizadas pelo

próprio suspensor. Isto ficou evidenciado pela presença de substâncias de reserva encontradas em células do tegumento e do suspensor.

Dimitrieva *et al.* (1984) referem-se às transformações que ocorrem nas proteínas durante a germinação como sendo divididas em três estágios: mobilização que inclui processos que precedem a decomposição das proteínas, hidrólise das proteínas a aminoácidos e peptídeos de baixos pesos moleculares e ao transporte do produto desta decomposição dos tecidos de reserva ao embrião em desenvolvimento e sua utilização na síntese de novas estruturas e enzimas protéicas da plântula em desenvolvimento. Segundo os mesmos autores, as globulinas representam as proteínas de reserva de sementes de dicotiledôneas enquanto que as albuminas são, predominantemente, enzimas protéicas, sendo estabelecido que as globulinas satisfazem as características principais de proteínas de reserva por serem dominantes sobre os outros grupos de proteínas em tecidos de reserva em sementes, serem rapidamente consumidas durante a germinação e estarem localizadas em grãos de aleurona.

Alvarez & Guerra (1985) e Mohr & Schopfer (1995) observaram que as proteínas de reserva são mobilizadas durante a germinação. Estas proteínas são encontradas na maioria das vezes em corpos protéicos. Durante a germinação eles incham quando a semente se hidrata durante a embebição. Subseqüentemente as proteínas são degradadas pela atividade de endo- e exopeptidases. Os produtos da lise protéica são utilizados nos tecidos de origem ou translocados para outras regiões da planta em desenvolvimento. A degradação das proteínas de reserva pode ser observada em M.E.T. desde que estejam hidrolizadas, os corpos protéicos ficam mais eletro-opacos, fusionam e finalmente formam um grande vacúolo central.

Serrato-Valenti *et al.* (1998) analisando sementes de *Phacelia tanacetifolia*, caracteriza a dinâmica de formação e utilização dos corpos protéicos em três estágios. Em sementes em desenvolvimento, os corpos protéicos são de pequenas dimensões e espalhados pelo citoplasma contendo grãos de amido; em sementes maduras, os corpos protéicos constituíam a reserva predominante, contendo globóides no seu interior; em sementes em fase de germinação, os corpos protéicos se apresentam uniformes, com cavitações e formação de cristais prismáticos.

Bethke *et al.* (1998), analisam a transformação do compartimento de reserva protéica em organela lítica, considerando as mudanças na estrutura do vacúolo de reserva durante a mobilização e o transporte através do tonoplasto. Os vacúolos de reserva protéica, que durante meses ou anos foram depósitos de nutrientes, tornam-se líticos, rapidamente hidrolisando os polímeros armazenados no seu lume, muitas vezes com o uso de enzimas preexistentes. A mobilização destas reservas é acompanhada por mudanças drásticas na estrutura desta organela, como coalescência dos menores vacúolos de reserva protéica e metabolização dos lipídios armazenados em oleossomos, via ciclo do glioxilato, produzindo sucrose e outros açúcares. Esta propriedade de produzir açúcares às expensas de lipídios armazenados, torna este tecido independente de outros tecidos da semente.

Estes mesmos autores, afirmam que a célula de aleurona de cereais é um excelente modelo para o estudo da ação de reguladores de crescimento em plantas (ácido giberélico – GA e ácido abscísico – ABA), sendo que podemos estender esta afirmativa incluindo os vacúolos protéicos em geral. Muito pouco é conhecido sobre a regulação hormonal nestas organelas. Os receptores GA e ABA e os transportadores utilizados para a exportação das reservas do vacúolo para o citoplasma, ainda não foram identificados e caracterizados. Além disso, as rotas de transdução dos sinais estão sendo inicialmente descritas (Bethke *et al.*, 1997, 1998).

Em *Ilex paraguariensis* podemos resumir os eventos relacionados com o acúmulo e degradação dos corpos protéicos através das seguinte dinâmica morfológica: Fase 1 – formação de vesículas de membrana simples (originadas do RE e do Golgi) que se fundem formando vacúolos; Fase 2 – deposição de proteína amorfa no seu interior; Fase 3 – surgimento de adensamentos protéicos na massa fundamental (globóides ou pró-globóides); Fase 4 – formação de lipídios ao longo de toda a margem do vacúolo protéico (oleossomos?); Fase 5 – início da cavitação interna do vacúolo, evidenciando sinais de reutilização das reservas; Fase 6 – fragmentação do conteúdo protéico; Fase 7 – adensamento do material fragmentado com visualização do vacúolo óptica- ou eletro-transparentemente, com início da degradação dos lipídios; Fase 8 – vacúolo com pouco material adensado no seu interior e proteína identificada no citoplasma como fragmentos ou adensamentos, sem qualquer sinal de

lipídios contornando a estrutura; Fase 9 – vacúolo sem qualquer material protéico individualizado no seu interior, sendo constituído apenas por uma matriz solúvel. Dependendo a região analisada e a fase de desenvolvimento do embrião ou do endosperma, podemos perceber processos de síntese de substâncias de reserva ou degradação das mesmas. Um fato a considerar é que os primeiros sinais de translocação de proteínas são evidentes no suspensor, enquanto que no endosperma, suas células estão em processo de síntese de reservas. Esta diferença temporal estabelece uma fase em que o embrião muito jovem, provavelmente, utiliza as reservas protéicas e lipídicas formadas na parede carpelar e nos tecidos esporofítico circundantes, drenando energia para seus processos de divisão celular e formação do futuro esporófito. Mais tarde, esta ligação com o suspensor é rompida, através de Morte Celular Programada, passando a agir sobre o endosperma que atingiu o máximo de sua diferenciação, passando agora a ser o responsável pela nutrição das fases finais da formação do embrião.

4.5 EMBRIOGÊNESE

O embrião constitui o mais importante componente da semente e se desenvolve após a fecundação. Em geral existem duas fases no desenvolvimento embrionário (proembrião e embrião propriamente dito) e existe uma transição gradual do estágio heterotrófico (zigoto) ao estágio de relativa autotrofia (embrião maduro). Poucos são os conhecimentos relativos às necessidades nutricionais do embrião para sua diferenciação celular (Malik *et al.*, 1976).

Barret (1962) define que o desenvolvimento embrionário pode, por conveniência, ser dividido em 2 fases distintas, a **embriogênese inicial**, que culmina na fase em que o fruto está maduro e o embrião em estágio cordiforme e a **embriogênese tardia**, se estendendo até a fase de embrião maduro, em forma de torpedo, antes da germinação. Adotamos, neste trabalho, a terminologia deste autor, com algumas modificações. Caracterizamos como embriogênese inicial as fases do desenvolvimento embrionário que vão desde a fecundação até a fase de proembrião octante. Denominamos de **embriogênese final** (e não **tardia**), a fase do desenvolvimento embrionário que abrange desde o embrião piriforme até a fase de embrião maduro, em forma de torpedo, antes da germinação. As fases posteriores a embrião cordiforme tardio somente são pas-

síveis de serem observadas se os pirenos forem colocados em condições favoráveis para seu desenvolvimento e germinação.

Barret (1962) em *Ilex opaca* e Owens *et al.* (1995) em *Aghatis australis* utilizaram parâmetros temporais para relatarem as diversas fases de desenvolvimento embrionário durante a embriogênese.

Em *Ilex paraguariensis*, inicialmente foram tomadas medidas de comprimento e largura, desde botões florais, flores em antese e frutos nos vários estágios de maturação. Tentou-se estabelecer uma relação destas medidas com as fases de desenvolvimento interno (dados histológicos), porém não foram considerados caracteres passíveis de serem comparados, como foi realizado com sucesso em anteras desta mesma espécie por Santos (1993, 1995). A partir daí, foram utilizados dados temporais, ou seja, as datas de coletas, como referência para relatar as fases acima citadas. Após análise durante três anos consecutivos, em uma mesma população, confirmou-se a validade de adotar esta metodologia. A variabilidade destes dados, entre populações, é bem maior, sendo que talvez os dados de fenologia descritos para a população da FZB-RS não se adequem perfeitamente, por exemplo, para as populações de Venâncio Aires, pois no mês de março de 1997, enquanto as árvores da FZB-RS não mais possuíam frutos, as de Venâncio Aires os apresentavam em grande quantidade e em diferentes fases de maturação. Apesar disso, de um modo geral, o quadro fenológico parece representar o comportamento da espécie.

4.5.1 Embriogênese inicial

4.5.1.1 Zigoto

O zigoto é resultado da fusão de um dos gametas masculinos com a oosfera, dando início a uma nova geração, por seqüência de mitoses sucessivas, que resultam, acompanhadas de diferenciação de suas células, um embrião esporofítico.

Herr (1961), observou em seis espécies do subgênero *Euilex* e *Prinos* e Raghavan (1997) citando genericamente as Angiospermas, que a divisão do núcleo do endosperma primário precede a do zigoto. Nos dois casos, os intervalos de tempo entre um evento e outro são diferentes, mas nota-se que existe um período em que o embrião esporofítico permanece, aparentemente, aguardando o desenvolvimento do embrião xe-

nofítico que em determinada fase lhe servirá como fonte de nutrição. Maheshwari (1983) relata que o período de latência do zigoto varia nas diferentes espécies e pode ser dependente das condições ambientais. Geralmente o núcleo primário do endosperma se divide antes do zigoto. Um caso de dormência do zigoto foi descrito por Heiman-Winawer (1919), em *Colchium autumnale*, onde a fecundação ocorre no outono, sendo que logo após inicia a formação do endosperma, porém, o zigoto permanece dormente por um período de 4 a 5 meses, durante o inverno.

Este fato, nos condicionou a interpretar que o desenvolvimento lento do zigoto constituiria uma dormência nesta fase inicial da embriogênese de *Ilex paraguariensis*. Com a evolução dos conhecimentos e estudos mais recentes, foi possível constatar que este comportamento é freqüente nas Angiospermas, sendo que a dissincronia entre o embrião esporofítico e o xenofítico, não é caracterizado como uma dormência mas sim, como plantas distintas que conservam sua individualidade durante o desenvolvimento. A defasagem temporal entre estas duas plantas e o estágio mais retardado do zigoto, representaria uma relativa quiescência, presumivelmente um estágio de reorganização metabólica, como sugere Wardlaw (1955). As modificações no zigoto, visíveis em M.O., identificadas pelo seu alongamento e maiores dimensões, somente ocorrem quando o endosperma já apresenta 8 ou mais células, da mesma forma como evidenciou Barret (1962) em *Ilex opaca*.

4.5.1.2 Proembrião com duas células

Segundo Johansen (1950), o termo proembrião é utilizado para designar um filamento de até 16 células que constituem a fase inicial da embriogênese. Souéges (1936), caracteriza o proembrião como um conjunto de células que possuem simetria axial característica da oosfera e inclui estágios da embriogênese anteriores ao aparecimento dos primórdios cotiledonares. Adotamos neste trabalho o termo proembrião, para caracterizar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário até o proembrião pós-octante.

O zigoto de *Ilex paraguariensis* se divide, formando a célula basal e a célula apical, enquanto que o endosperma apresenta oito ou mais células. Em *Ilex opaca* (Barret, 1962), o endosperma celular se divide rapidamente, estando em estágio avançado de desenvolvimento enquanto

o zigoto permanece indiviso, iniciando suas divisões 10 a 12 dias após a polinização.

Estas duas células resultantes apresentam um dimorfismo característico, sendo a basal mais alongada, com estreitamento no polo micropilar. Estas células também diferem quando analisarmos sua ultraestrutura, sendo a apical mais eletrodensa que a basal, contendo maior quantidade de amido, como mencionado genericamente por Natesh & Rau (1984).

4.5.1.3 Proembrião linear com três células

O segundo ciclo de divisão dá origem ao proembrião de três células, seguindo o padrão de embrionomia Tipo Cariofiláceo segundo Johansen (1950), permanecendo a célula basal sem se dividir.

Este mesmo padrão na embriogênese inicial foi descrito por Barret (1962) para *Ilex opaca* e por Copeland (1963) para *Ilex aquifolium*.

Newcomb & Fowke (1974) caracterizam a célula basal do proembrião com três células, em *Stellaria media*, como maior que as demais, contendo grandes plastídios, microcorpos e invaginações (protrusões) do tipo de células de transferência, na extremidade micropilar, ausentes na oosfera ou zigoto. Estas invaginações de parede também são relatadas por Natesh & Rau (1984) em *Capsella bursa-pastori*. Estas paredes transfusoras são importantes para a translocação de vários metabólitos, facilitando e aumentando a superfície de transporte de assimilados. Estas características também estão presentes em *Ilex paraguariensis*, sendo que em especial a presença de plasmodesmos apenas entre as paredes terminais foi igualmente relatado por Newcomb & Fowke (1974).

4.5.1.4 Proembrião linear com cinco células

A célula terminal (*ca*) do proembrião de *Ilex paraguariensis* sofre divisões transversais para formar células designadas por *ci*, *m*, *l* e *l'*, de modo similar ao descrito para *Sagina procumbens* por Johansen (1950).

As substâncias vináceas, já relatadas para esta fase, sugerem um gradiente de utilização de substâncias que se encontram no rudimento seminal (tegumento) e são utilizadas na embriogênese inicial, sendo transportadas via suspensor como sugere Nagl (1976).

4.5.1.5 Proembrião linear com sete células

As divisões que antecedem esta fase, são as que caracterizam o padrão de formação do embrião. No caso da erva-mate, as divisões subseqüentes a fase de cinco células em geral seguiram o padrão transversal, com ocorrência eventual de divisão longitudinal de uma célula do suspensor.

Maheshwari (1983) e Johansen (1950), analisando *Sagina procumbens* divergem quanto a descrição do padrão de divisão das células do suspensor, inclusive envolvendo a célula terminal. Apesar disso, o padrão de classificação do tipo de embrionomia é idêntico, portanto, realmente as primeiras divisões do proembrião são as mais significativas e decisivas para tal classificação.

4.5.1.6 Proembrião quadrante, Proembrião octante e Proembrião pós-octante

Na família Aquifoliaceae, estas fases proembrionárias apenas foram descritas por Barret (1962) em *Ilex opaca*, sendo similar ao encontrado em *Ilex paraguariensis*. O comportamento das divisões celulares segue o padrão descrito de forma geral em toda a literatura (Natesh & Rau, 1984).

4.5.2 Embriogênese final

4.5.2.1 Embrião piriforme

Esta classificação, dentro da literatura clássica de embriogênese, não é usualmente utilizada. Este termo foi empregado apropriadamente por Barret (1962), em *Ilex opaca*, para designar embriões em fase de pós-octante, que já sofreram divisões anticlinais na camada externa de células, diferenciando assim a protoderme e o meristema fundamental, sendo que, após estas transformações, este assume a forma de pêra. Observamos durante a seqüência ontogênica de embriões de *Ilex paraguariensis*, esta mesma fase, o que nos levou a adotar esta nomenclatura.

Nesta fase da embriogênese, observa-se o acúmulo das reservas lipo-protéicas relatadas em itens anteriores, a semelhança do descrito por Barret (1962). Além disso, inicia-se a formação da cavidade digestora abrigando o desenvolvimento do embrião. Esta cavidade recebeu a

denominação de cavidade de corrosão por Singh & Johri (1972) e por Hoff (1987). A função desta cavidade é discutível, sendo que uma das hipóteses é que esta ocorra somente para abrigar o embrião, oferecendo espaço para que o mesmo se desenvolva, pois a degradação inicial ocorre apenas nas paredes, sendo que o conteúdo celular inicialmente não é afetado pelo processo. Além disso, a função nutrícia do endosperma ainda não foi desencadeada, sendo esta é suprida pelo suspensor que se apresenta íntegro nesta fase.

4.5.2.2 Embrião globular

Esta fase se caracteriza pela morfologia arredondada assumida pelo embrião, com diferenciação da protoderme e do meristema fundamental, ainda sem emergência dos cotilédones. É importante salientar a especialização das células do embrião xenofítico (endosperma), caracterizada pela vacuolação destas e acúmulo de substâncias protéicas. Este tecido se prepara para desempenhar funções nutrícias, até então realizadas pelo suspensor. O suspensor atua não só como dreno para a passagem de nutrientes mas também como local de síntese e translocação de hormônios, entre outras substâncias. Esta afirmativa se confirma se observarmos plasmodesmos nas paredes terminais (transversal internas e externas) e ausência dos mesmos nas paredes laterais (anticlinais) das células que compõe o suspensor.

Segundo Chamberlin & Horner (1993), durante o estágio globular tardio, embriões de soja formam uma cutícula sobre sua superfície sendo esta totalmente ausente no suspensor. Esta cutícula não é distinta da observada revestindo o endotélio desta mesma espécie sendo que deve ter a mesma função de impedir a troca de solutos. A cuticularização do embrião e sua falta de contato com o endosperma sugerem que embrião e cotilédones não atuem no aporte de nutrientes. O embrião recebe os nutrientes da extremidade micropilar do rudimento seminal, via suspensor. Em *Ilex paraguariensis* deve seguir o mesmo padrão descrito para soja quanto a sua nutrição, durante a embriogênese inicial, embora constatamos uma camada de cutícula envolvendo o endosperma, no limite com o epitélio do tegumento. Neste caso, a associação embrião/endosperma, ao contrário, é íntima.

As reservas do endosperma iniciam a ser utilizadas pelo embrião de erva-mate, a partir desta fase do desenvolvimento. As alterações so-

fridas pelas células do endosperma e do embrião estão detalhadas em itens anteriores.

Losner-Goshen *et al.* (1998), citam o envolvimento de certas enzimas pectolíticas na penetração intrusiva de células de haustórios de *Orobanch*e, em raízes hospedeiras. Ocorre, na área infectada pelo parasita, a secreção de enzimas capazes de degradar pectinas, que irão destruir a lamela média, permitindo, desta maneira, a penetração do haustório entre as células do hospedeiro. Bewley (1997) refere-se a sementes de aipo (*Apium graveolens*) e pimenta (*Capsicum annum*), como possuindo endosperma que é degradado em resposta a giberelinas, sendo que ocorre uma separação e não degradação das paredes das células do endosperma durante esta fase, sugerindo que isto ocorra devido a ação de pectinases. Cole *et al.* (1998) citam que a desorganização das paredes celulares de plantas infestadas por fungos patogênicos é realizada por enzimas que degradam a parede celular. Estas podem ser produzidas pelo fungo mas, usualmente, são induzidas pelo substrato. Estas enzimas de degradação incluem celulasas, endo- e exo-polygalacturonases, endo- e exo-pectinolisases e pectino metilesterases. Modificações estruturais, tais como entumescimento da parede celular e dissolução da lamela média são considerados como sendo indicativos da ação de enzimas que degradam pectinas. No caso de *Ilex paraguariensis* o embrião esporofítico estaria induzindo e secretando estas substâncias de degradação agindo como um "parasita", abrindo espaço para seu desenvolvimento no interior do embrião xenofítico.

Analisando embrião e suspensor, fica evidente a presença da hipófise, possível de ser caracterizada desde a fase anterior da embriogênese. Segundo Johri (1984), as características ultraestruturais desta célula, revelam que a mesma parece fazer parte do suspensor e não das células que compõem o embrião. Raghavan (1986), se refere a hipófise *h* como sendo uma célula curiosa e interessante pertencente ao suspensor, localizada próxima ao embrião e que se divide transversalmente para formar duas outras células, *h* e *h'*, cujas descendentes contribuirão na formação do córtex da raiz, coifa e epiderme da raiz no embrião maduro. Na espécie em estudo, através da análise ontogênica comparativa entre a hipófise, e as células do suspensor e do embrião, inferimos que a mesma se originou de células que fazem parte do embrião e não do suspensor. Esta origem é resultante do processo oblíquo de divi-

são da célula apical do proembrião, que mantém uma célula de formato triangular, em seção longitudinal, após a formação das células-filhas.

Newcomb & Fowke (1973), utilizam uma só descrição para caracterizar os estágios de globular e cordiforme em embriões de *Stellaria media*. Inferem que a morfologia e ultraestrutura neste dois estágios de desenvolvimento embrionário não são significativamente distintas a ponto de serem separados. No caso de *Ilex paraguariensis*, ao contrário, importantes modificações ocorrem nesta fase, tanto no embrião esporofítico quanto no embrião xenofítico, principalmente se considerarmos suas diferenças histológicas e citológicas, bem como na síntese de substâncias de reserva, tornando-o distinto da fase cordiforme, não sendo passíveis de serem caracterizadas através de uma única descrição.

4.5.2.3 Embrião cotiledonar

Esta fase tem como destaque o surgimento dos primórdios cotiledonares e início da degeneração das células do suspensor. Esta nomenclatura foi adotada tendo como base o achatamento da porção distal do proembrião, constituindo o prenúncio de emissão dos cotilédones segundo o conceito de Barret (1972).

Em parte este conceito pode causar dúvidas, pois sabemos que as fases posteriores da embriogênese também apresentam seus cotilédones em crescente desenvolvimento. Esta caracterização visa delimitar uma fase de transição entre os embriões piriformes e os cordiformes.

Na literatura especializada não foram encontradas citações que possibilitassem descrever este tipo de fase em comparação com outras espécies, salvo a classificação adotada para *Ilex opaca* por Barret (*loc.cit.*).

4.5.2.4 Embrião cordiforme e cordiforme tardio

Embriões na fase cordiforme e cordiforme tardio são encontrados quando os frutos estão maduros, apresentando coloração vinácea. O acúmulo de grande quantidade de corpos protéicos em células do endosperma, na região micropilar, adjacente ao suspensor e menor quantidade deste material no próprio suspensor demonstrou a translocação das reservas para o embrião, conforme discutido em itens anteriores e no item suspensor a seguir. Nesta fase ocorrem nítidas modificações

morfofisiológicas observáveis nas células do endosperma da região micropilar, com modificação das reservas para possível utilização pelo embrião, conforme bem documentado na literatura. Apesar disto, Ferreira *et al.* (1991) sugerem que a dormência se instale na fase de frutos brancos, cujos embriões encontram-se em estágio de cordiforme.

4.5.2.5 Embrião torpedo

Esta fase não é normalmente detalhada nos diferentes trabalhos, pois apenas ocorre o acréscimo de células resultantes das divisões celulares que se distribuem por todo o embrião.

O processo germinativo tem início nove meses após o plantio, passando o embrião do estágio cordiforme tardio para torpedo em cerca de quinze dias. Não foram feitos estudos fisiológicos para comprovar o que desencadeia a germinação, mas os dados morfológicos demonstraram que este parece ser um processo rápido, caracterizado pelo alongamento do embrião.

A utilização das reservas do endosperma ocorre em fases anteriores, porém mantendo suas com característica de tecido viável. Observando o comportamento germinativo desta espécie, vimos que algumas sementes germinaram na mesma época (novembro/dezembro), dois anos após semeadas. De modo similar, Barret (1962) observa em *Ilex opaca* que a germinação é cíclica, ocorrendo grande percentagem de embriões germinando no segundo ano após terem sido plantados, e, eventualmente, germinação de embriões no terceiro ano pós-plantio.

4.5.3 Suspensor

O suspensor é formado a partir de sucessivas divisões celulares do zigoto, sendo esta uma estrutura que serve para fornecer nutrientes ao embrião jovem (Yeung & Sussex, 1979), mantendo o embrião numa posição fixa no interior da semente (Yeung & Mainke, 1993), absorvendo e translocando nutrientes do tegumento ao embrião em desenvolvimento (Schulz & Jensen, 1969). Células do suspensor podem iniciar a embriogênese se o embrião é abortivo ou reprimido (Schwartz *et al.*, 1994), sugerindo que o embrião normalmente reprime o potencial de desenvolvimento do suspensor (Yeung & Mainke, 1993).

O suspensor é uma estrutura de vital importância na regulação organogenética das fases da embriogênese inicial (Bhalla *et al.*, 1981). Sussex *et al.* (1973) consideram o embrião de *Phaseolus* como possuindo duas distintas populações de células: o suspensor, com número definido de células e a parte organogênica do embrião, formada por uma população de células que cresce por continuadas divisões mitóticas. A relação entre o suspensor e a parte organogênica do embrião pode ser análoga a relação entre o trofoblasto e a porção organogênica do embrião em mamíferos. O trofoblasto também secreta hormônios importantes na regulação do desenvolvimento do embrião.

Raghavan (1986) considera que durante a embriogênese, estudos de diferenciação funcional apontam o suspensor como possuindo duas importantes vantagens: – ser um órgão efêmero que não faz parte do embrião maduro; – em sua expressão máxima foram observadas adaptações morfológicas e estruturais para funções específicas. Em *Ilex paraguariensis*, ao contrário do que cita este autor, foi possível observar a presença do suspensor mesmo em fases mais avançadas da embriogênese, quando este se encontrava em estágio de torpedo.

O suspensor pode ser unicelular ou multicelular, pequeno ou grande em relação ao embrião, de formato filamentosso, colunar, esférico ou irregular. Suas células podem apresentar uma variedade de modificações estruturais não observadas no embrião. Alguns suspensores produzem haustórios que invadem o endosperma ou tecido da plantamãe. Pode haver uma correlação entre as demandas nutricionais e a morfologia do suspensor. Suspensores grandes prevalecem em sementes com alta demanda nutricional e endosperma limitado nos estágios iniciais de desenvolvimento. As células do suspensor podem também apresentar cromossomos politênicos, ser poliplóides ou multinucleadas (Yeung & Meinke, 1993). Em erva-mate, este se deriva da célula apical do proembrião bicelular. A célula basal permanece sem se dividir, fazendo parte do suspensor até sua degeneração. Este apresenta um número mais ou menos estável de células, identificadas após o proembrião filamentosso atingir sete células, quando ocorre então o início da divisão da célula apical, para formar o proembrião quadrante. Nesta fase o suspensor atingiu seu número máximo de células.

Vários autores evidenciaram especial interesse na citologia e ultra-estrutura do suspensor. A idéia geral é que esta estrutura tem papel

importante na absorção de nutrientes, apesar de não existirem informações sobre a natureza química precisa dos metabólitos (Malik *et al.*, 1976). Este autor realizou estudos bioquímicos no sentido de identificar substâncias, auxiliando desta maneira a determinar as necessidades nutricionais do embrião.

A função do suspensor durante o desenvolvimento do embrião é um exemplo das progressivas modificações durante a embriogênese. A independência progressiva de todo embrião é paralela ao decréscimo de dependência do embrião em relação ao suspensor (Steeves & Sussex, 1989). Estudos experimentais recentes, da função do suspensor, demonstraram claramente que este é metabolicamente ativo, essencial ao transporte de nutrientes e importante fonte de reguladores de crescimento durante estágios iniciais da embriogênese (Yeung & Meinke, 1993).

Em culturas *in vitro* de embriões de *Phaseolus coccineus*, a presença do suspensor estimula o crescimento do embrião propriamente dito. O efeito do suspensor é específico para determinada fase de desenvolvimento. Seu efeito é reduzido quando o embrião atinge o estágio cotiledonar. Estudos ontogenéticos mostram que o suspensor é um órgão muito especializado, tendo sua atividade máxima durante o estágio cordiforme do desenvolvimento embrionário. Neste estágio, a presença do suspensor, tanto conectado ao embrião como, somente próximo a ele, estimula o desenvolvimento deste (Yeung & Sussex, 1979). Este fato pode indicar que o suspensor atua sintetizando e/ou secretando certas substâncias como proteínas, lipídios, hormônios e enzimas (Przybyllok & Nagl, 1977; Buvat, 1989), ou sendo mais eficiente na digestão do meio circundante (Yeung & Sussex, 1979). Bhalla *et al.* (1981) comprovam que o suspensor de embriões cordiformes de *Tropaeolum majus* atingem seu conteúdo máximo de proteínas nesta fase, sendo que este decresce rapidamente em fases posteriores, sendo que o conteúdo de proteínas sempre é maior nas células do suspensor do que nas células do embrião.

Alpi *et al.* (1975) sugerem que o suspensor, durante a embriogênese, atua como sítio de síntese de reguladores de crescimento, necessários ao embrião. Foram testados, em *Phaseolus coccineus*, a presença de giberelinas e auxinas, em suspensor e embriões em estágio cordiforme e embriões cotiledonares. Estes apresentavam suspensor em es-

tágio inicial de degradação. No estágio cordiforme a atividade das giberelinas era 30 vezes maior no suspensor do que no embrião, tendo ocorrido um decréscimo grande nos níveis de giberelinas no suspensor de embriões cotiledonares, enquanto que nos embriões deste estágio, houve um acréscimo de 10 vezes. Isto sugere que o transporte de giberelinas ocorre do suspensor ao embrião e que o suspensor atua durante a embriogênese, como sítio de síntese de reguladores de crescimento, necessários ao embrião. Cionini *et al.* (1976) testaram, em embriões desta mesma espécie, cultivados *in vitro*, a influência do suspensor em diferentes estágios de desenvolvimento e a influência do acréscimo de giberelinas nestas culturas. A retirada do suspensor em embriões jovens fez com que estes reduzissem o desenvolvimento, sendo que em embriões mais desenvolvidos não foi observada a diferença após a retirada. A presença de ácido giberélico em determinadas concentrações pode substituir a função do suspensor em embriões em estágio de coração e início de cotiledonar, enquanto que reduz o crescimento de embriões sem suspensor em estágios mais avançados de desenvolvimento.

Ceccarelli *et al.* (1981), em estudos realizados com suspensor de *Phaseolus coccineus* marcados com C¹⁴, conseguiu comprovar que o suspensor, um sistema de células independentes, sintetiza giberelinas e desempenha um papel ativo na biossíntese de substâncias de crescimento.

Malik *et al.* (1976), a partir dos estudos histoquímicos, acrescentam à vital importância de nutrição do embrião, a função glandular-secretora, como um meio para receber os metabólitos do tecido adjacente e transportá-los ao embrião em desenvolvimento, desde o estágio globular dos mesmos, comprovada através da atividade da fosfatase.

A especialização no suspensor se inicia com o aparecimento de invaginações nas paredes, muitas vezes atribuindo a função de células de transferência, envolvidas no transporte a curtas distâncias, similares às células de transferência de tecidos de condução (Sussex *et al.*, 1973; Schulz & Jensen, 1969).

Em *Phaseolus coccineus* e *Tropaeolum majus* além da característica parietal das células do suspensor, ocorre um acréscimo desproporcional na densidade de ribossomos, polissomos, plastídios, mitocôndrias, dictiosomos e retículo endoplasmático liso, que se desenvolvem até o embrião atingir o estágio cotiledonar. Estas invaginações somadas ao

acréscimo no número de organelas evidenciam a função de transporte de nutrientes nesta estrutura (Yeung & Clutter, 1979; Nagl, 1976). Esta mesma característica foi observada nas paredes das células do suspensor em *Ilex paraguariensis* sendo mais marcante no polo micropilar da célula basal, sugerindo desta maneira, que além de um local de síntese, o suspensor é uma estrutura especializada na translocação de nutrientes, perceptível também, através do fluxo de vesículas do polo micropilar em direção ao embrião.

Em *Stellaria media* a célula basal do suspensor possui parede com projeções no polo micropilar, com a predominância de mitocôndrias na sua proximidade, além da presença de alguns componentes ultraestruturais como microcorpos, plastídios e enovelados de retículo endoplasmático tubular que estão ausentes nas células do embrião (Raghavan, 1986). Estruturas semelhantes também foram encontradas em erva-mate, destacando o papel de transporte desempenhado pelo suspensor, além de um gradiente decrescente de complexidade da célula basal à calazal, como encontrado por Newcomb & Fowke (1974), em *Stellaria media*.

Schulz & Jensen (1969), em *Capsella*, descrevem que as células do suspensor são mais vacuoladas, possuem mais retículo endoplasmático e dictiosomos, mas menos ribossomos e coram menos intensamente para proteínas e ácidos nucléicos do que células do embrião. No estágio cordiforme, as células do suspensor começam a degenerar e gradualmente perdem sua capacidade de corar em reação a proteínas e ácidos nucléicos. Em contrapartida, Malik & Singh (1979) constatam que, citologicamente, as células do suspensor de embriões cordiformes de *Brassica campestris* são metabolicamente muito ativas, com exceção da célula basal, vindo a se desintegrar no estágio de torpedo. Singh *et al.* (1980) sugerem que enzimas hidrolíticas tem função significativa na autólise do suspensor de *Tropaeolum majus*, sendo que estas podem fazer parte de algum processo responsável pela degradação das proteínas. Segundo Nagl (1976a) e Malik & Singh, (1979) esta autólise programada ou autólise polar pode estar associada à utilização do material lítico pelo próprio embrião, pelo menos segundo os dois últimos autores. Gärtner & Nagl (1980) e Raghavan (1986) analisando os índices de atividade bioquímica do suspensor, cita que possivelmente as modificações citoquímicas mais representativas ocorram no suspensor durante a

morte celular programada. Estas iniciam na porção micropilar deste órgão e após se estendem às demais células, como evidenciado também por Nagl (1976) em *Tropaeolum majus*. Este processo de degeneração ocorre em *Ilex paraguariensis* através de MCP, de modo geral iniciando-se na célula basal, em embriões em estágio cordiforme ou cordiforme-tardio, na segunda quinzena do mês de dezembro. Porém, deve ser mencionado que nesta espécie podemos encontrar embriões em estágio de torpedo que apresentam suspensor ativo, indicando que os mesmos teriam superado o período de dormência completando seu desenvolvimento. Desta forma, haveria uma vantagem adaptativa de produção de embriões maduros em diferentes épocas do ano, garantindo o estabelecimento de novas plântulas

4.5.4 Morte celular programada

A MCP é um processo fisiológico de morte celular, envolvido na eliminação seletiva de células (Ellis *et al.*, 1991). Segundo Greenberg (1996) a morte celular em vegetais superiores foi amplamente observada e ocorre de maneira previsível, durante o desenvolvimento e em resposta a infecções patogênicas. Evidências genéticas, bioquímicas e morfológicas sugerem que esta morte celular seja um processo ativo e pode ser definido formalmente como morte celular programada. Em alguns casos esta morte celular pode ser mecanicamente similar a apoptose em células animais desde que as células vegetais que estiverem morrendo, sejam morfológicamente semelhantes a células apoptóticas, formando corpos apoptóticos.

O termo apoptose foi utilizado por Kerr *et al.* (1972) para caracterizar um modo particular de morte celular programada, com características citológicas tais como quebra da hélice de DNA, condensação e fragmentação do núcleo, vesiculação da membrana e condensação do citoplasma. O termo original grego significava a perda de pétalas das flores ou perda de folhas das árvores (Havel & Durzan, 1996). Apoptose é uma forma de morte celular na qual, a célula que está morrendo, participa ativamente na sua própria morte. Sob o aspecto morfológico é caracterizada mais por contração do que por expansão, como é observado na morte de células por necrose (Cotter & Al Rubei, 1995). Os termos morte celular programada e apoptose pouco diferem, razão pela qual ocorreram várias confusões conceituais, levando a argumentações esté-

reis. Por este motivo, alguns laboratórios adotaram os termos mais gerais e menos restritos como morte fisiológica ou morte ativa (Lockshin & Zakeri, 1996).

Alguns autores tais como Durzan (1996) e Cotter & Al Rubei (1995) se referem a apoptose como sendo sinônimo de morte celular programada. Wyllie *et al.* (1980) sugeriram que toda MCP ocorra via apoptose. Ao contrário, Havel & Durzan (1996) e Schwartz *et al.* (1993) consideram morte celular programada como um fenômeno diferente da apoptose. Os primeiros autores referem-se a existência de apoptose durante o desenvolvimento vegetal, na qual o núcleo e protoplasto são removidos de maneira ordenada, comparável com o que ocorre em animais. É uma forma fenotípicamente distinta da deleção controlada de células ou morte celular programada. A apoptose depende da expressão coordenada de genes que regulam o ciclo celular e padrões de apoptose, de maneira que ocorre eliminação irreversível do núcleo e citoplasma. Este fenômeno pode ser desencadeado por fatores de estresse externos, sendo que a combinação de fatores externos e internos predispõem apoptose (Wang *et al.* 1996; Williams & Smith, 1993). Schwartz *et al.* (1993) citam que apoptose é um fenômeno tão amplamente divulgado que alguns autores assumiram que toda morte celular programada ocorre através deste processo. Em alguns casos, as células entram em apoptose, porém os fragmentos do DNA não são detectados, sugerindo um mecanismo de MCP distinto de apoptose. Williams *et al.* (1992) consideram que apesar da morte ativa ocorrer em vários tipos de células de mamíferos via apoptose, MCP e apoptose não são sinônimos.

Durzan (1996) se refere a apoptose como a eliminação de células envolvendo atividade de endonucleases, sendo diferente da necrose que usualmente é definida como a conversão a tecido morto. É um processo ativo de morte celular, que desempenha papel importante nas fases embrionária, juvenil e adulta do desenvolvimento (Cotter & Al-Rubeai, 1995), ocorrendo variação no sinal inicial e eventos metabólicos que induzem apoptose (Rodriguez *et al.*, 1995). Um aumento substancial de Ca^{+2} ocorre nas fases iniciais da apoptose e estes íons parecem ter papel importante como indutores em certos casos de apoptose, ativando proteínas (Cotter & Al Rubei, 1995; Ellis *et al.* 1991).

Este mecanismo pode também eliminar células de primórdios estaminais em flores pistiladas de espécies unissexuais (Dellaporta & Cal-

deron-Urea, 1994). Aparentemente, no aborto de flores está sendo utilizado um só processo de MCP, porém diferentes mecanismos devem estar envolvidos para regulá-lo. Em *Ilex paraguariensis*, após determinada fase de desenvolvimento, as anteras (microesporófilos) das flores pistiladas cessam o desenvolvimento, não produzindo grãos de pólen assim como o ovário permanece rudimentar em flores estaminadas. Este evento não foi comprovado histologicamente mas, certamente, estamos diante de casos de MCP nesta espécie.

Wang *et al.* (1996), sugerem que a MCP também pode ocorrer no tecido transmissor, através do qual o tubo polínico se desenvolve, sendo um processo seletivo, uma vez que o tecido circundante permanece intacto. Este fato é comprovado através da germinação de grãos de pólen incompatíveis, cujos tubos polínicos não progridem no seu desenvolvimento, não acarretando morte das células do tecido transmissor.

Em *Ilex paraguariensis*, observou-se o afastamento entre as células, provavelmente pela ação de enzimas pectolíticas que atuaram sobre a lamela média, mas não foram observados sinais de morte destas células.

A morte celular, com características de apoptose, pode ser induzida em plantas por toxinas, altas concentrações de sais e fatores químicos (Fukuda, 1997), porém, durante a xilogênese, a morte celular programada não segue morfológicamente a ontogenia de apoptose observada em células de mamíferos, devido ao fato de manter as paredes celulares originais intactas (Jones & Dangl, 1996).

Também durante a morfogênese de estruturas como o tapete (Goldberg *et al.* 1993), a coifa (Wang *et al.*, 1996) e folhas lobadas (Kaplan, 1984), processos de morte celular programada desempenham um papel importante na expressão destas morfologias.

Outro relato evidenciando a ocorrência de MCP em plantas foi feito por Bell (1996) no qual este se refere a morte de três células da tétrade de megásporos, em *Marsilea*, como sendo via apoptose, citando que ocorre um gradiente linear, nutricional ou de distribuição de fatores de crescimento, que determinam a viabilidade ao megásporo calazal.

A apoptose, nos vegetais, é caracterizada por picnose do núcleo, perda da membrana nuclear, desaparecimento do nucléolo, fragmentação do núcleo e citoplasma em corpos distintos (Bell, 1996; Havel &

Durzan, 1996; Wang *et al.* 1996). A variação na eliminação de células vegetais é evidente. Pode ocorrer a eliminação total de células durante a ontogenia ou o suicídio gradual com total eliminação do protoplasto e parede. Pode ocorrer a deleção seletiva de organelas como no zigoto, ou a permanência de protoplasto destituído de núcleo pode persistir por 1 ou 2 anos em elementos de tubo crivado (Havel & Durzan, 1996). Em plantas, a morte celular seletiva é necessária ao crescimento e sobrevivência e ocorre localizada ou em larga escala (Barlow, 1982), como ocorre no xilema e na cortiça, sendo que o único exemplo de morte celular programada durante a embriogênese vegetal é a degeneração do suspensor, quando o embrião atinge o estágio cordiforme (Schwartz *et al.*, 1996).

O suspensor é uma estrutura efêmera, com função específica para determinadas fases da embriogênese. A morte de suas células é, geralmente, caracterizada como lise, autólise, degradação, degeneração ou processo histolítico, por diferentes autores. Entretanto, todos estes eventos podem ser diagnosticados como sendo o processo de morte celular programada (MCP).

Nagl (1976) compara a autólise do suspensor em *Phaseolus coccineus* e *Tropaeolum majus*, sendo que o processo ocorre, citologicamente, de maneira distinta em cada uma das espécies. Em *Phaseolus coccineus* ocorre a transformação de plastídios durante a autólise enquanto que em *Tropaeolum majus* a autólise inicia com a transformação das mitocôndrias.

A aparência das células apoptóticas, em animais, está limitada a apenas poucos minutos (Gavrieli *et al.* 1992). Em plantas, a eliminação de células pode ser um processo mais lento que em animais (Wang *et al.* 1996). Em *Ilex paraguariensis* foi utilizado teste de detecção de apoptose para células animais pois o resultado da fragmentação do DNA em animais e plantas, ou seja, quebra da hélice de DNA, condensação e fragmentação do núcleo, certamente é o mesmo. Entretanto, os resultados não foram satisfatórios e não evidenciaram o processo, provavelmente demonstrando que em erva-mate o mesmo ocorra também em um curto espaço de tempo, necessitando secções de fases intermediárias para sua visualização.

No suspensor, a morte celular programada parece ser dependente do estágio de desenvolvimento do embrião (Ellis *et al.*, 1991). Em

Arabidopsis, o suspensor entra em MCP quando o embrião se encontra em estágio de torpedo e não está presente na semente madura (Schwartz *et al.*, 1994). Em *Phaseolus vulgaris* (Gärtner & Nagl, 1980), como em *Ilex paraguariensis*, inicia no polo micropilar quando o embrião se apresenta em estágio de coração. As células desta estrutura parecem receber da célula basal, fatores específicos de desenvolvimento, necessários para processar sinais oriundos do embrião (Ellis *et al.*, 1991).

Existem, em determinados vegetais, organelas especializadas que possuem atividade hidrolítica e são formadas antes dos primeiros sinais de degradação do suspensor. Esta degradação inicia na célula basal, que está mais distal em relação ao embrião se movendo no sentido acrópeto, mostrando um comportamento gradativo e uma polaridade, indicando uma autólise controlada e basipetal do suspensor. (Jones & Dangl, 1996; Nagl, 1976). O mesmo comportamento foi observado em erva-mate. Apesar de Schwartz *et al.* (1997) afirmarem que a função biológica da morte celular programada no suspensor não está clara, a polaridade das células do suspensor e a lise polar destas células mostram que o material encontrado nas células do suspensor maduro é transferido e utilizado pelo embrião (Gärtner & Nagl, 1980; Natesh & Rau, 1984).

Ellis *et al.* (1991) afirmam que a MCP pode ocorrer simplesmente para que haja remoção de células que não são mais necessárias e dar lugar ao embrião em desenvolvimento. Yeung & Meinke (1993) citam a ocorrência de morte celular programada causando deleção do suspensor e células de aleurona que desempenham funções temporárias durante o desenvolvimento.

A presença de plastolissomos (Nagl, 1977) que apresentam atividade a fosfatase ácida, pode ser observada em suspensor de espécies taxonomicamente não relacionadas, sugerindo que a presença destes pode ser uma característica de órgãos embrionários com função nutricional, que estão sofrendo autólise. Esta autólise, em *Phaseolus vulgaris*, inicia no polo micropilar sendo que o retículo endoplasmático se transforma em numerosas vesículas que após se transformam em corpos multivesiculares e vacúolos autofágicos. Estes plastolissomos se transformam em vacúolos autofágicos que englobam estruturas citoplasmáticas tais como retículo endoplasmático, gotas lipídicas e organelas

(Gärtner & Nagl, 1980). Estas estruturas eqüivaleriam aos corpos apoptóticos observados em mamíferos. Em *Ilex paraguariensis* observou-se que este processo sempre inicia na célula basal, se restringindo, por um período relativamente longo de tempo, exclusivamente a esta célula. Apesar das tentativas de identificar e detalhar ultraestruturalmente este processo, não obtivemos sucesso, pois, como já relatado em capítulos anteriores, a presença de certas substâncias, provavelmente cristais protéicos, a partir de uma determinada fase da embriogênese, não nos permitiu obtenção de secções passíveis de análise. Em microscopia óptica, ficou evidente que em erva-mate, estamos também diante de um caso de MCP do suspensor. Este fenômeno fica evidenciado através de características peculiares tais como a presença de substâncias que assumem a coloração esverdeada, reagindo ao corante utilizado, externamente à parede da célula basal, na região micropilar, sendo, provavelmente, compostos fenólicos. A presença de proteínas, que assumem a coloração vinácea, com variadas características morfológicas que supostamente estão representando vários graus de degradação e/ou utilização destas, inicialmente observadas na célula basal, também é uma característica constante em células do suspensor que se encontram ou já passaram pelo processo de MCP. As mesmas características observadas por Gärtner & Nagl (1980), em embriões no início do estágio cotiledonar, ou seja, ruptura do tonoplasto, que leva a ausência de compartimentação e completa autólise da célula, foi observada na espécie em estudo, onde a célula basal se mostrava desidratada, sem preservação do citoplasma. Esta ruptura do tonoplasto gera a formação de vesículas e enovelados de membrana que caracterizam o final da autólise (Nagl, 1976a), muito semelhante ao encontrado no material de *Ilex paraguariensis*. Segundo Gärtner & Nagl (1980), o núcleo é, aparentemente, a última organela a sofrer processo de lise, diferente do que ocorre em espécies animais, onde um dos primeiros sinais de apoptose é a fragmentação do DNA.

No programa ontogênico de enucleação do suspensor de *Picea abies* (Havel & Durzan, 1996), um conjunto de proteossomos degradam as proteínas do núcleo e nucléolo. Os produtos da degradação formam uma complexa mucilagem que é liberada em meio de cultura (Durzan, 1996). Estas substâncias são também observadas em *Ilex paraguariensis* circundando a região micropilar da célula basal do suspensor, porém permaneceram dúvidas quanto a sua origem e composição, se são pro-

teínas ou compostos fenólicos. Chapin & Kedrowski (1983) citam que altas concentrações de compostos fenólicos podem levar à precipitação de proteínas antes da hidrólise destas, reduzindo a absorção dos nutrientes.

Apesar destas similaridades entre MCP em animais e vegetais, alguns aspectos da função e mecanismos de MCP em plantas diferem dos vistos em animais. Nos vegetais, as células não englobam, fagocitando as células mortas adjacentes (Greenberg, 1996). Na ausência de células que fagocitam, o conteúdo da célula vegetal englobado em corpos apoptóticos, representam elementos de nutrição para o tecido adjacente. O mesmo mecanismo que ocorre em animais é conservado em plantas, porém não é claro se todo o processo apoptótico ou somente fases deste ocorrem em plantas. As propriedades funcionais de apoptose ocorrem em plantas e o papel da morte celular programada parece ter a mesma função que em animais, tanto em organismos sadios como doentes (Wang *et al.*, 1996).

Apesar dos mecanismos e sinais que desencadeiam a morte celular programada em animais e plantas não serem conhecidos, na sua totalidade, seria interessante determinar se a MCP surgiu independente no reino vegetal e animal ou se teve um ancestral comum do qual o processo de MCP derivou (Greenberg, 1996).

Conclusões

Os estudos realizados nesta espécie objetivaram descrever as etapas da embriogênese inicial e final, acompanhar e descrever a ontogenia do suspensor e endosperma, no intuito de auxiliar na elucidação das causas do longo período que os embriões *Ilex paraguariensis* necessitam para completar o desenvolvimento e germinar e da baixa taxa de germinabilidade.

Estudos anatômicos realizados em microscopia óptica e eletrônica de varredura e transmissão, esclareceram e/ou demonstraram o seguinte.

- As diversas etapas do processo da fecundação, desde a germinação do grão de pólen até a formação do zigoto, sendo que uma característica peculiar é a não penetração das sinérgides. Este fato aparentemente não interfere na singamia. Os demais eventos seguem os padrões descritos para o gênero.
- A ontogenia do endosperma, sendo que nas fases iniciais foi possível classificá-lo como celular, segundo o sistema EODP.
- Nas fases de endosperma já completamente desenvolvido, ocorre utilização das reservas, observada através de modificações de suas características morfológicas, sendo que estas obedecem um gradiente no sentido micrópila-calaza e tegumento-embrião. Foram descritas nove diferentes fases morfológicas apresentadas pelas reservas do embrião xenofítico durante a síntese, absorção e translocação das mesmas. Seriam necessários estudos químicos específicos para determinar o tipo de reserva protéica. Desta maneira seria possível de-

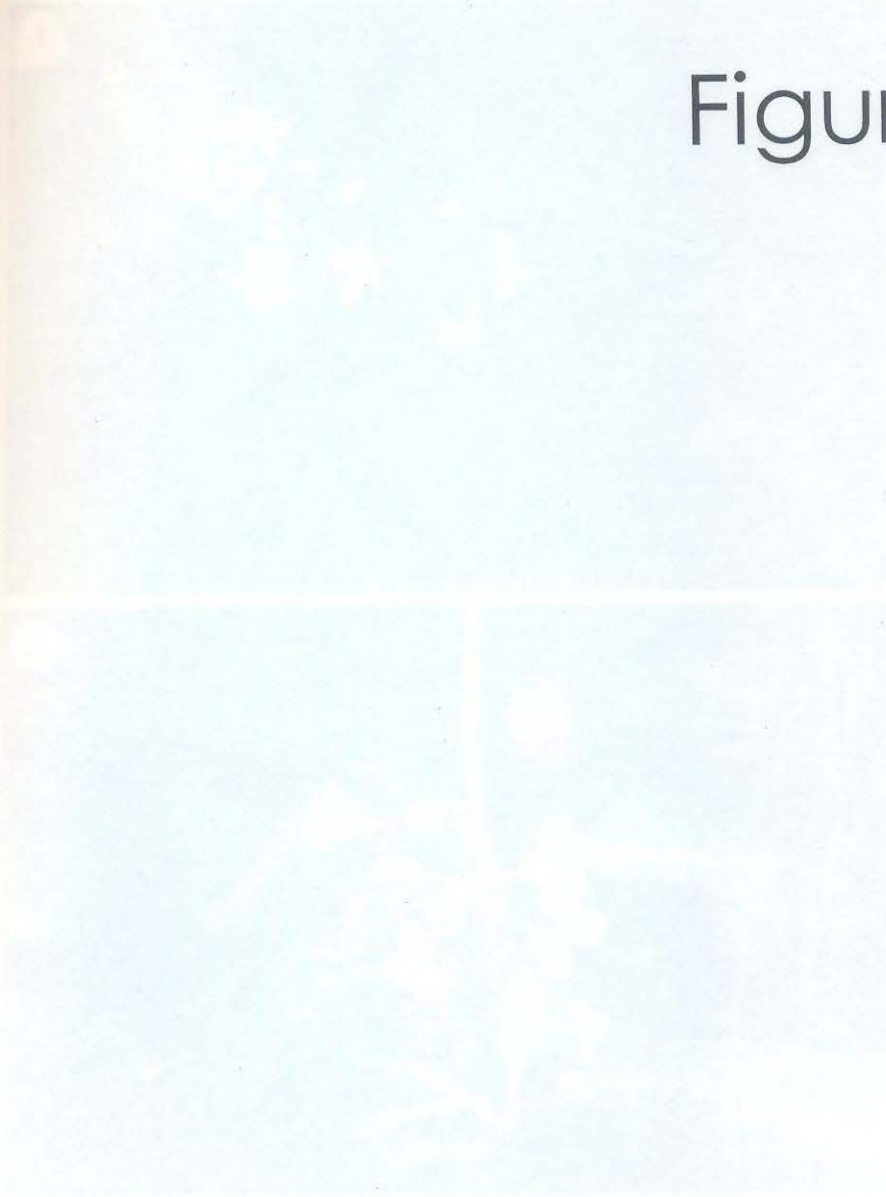
terminar se as variações encontradas são de um único tipo de proteína ou se são várias proteínas que compõe as reservas deste tecido.

- A dissincronia com relação ao desenvolvimento do embrião xenofítico e esporofítico é comum ao gênero, não constituindo fator que possa justificar o lento desenvolvimento dos embriões.
- O suspensor apresenta dois distintos padrões morfológicos durante sua degradação. Observou-se a lise da célula basal e adjacentes via MCP ou a destruição de paredes das células do suspensor contíguas ao embrião. O suspensor pode, também, permanecer íntegro até o embrião atingir o estágio de torpedo.
- A lise das células do suspensor, quer seja via MCP ou qualquer outro processo de degradação, faz com que embriões não prossigam seu desenvolvimento. Somente aqueles embriões que permanecem com suspensor, conseguem completar seu desenvolvimento e germinar, cerca de oito meses após plantio. Naqueles cujo suspensor é destruído, os embriões necessitam de um período mais longo, talvez sendo fatores externos como fotoperíodo e temperatura que desencadeiem, então, a ativação de substâncias que permitam completar seu desenvolvimento e germinar. Esta deve ser uma estratégia adaptativa desenvolvida pela planta, pois a produção de sementes é abundante.
- O aporte de nutrientes ao embrião esporofítico ocorre via suspensor até uma determinada fase da embriogênese inicial. Foi observado um gradiente de translocação de proteínas que ocorre da planta-mãe (esporófito), passando pelo suspensor, alcançando o embrião esporofítico. Após o estágio piriforme, ocorre a utilização tanto das reservas do endosperma, como de substâncias sintetizadas ou translocadas pelo suspensor. Completam o desenvolvimento apenas embriões que permanecem com suspensor. Nestes as reservas do endosperma já foram utilizadas.
- Tanto endosperma como suspensor são importantes fontes de nutrientes para que o embrião complete seu desenvolvimento. Sendo que no caso da erva-mate, a função do suspensor não se limita a estágios iniciais da embriogênese, como citado na literatura, para a maioria das espécies de Angiospermas.

Capítulo

6

Figuras





Figs. 1 e 2: Aspecto geral de ramos de árvore de *Ilex paraguariensis* St. Hil. 1. Flores pistiladas em diferentes estágio de pós-antese. Barra=4,2mm; 2. Frutos em diferentes estágios de desenvolvimento, desde brancos a vináceos. Barra=7,3mm

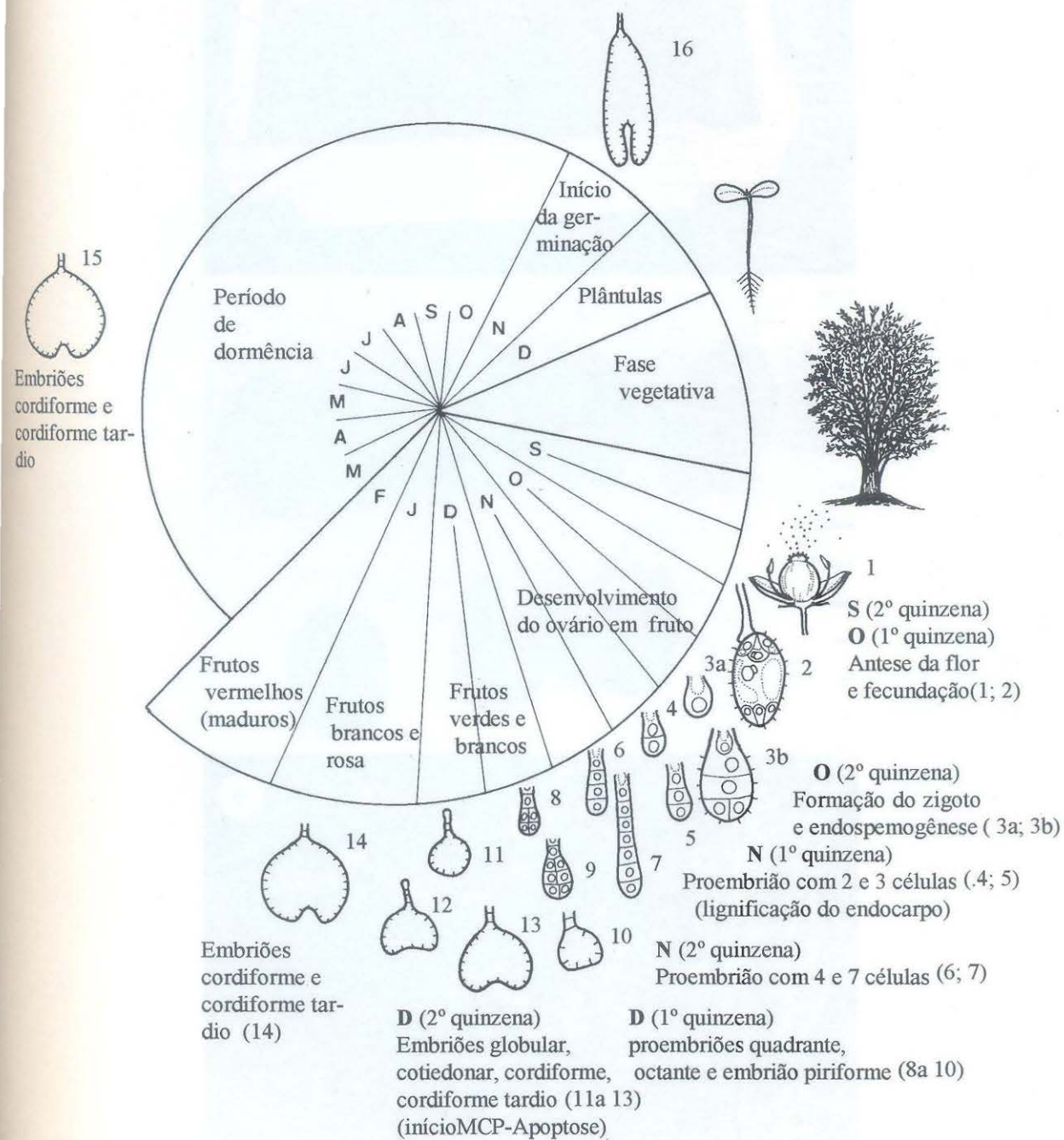
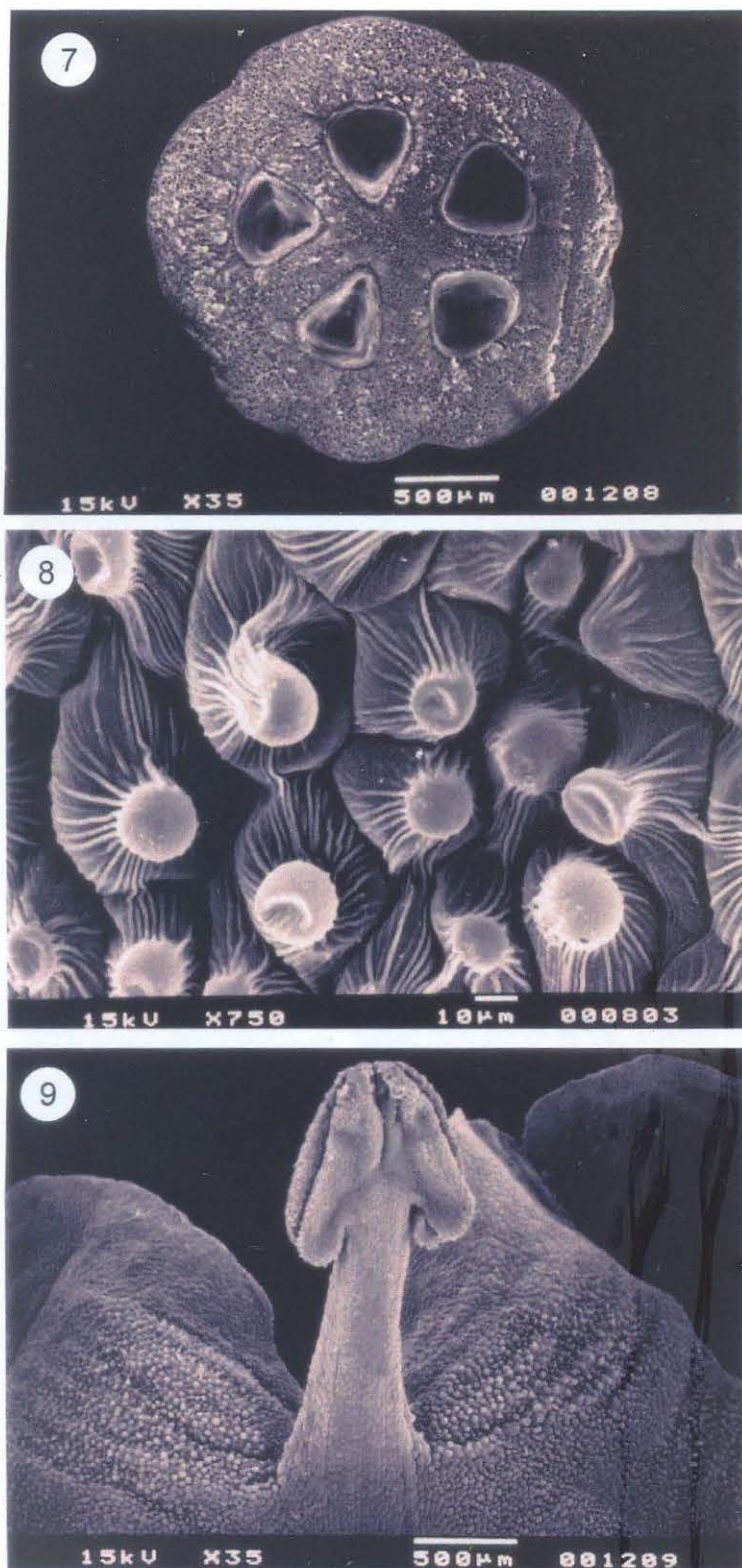
Fases do Ciclo Reprodutivo em *Ilex paraguariensis* St. Hil.

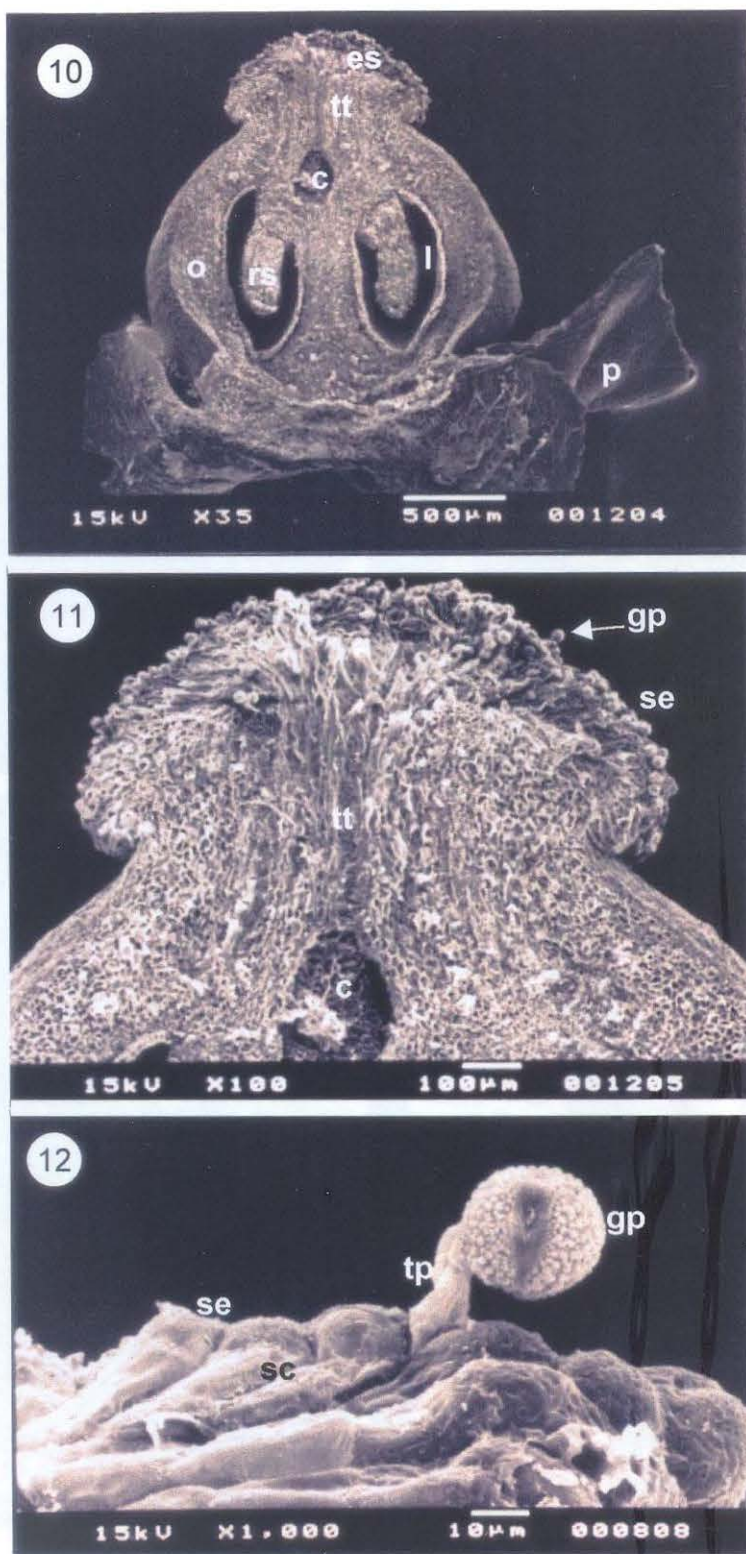
Figura 3: Esquema do ciclo reprodutivo, no espaço temporal, de um indivíduo pistilado de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Proporções dos desenhos não correspondem ao observado. Os meses estão representados por suas letras iniciais. Ilustração adaptada de Owens, J.N. *et al.*, 1997.



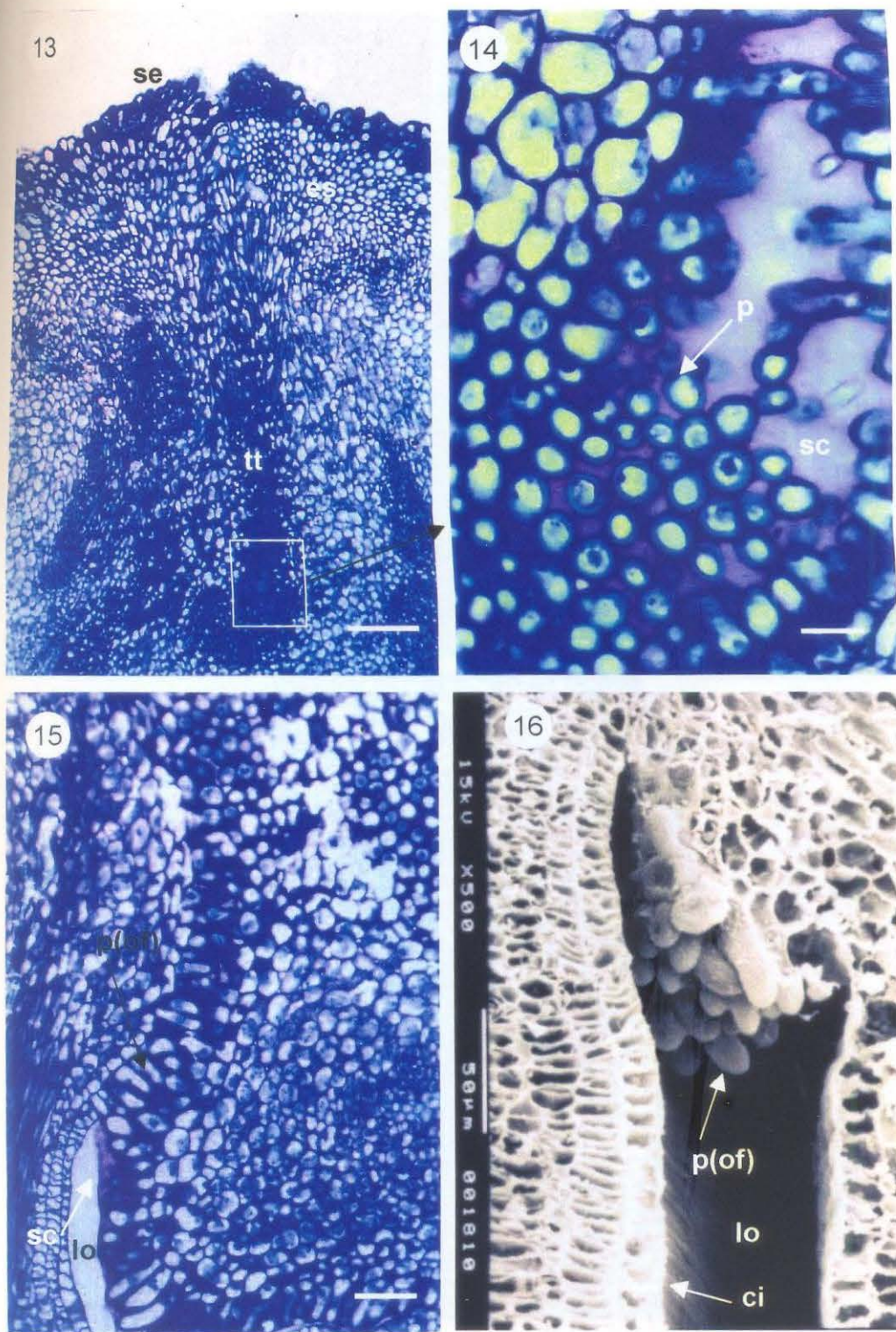
Figs. 4 a 6: Registros fotográficos do experimento montado para obtenção de dados sobre embriogênese, após a maturação dos frutos. 4. Sementeira com sacos de tela plástica contendo pirenos; 5. Pirenos de uma mesma coleta, em diferentes estágios de germinação; 6. Plântulas observadas em 15/12/96, provenientes de pirenos plantados em 10/03/96.



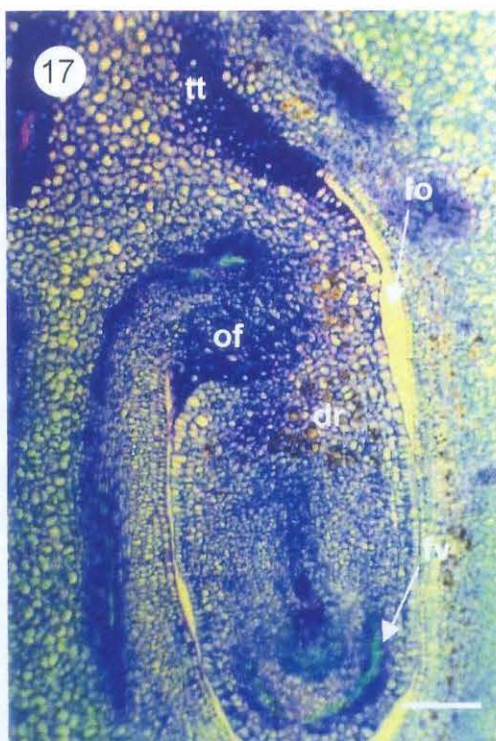
Figs. 7 a 9: Eletromicrografias em Microscopia de Varredura, de flores pistiladas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. 7. Secção transversal da região mediana de ovário pentacarpelar; 8. Detalhe da epiderme da corola, na face adaxial, com células papilosas com estrias epicuticulares; 9. Detalhe do estaminódio de posição alternipétala.



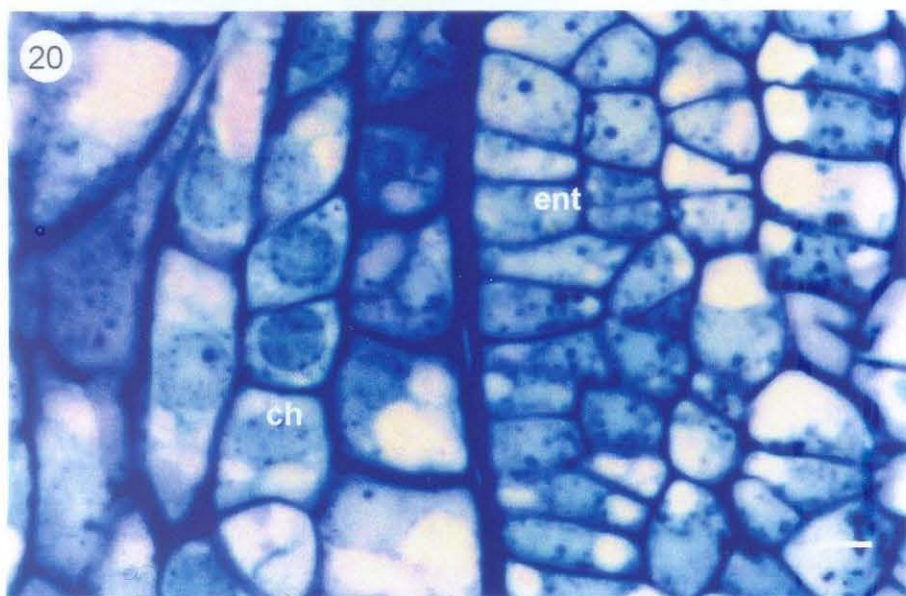
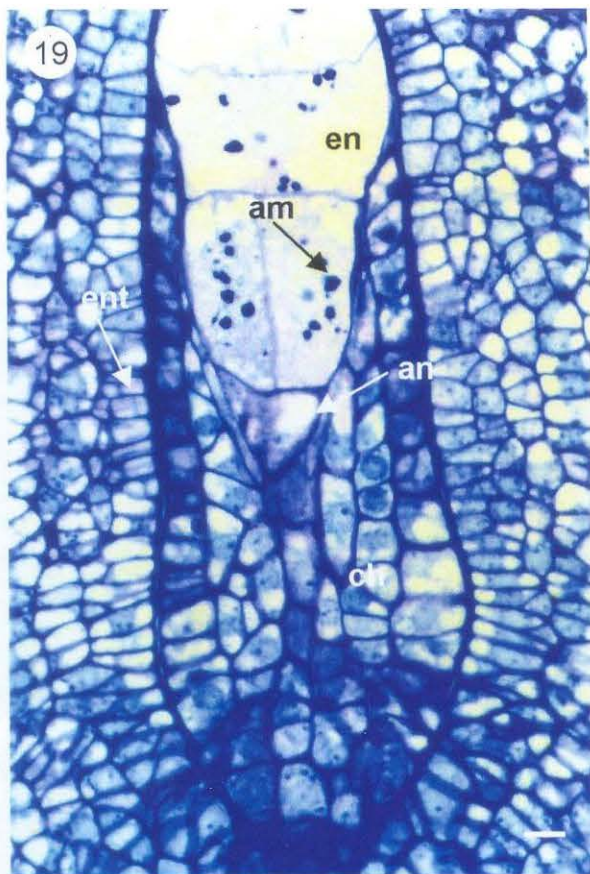
Figs. 10 a 12: Eletromicrografias em Microscopia de Varredura, de flores pistiladas de *Ilex paraguariensis* St. Hil.: **10.** Secção longitudinal da flor com evidência do estigma sésil (es); ovário (o); tecido transmissor (tt); cômputo (c); lóculos (l); rudimentos seminais anátropos (rs); pétalas (p); **11.** Detalhe da porção superior do gineceu, com evidência da superfície estigmática (se) com grãos de pólen (gp), do tecido transmissor (tt) e do cômputo (c); **12.** Detalhe maior da superfície estigmática (se) com sinais de secreção (sc); presença de grão de pólen em germinação (gp) com tubo polínico de penetração apoplástica (tp).



Figs. 13 a 16: Secções longitudinais do gineceu de *Ilex paraguariensis* St. Hil., observadas sob Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura. 13. Detalhe do estigma (es) e zona de interface estigma/ovário. Destaque da superfície estigmática (se) e tecido transmissor (tt), barra=150 μ m; 14. Detalhe maior das papilas (p) do tecido transmissor, em secção transversal, com espessamento de parede e material secretado (sc) ao seu redor, barra=20 μ m; 15. Parte do obturador funicular (of), com características histológicas (papilas -p) semelhantes ao tecido transmissor. Observa-se a secreção (sc) presente junto às papilas, barra=50 μ m; 16. Eletromicrografia, em M.E.V., da mesma região da figura 15, com projeção das papilas (p) do obturador funicular (of) para a região locular (lo); células da parede interna do carpelo de contorno isodiamétrico.

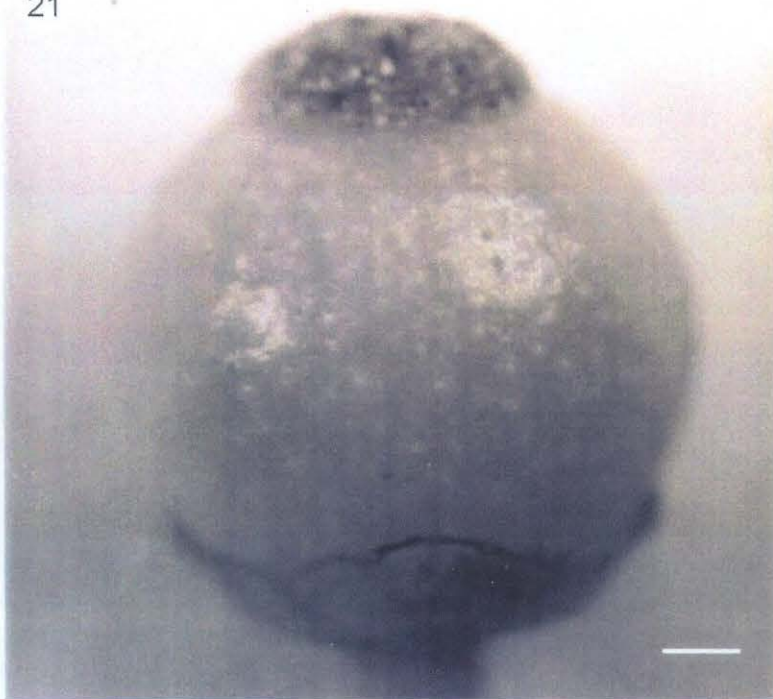


Figs. 17 e 18: Fotomicrografias do rudimento seminal anátropo de *Ilex paraguariensis* St. Hil. em secção longitudinal mediana. 17. Aspecto geral da morfologia do rudimento, com evidência do lóculo (lo), obturador funicular (of), drusas (dr), feixe vascular (fv) em posição dorsal e parte do tecido transmissor (tt), barra=150 μ m; 18. Detalhe do ginófito logo após a fecundação (gi), aparelho fibrilar (af), coluna hipostática (ch) e obturador funicular (of), com células papilosas, sobre o canal micropilar (cmi), barra=50 μ m

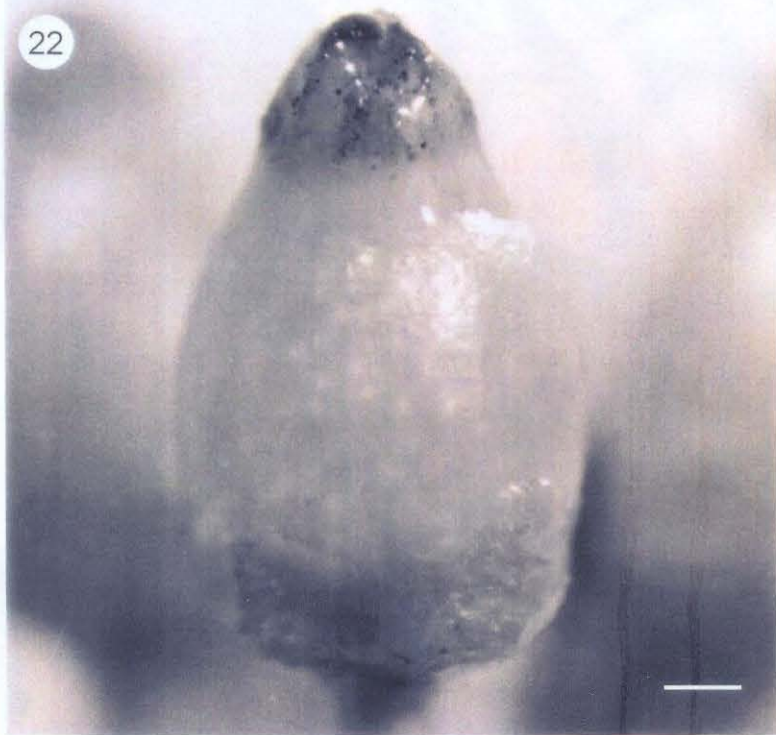


Figs. 19 e 20: Fotomicrografias da porção central do rudimento seminal de *Ilex paraguariensis* St. Hil. em secção longitudinal. 19. Detalhe da face interna tegumento com diferenciação do endotélio (ent); células do endosperma (en) com reservas de amido (am); antípoda em degeneração (an); coluna hipostática (ch), barra=10 μ m; 20. Detalhe maior da zona limítrofe entre as células do endotélio (ent) e as células da coluna hipostática (ch), barra=5 μ m

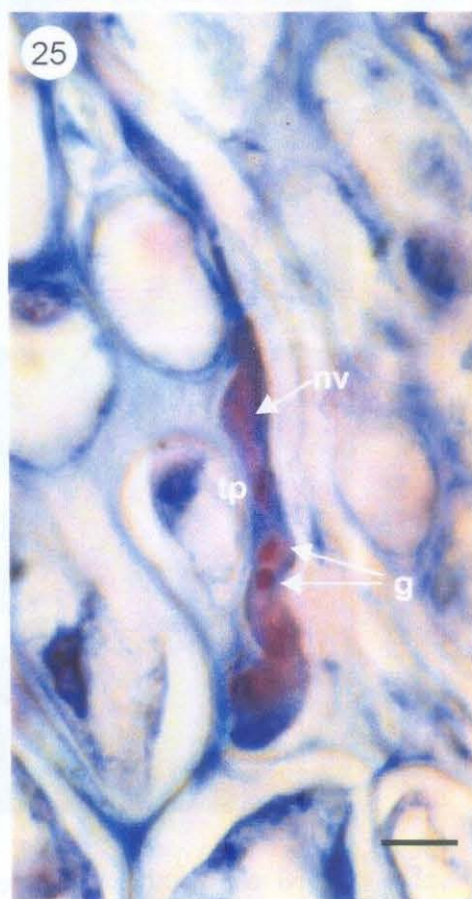
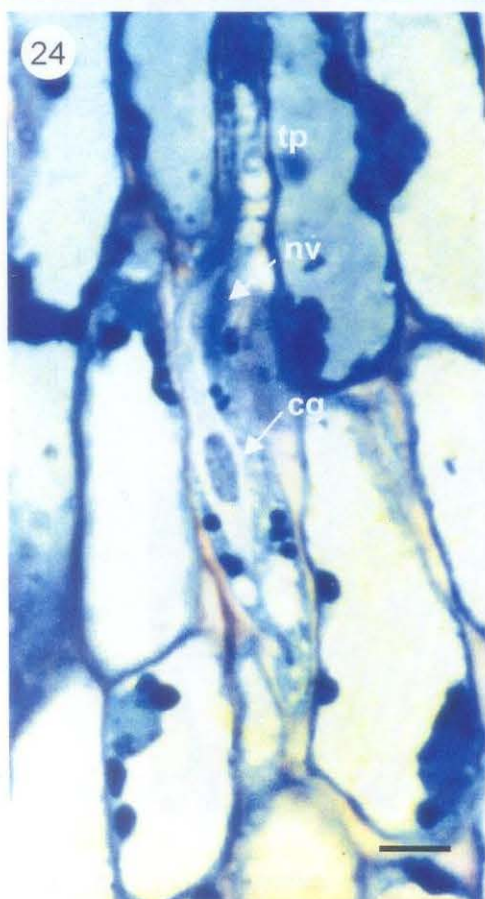
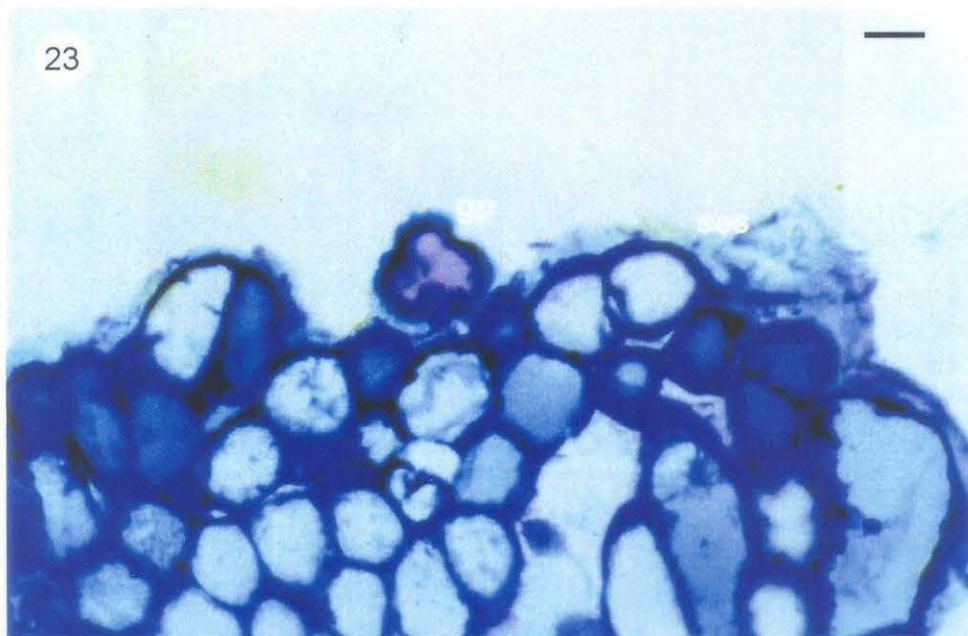
21



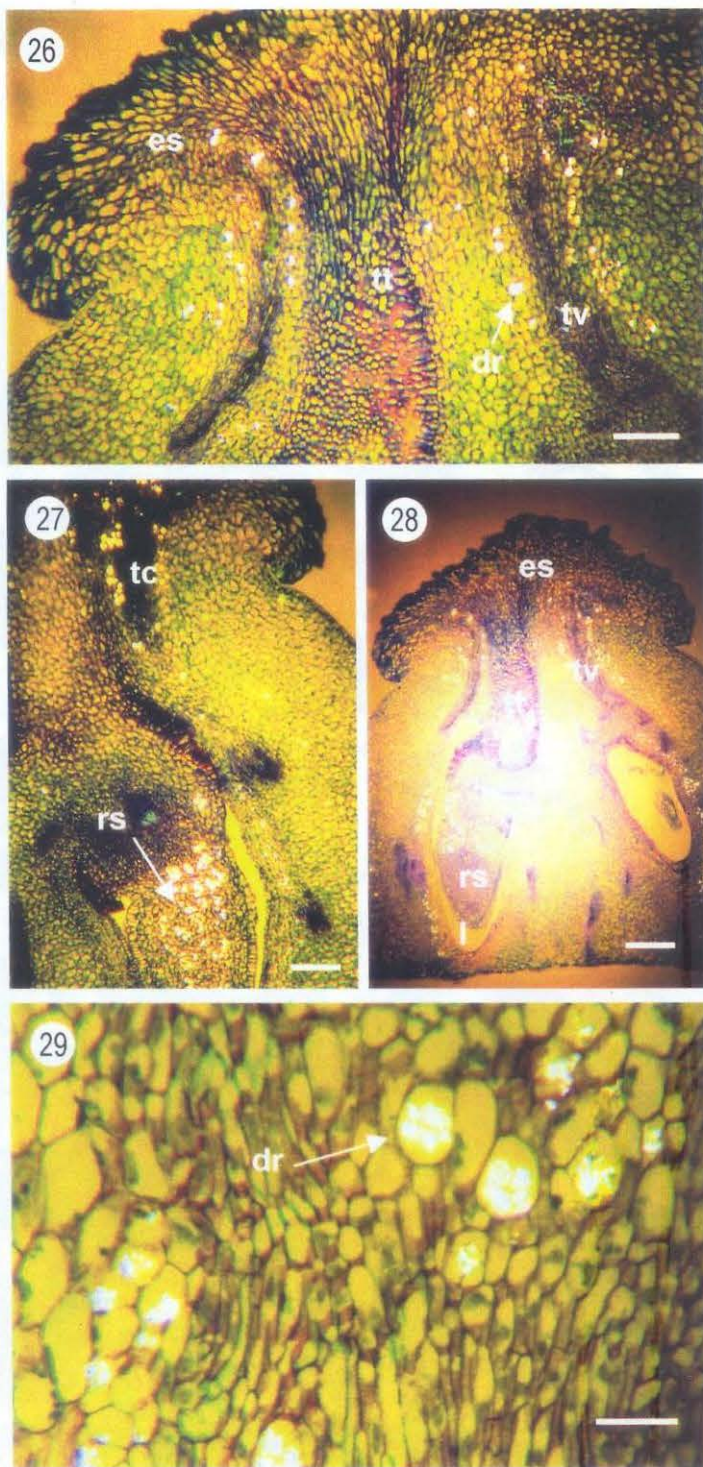
22



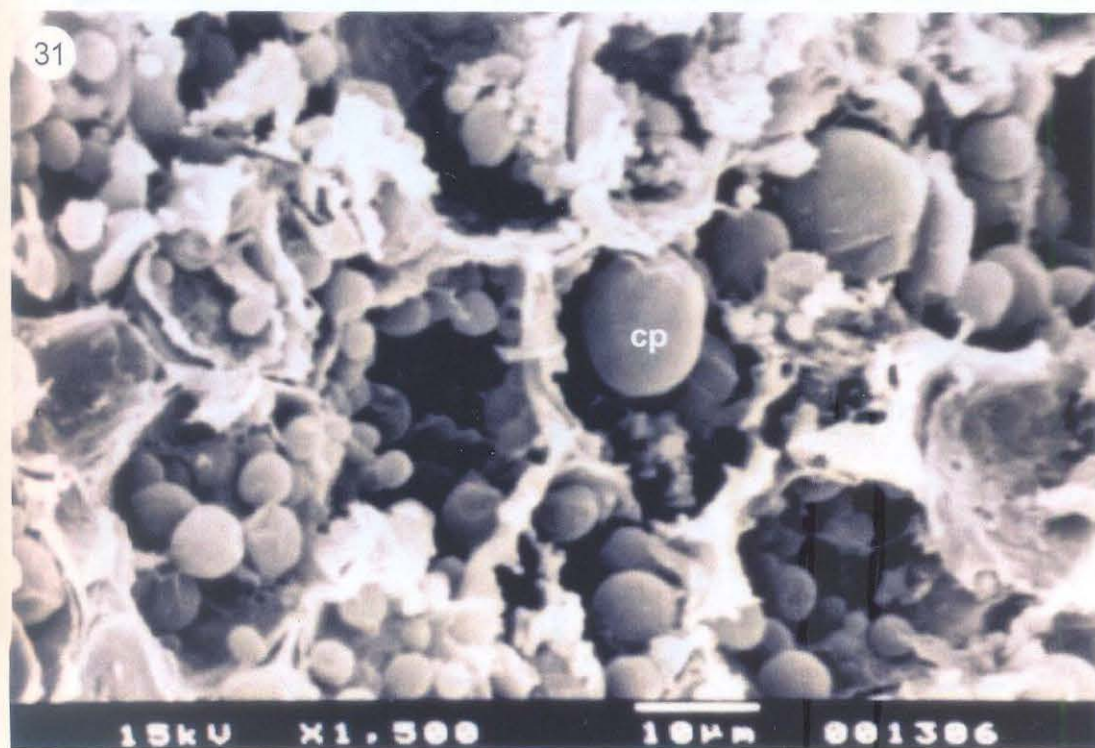
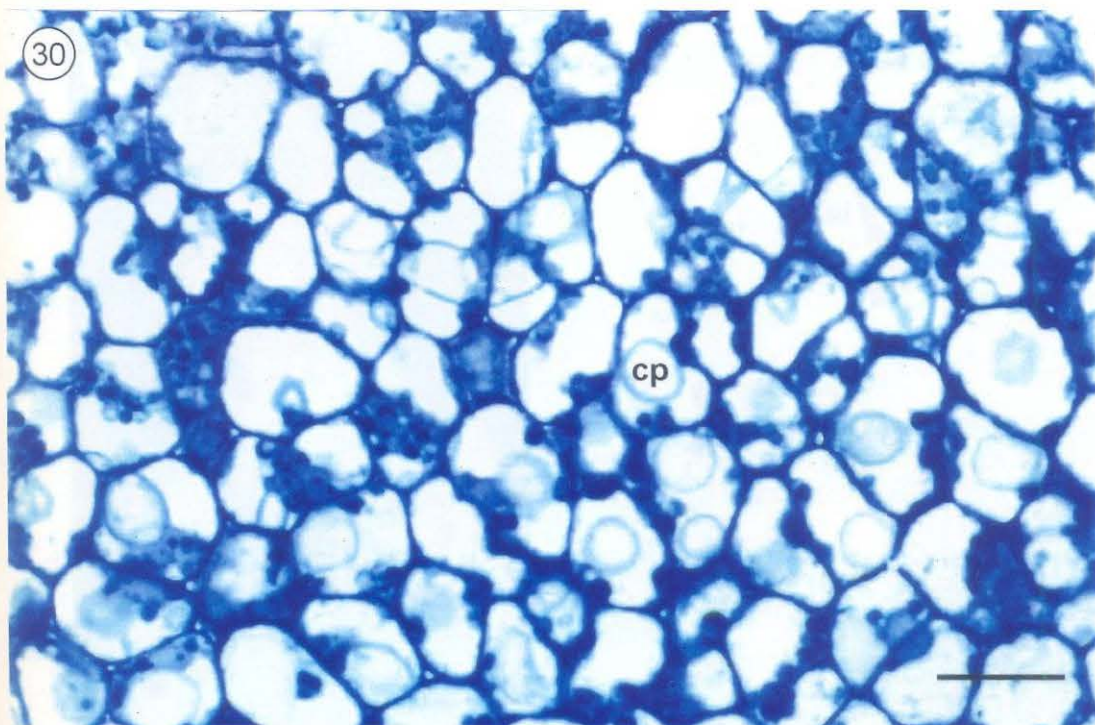
Figs. 21 e 22: Fotomicrografias das diferenças morfológicas entre frutos de duas árvores de *Ilex paraguariensis* St. Hil. no Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. 21. Fruto arredondado da árvore identificada localmente pelo nº 32, barra=0,5 mm 22. Fruto alongado da árvore identificada localmente pelo nº 17, barra=0,5 mm



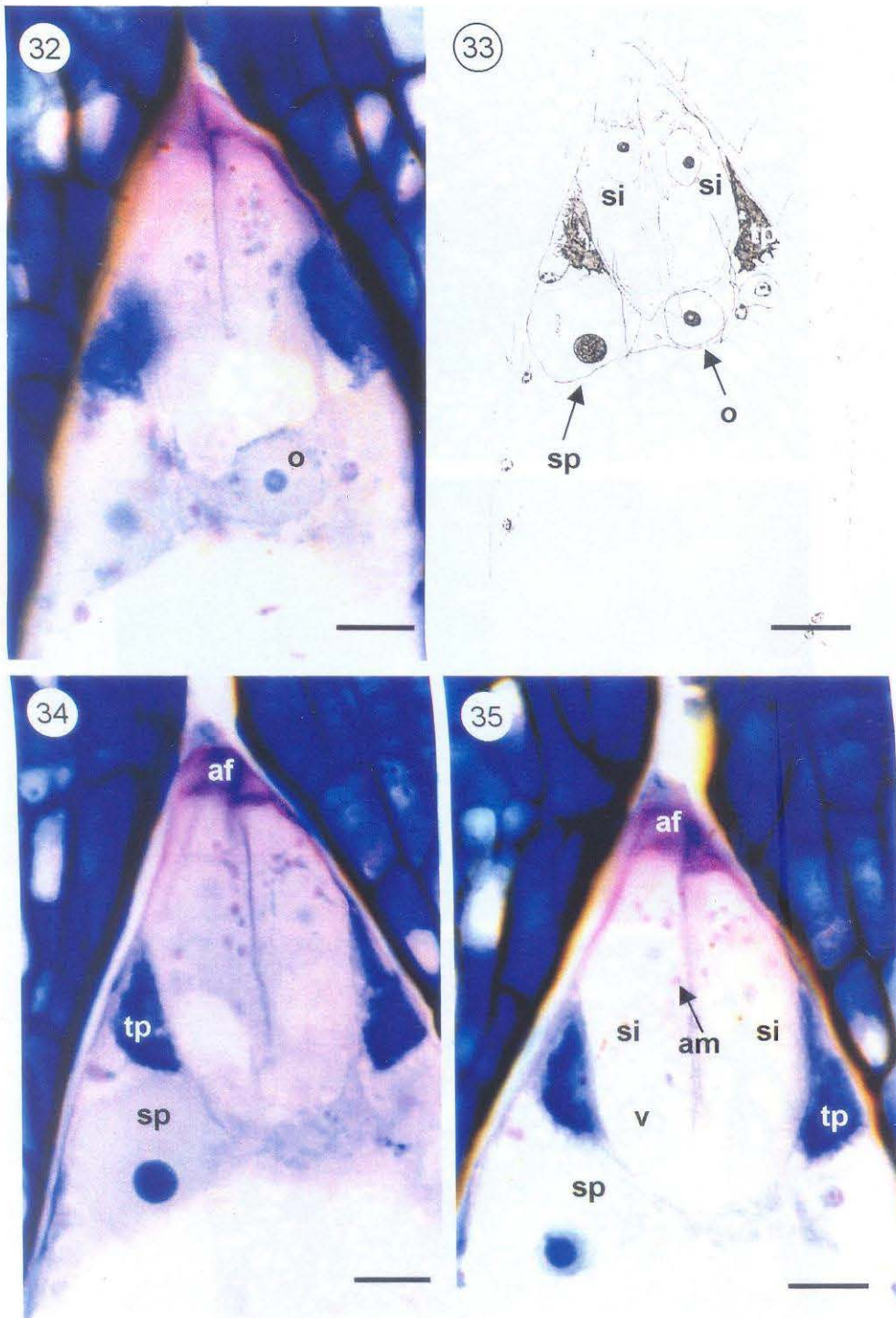
Figs. 23 a 25: Fotomicrografias de flores de *Ilex paraguariensis* St.Hil. em secção longitudinal. 23. Superfície estigmática (ses) com grão de pólen (gp) germinado, barra=10 μ m; 24. Tubo polínico (tp), no tecido transmissor, com célula generativa (cg) e núcleo vegetativo (nv), barra=5 μ m; 25. Tubo polínico (tp), no tecido transmissor, com gametas (g) e núcleo vegetativo (nv), barra=5 μ m



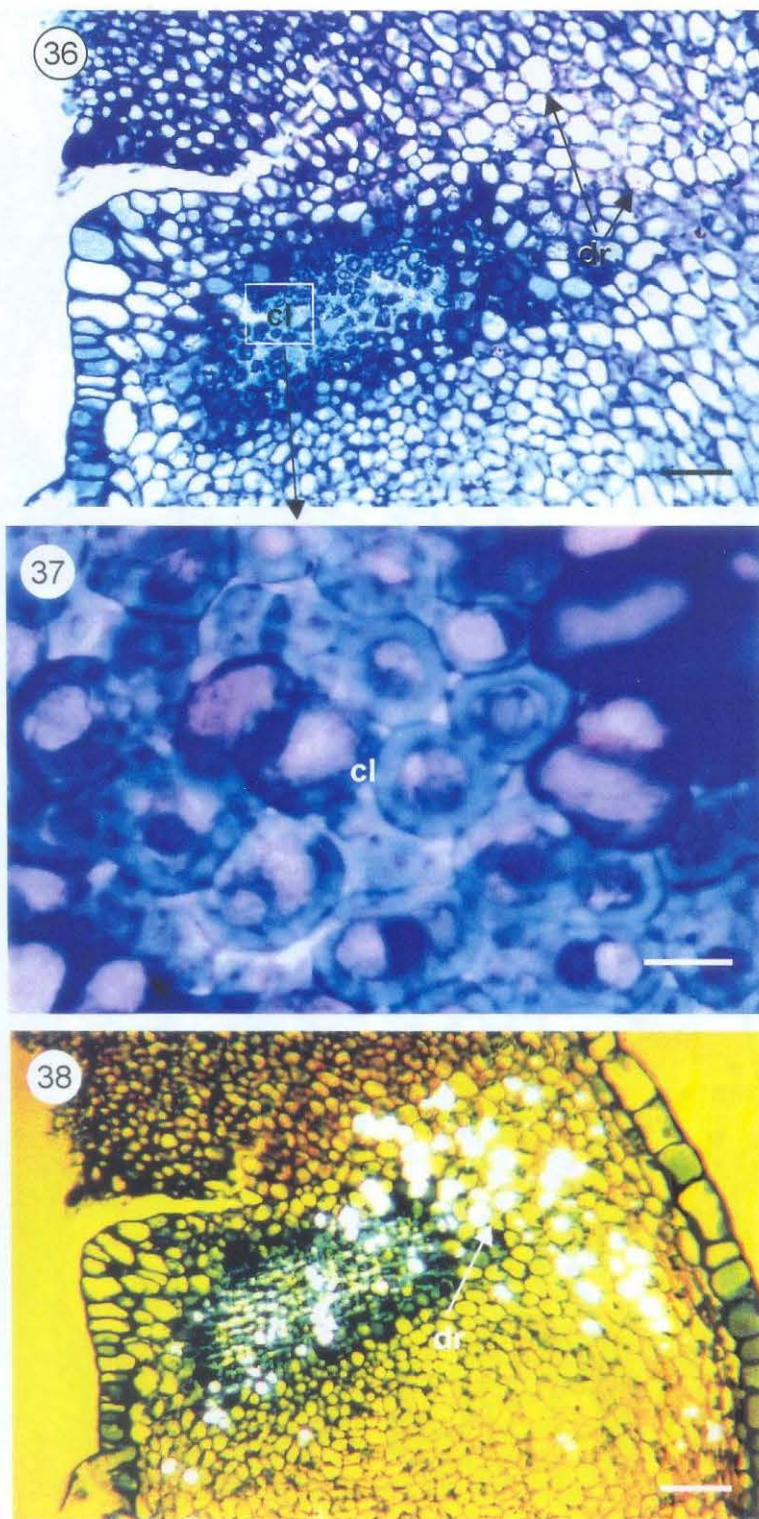
Figs. 26 a 29: Fotomicrografias em Microscopia de Polarização de flores pistiladas de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secção longitudinal. 26. Aspecto do estigma (es), tecido transmissor (tt) e vascular (tv), este apresentando drusas (dr), barra=20 μ m; 27. Detalhe do tecido vascular (tv), rudimento seminal (rs) e parede do ovário, com drusas, barra=20 μ m; 28. Vista geral da flor com as zonas de maior concentração destes cristais; estigma (es), tecido transmissor (tt), tecido vascular (tv), lóculo (l), rudimento seminal (rs), barra=50 μ m; 29. Detalhe de células contendo drusas (dr), barra=10 μ m



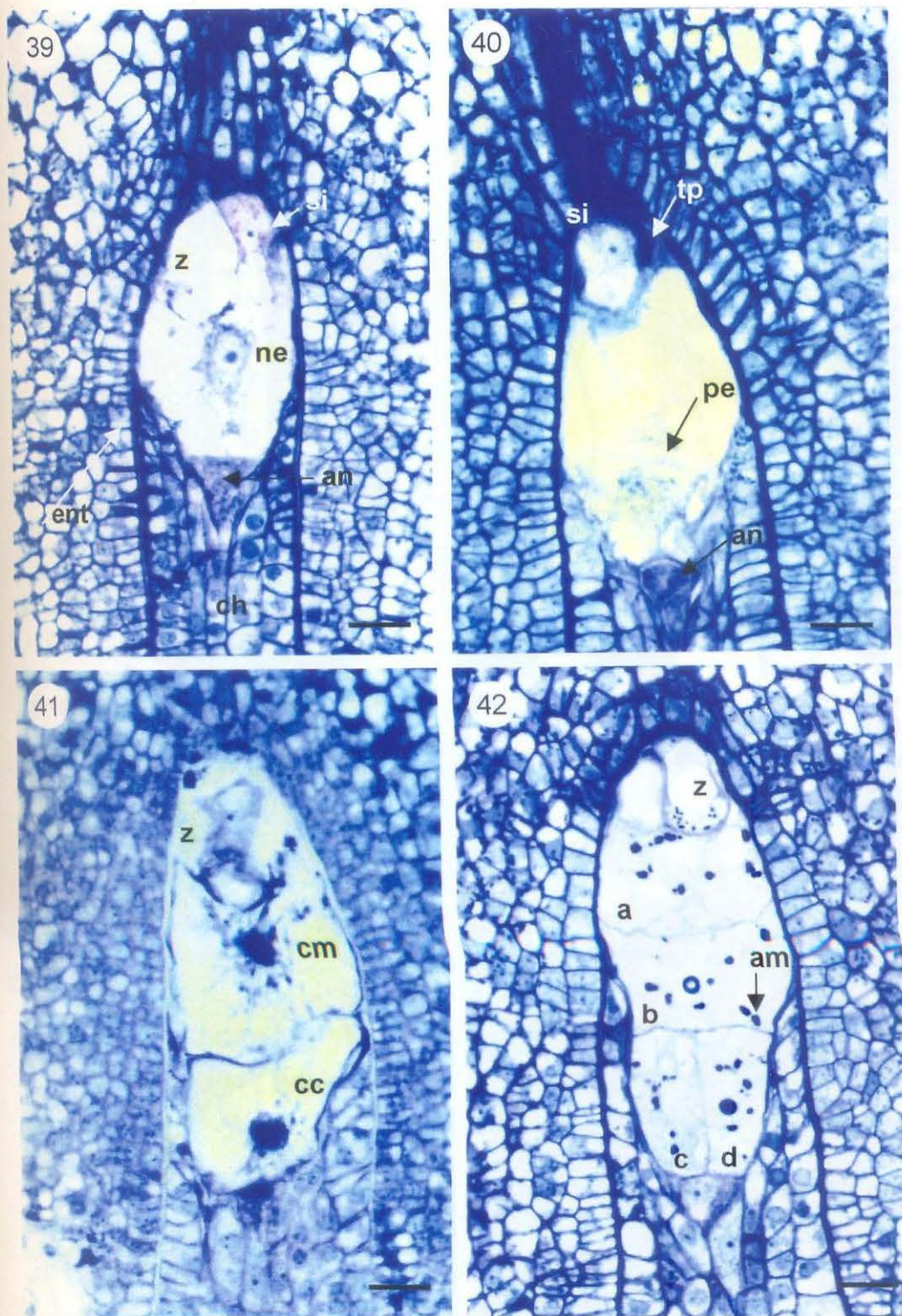
Figs. 30 e 31: Fotomicrografia e eletromicrografia em M.E.V. do ovário de flores pistiladas de *Heliconia paraguariensis* St. Hil. seccionado longitudinalmente. 30. Região lateral ao lóculo, com células contendo corpos protéicos (cp), barra=10 μ m; 31. Células com grande quantidade de corpos protéicos (cp) de dimensão variada, na mesma região da figura 30.



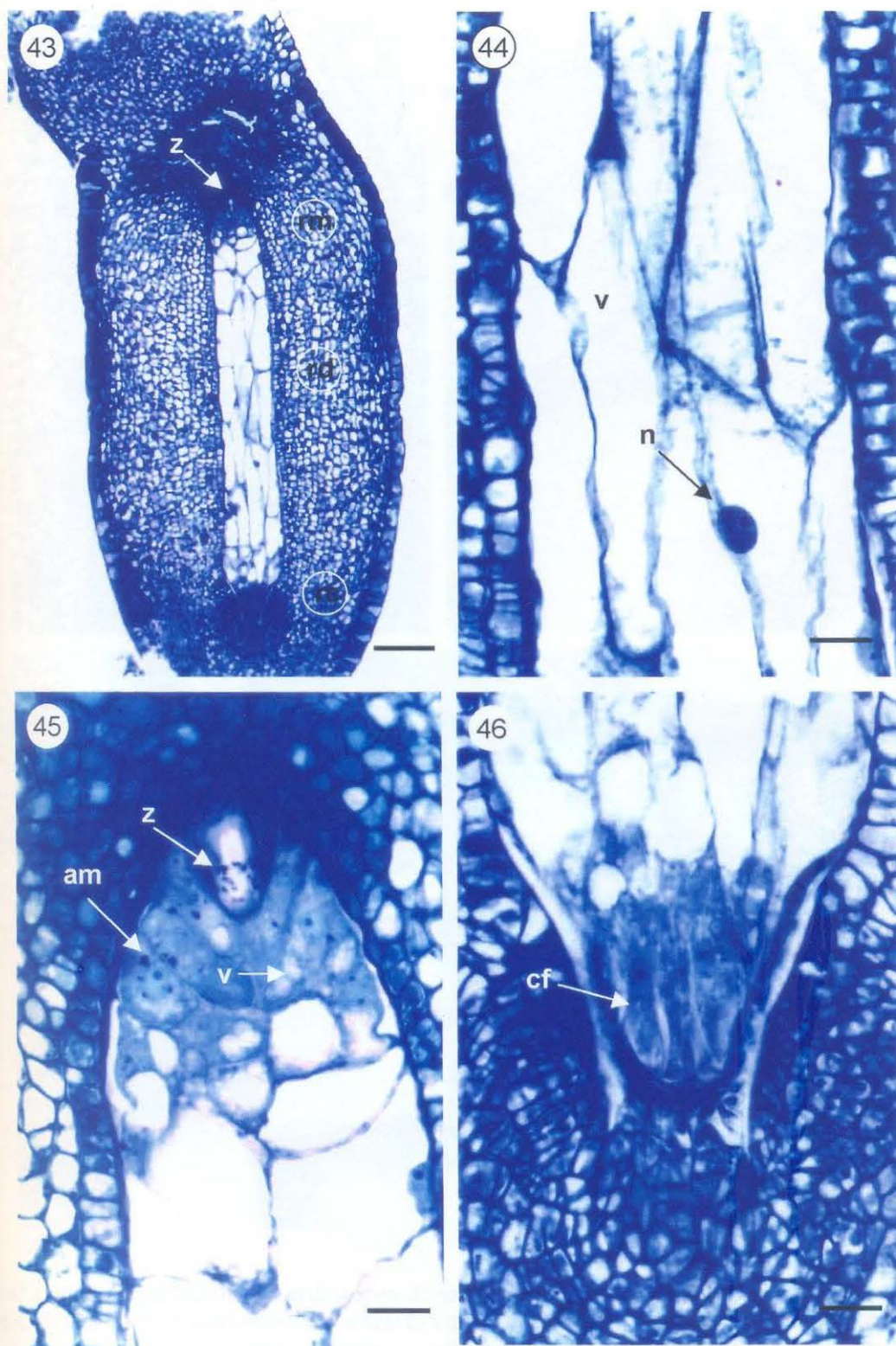
Figs. 32 a 35: Fotomicrografias e desenho esquemático, do polo micropilar do ginófito de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secção longitudinal. 32. Detalhe da oosfera (o), barra= 20 μ m; 33. Sobreposição das secções das figuras 32, 34 e 35 mostrando o aparelho oosférico completo, e descarga do tubo polínico (tp); 34. Detalhe do sincário-pró-endospermico (sp), barra=20 μ m; 35. Sinérgides não-penetradas (si) com vacúolo (v) no polo calazal; conteúdo da descarga do tubo polínico (tp), destaque para amido (am) nas sinérgides; aparelho fibrilar (af) no polo micropilar das sinérgides, barra=20 μ m



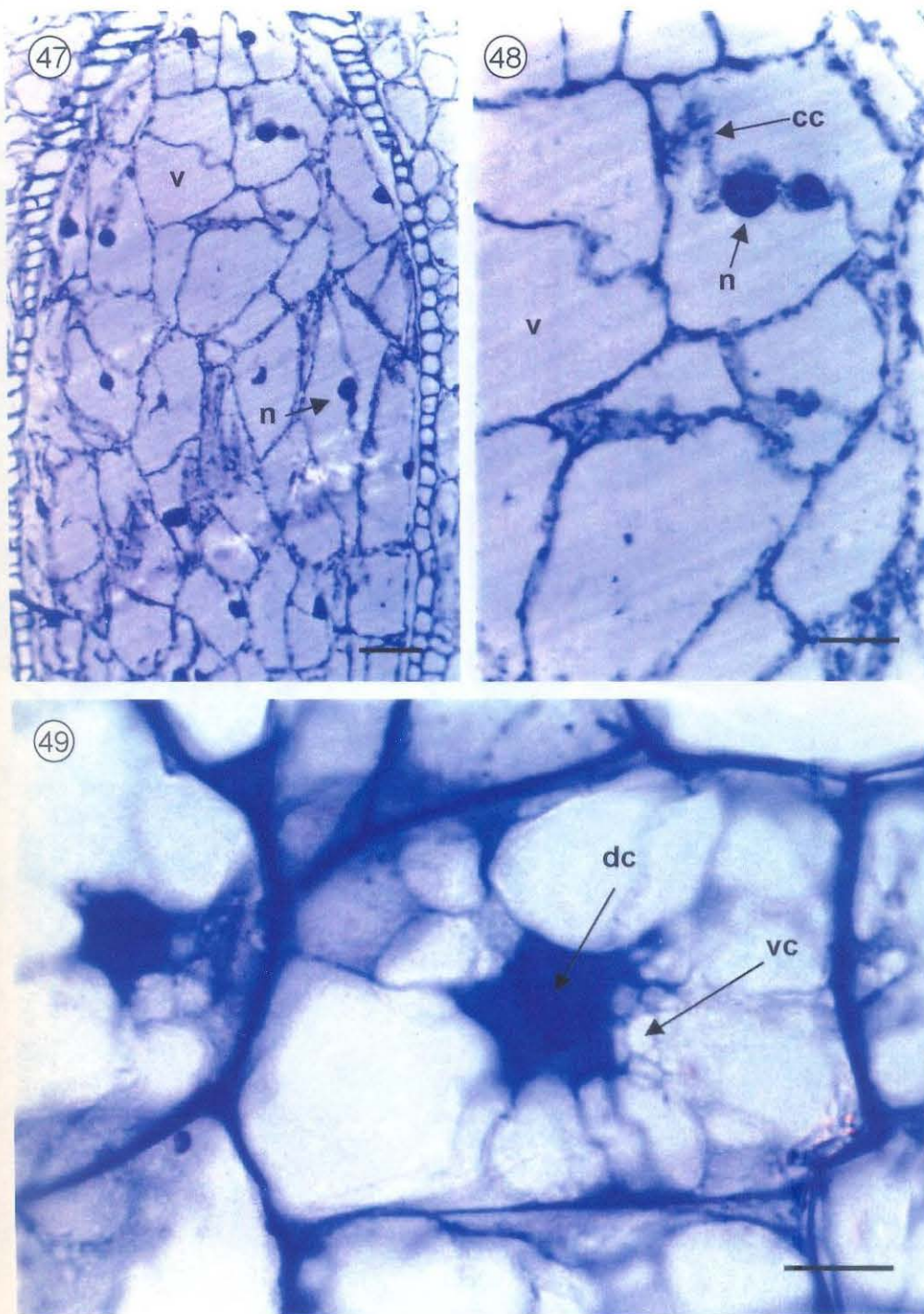
Figs. 36 a 38: Fotomicrografias do rudimento seminal de *Ilex paraguariensis* St. Hil., seccionado longitudinalmente, com detalhe da região micropilar. 36. Início do processo de lignificação das células (cl) próximas da região micropilar, com a presença de drusas (dr), em células contíguas a esta zona, barra=20 μ m; 37. Detalhe maior da células (cl) do capuz micropilar, em estágio avançado de lignificação, barra=10 μ m; 38. Cristais do tipo drusas (dr), armazenados próximos à região micropilar, evidenciados sob luz polarizada, barra=20 μ m



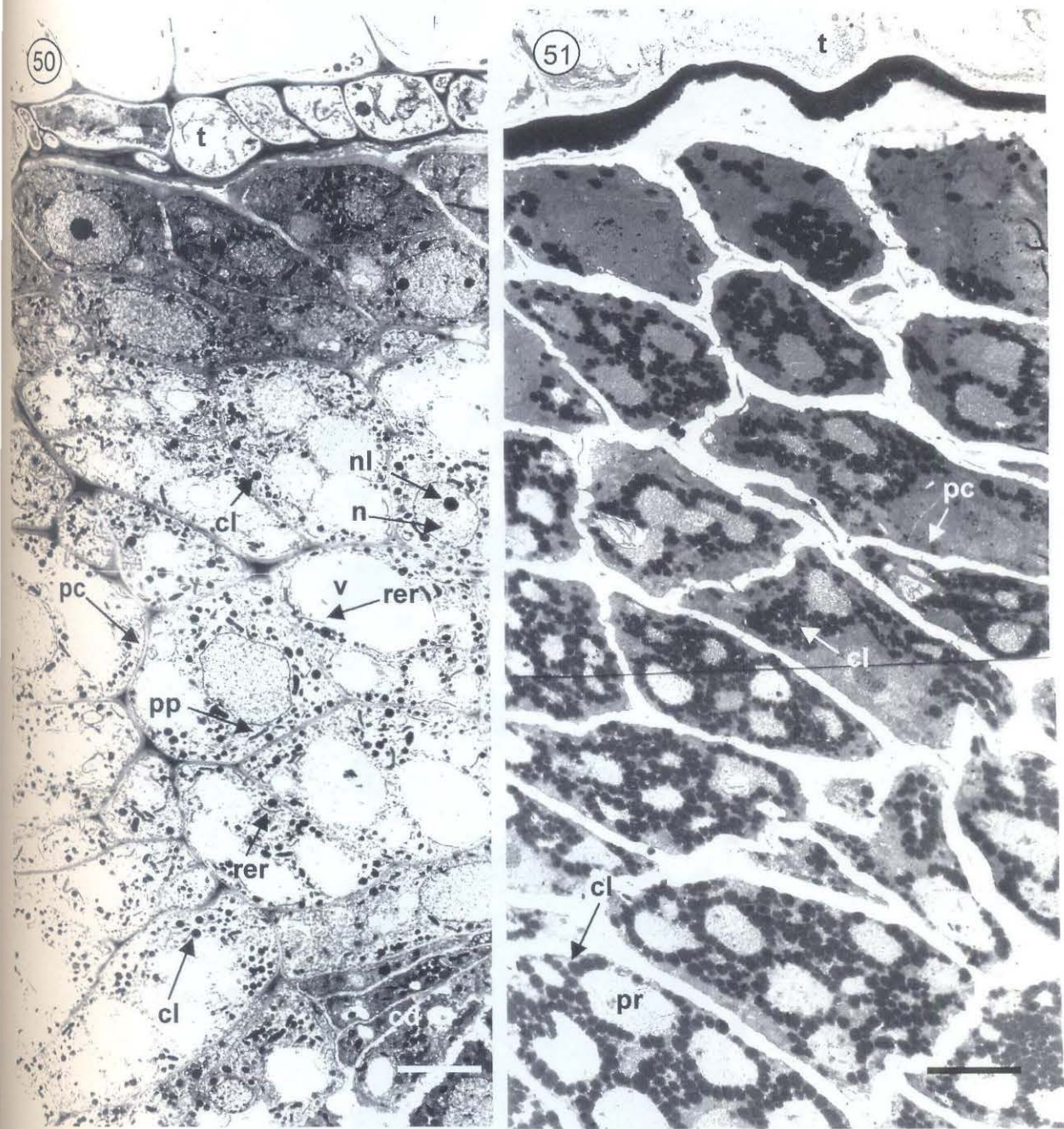
Figs. 39 a 42: Fotomicrografias do rudimento seminal de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secção longitudinal, durante a endospermogênese. 39. Núcleo endospermogênético (ne) com cordões citoplasmáticos; zigoto (z), sinérgide (si), antípodas degeneradas (an), endotélio (ent), coluna hipostática (ch), barra=20 µm; 40. Divisão do núcleo endospermogênético, com placa equatorial (pe) evidente, antípodas degenerando (an), sinérgide (si), conteúdo da descarga do tubo polínico (tp), barra=20 µm; 41. Endosperma bicelular com compartimento calazal (cc) e compartimento micropilar (cm), zigoto (z), barra=20 µm; 42. Endosperma com quatro células (a, b, c, d), grãos de amido (am) evidentes e zigoto (z), barra=20 µm



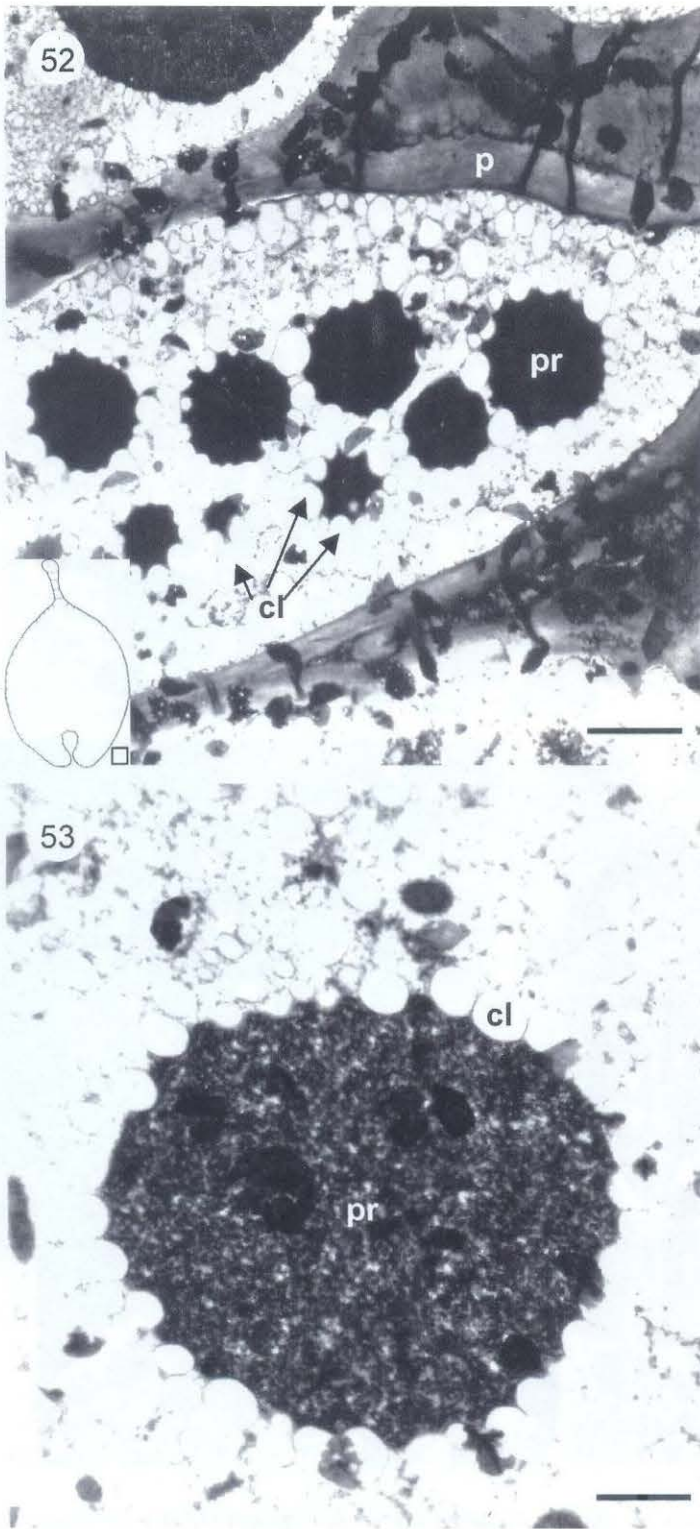
Figs. 43 a 46: Fotomicrografias do rudimento seminal de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secção longitudinal. 43. Aspecto geral da semente, zigoto (z) indicado com seta; endosperma na região micropilar (rm), região mediana (rd) e região calazal (rc), barra=50 μ m; 44. Endosperma na região mediana, com células de paredes delgadas e núcleo (n) parietal, grandes vacúolos (v), citoplasma pouco denso, barra=20 μ m; 45. Endosperma na região micropilar, com células de conteúdo denso, pequenos vacúolos (v) e amido (am), também presente no zigoto (z), barra=20 μ m; 46. Região calazal com células de aspecto fusiforme (cf), citoplasma denso e pequenos vacúolos, barra=20 μ m



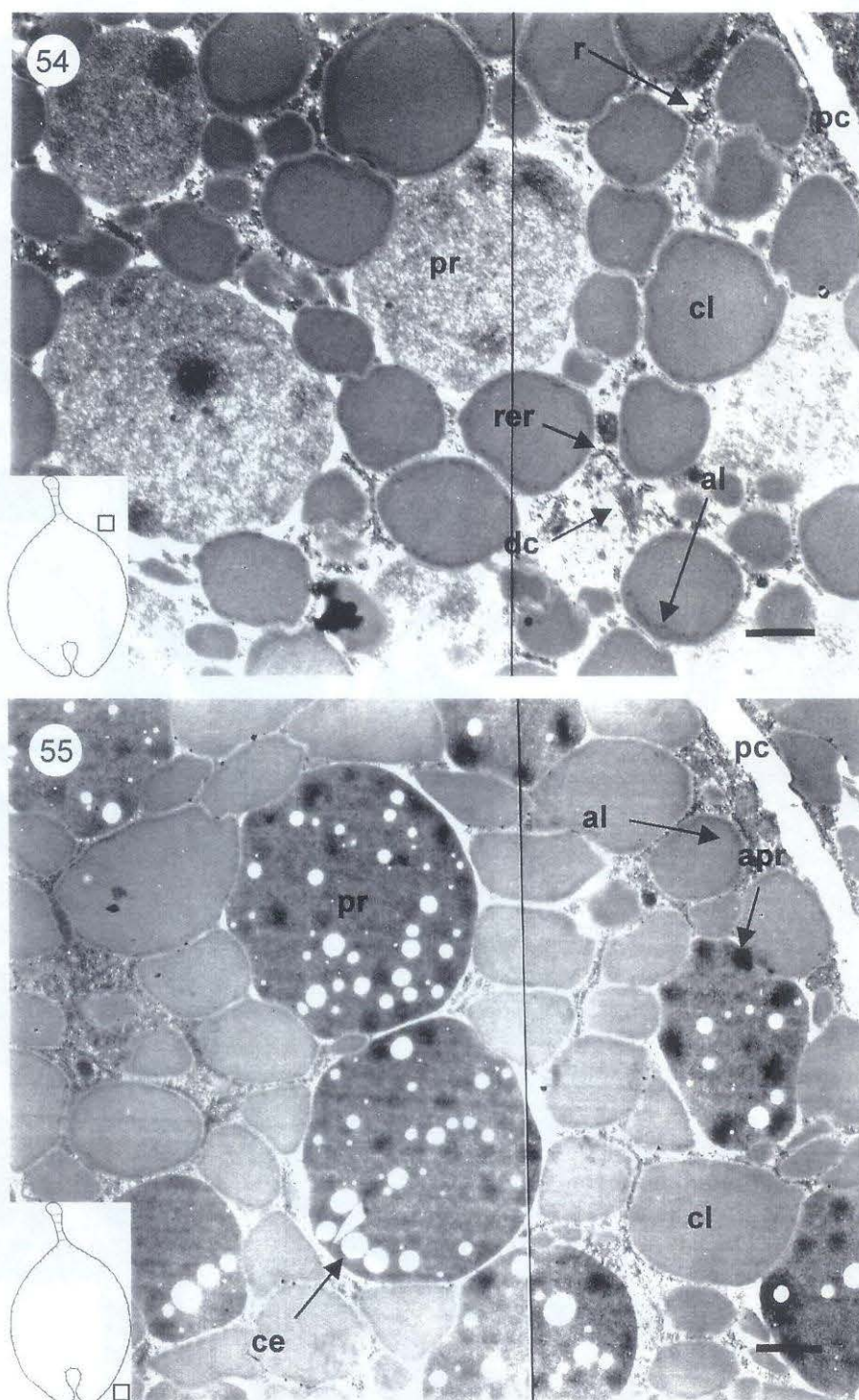
Figs. 47 a 49: Fotomicrografias do endosperma de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secção longitudinal, em início de especialização. Embrião em estágio piriforme a globular. 47. Aspecto geral do endosperma, citoplasma pouco denso, grandes vacúolos (v), núcleo (n) proeminente. Não há acúmulo de reservas, barra=20 μ m; 48. Detalhe da figura 47, salientando o núcleo (n) e cordão citoplasmático (cc), vacúolo (v), barra=10 μ m; 49. Célula do endosperma encontrada em embriões em estágio piriforme; célula em metáfase (dc); início de especialização, caracterizado pelo vacuoma (vc), barra=10 μ m. Secções das figuras 47 e 48 foram submetidas ao reagente Coomassie Blue, não apresentando reação positiva.



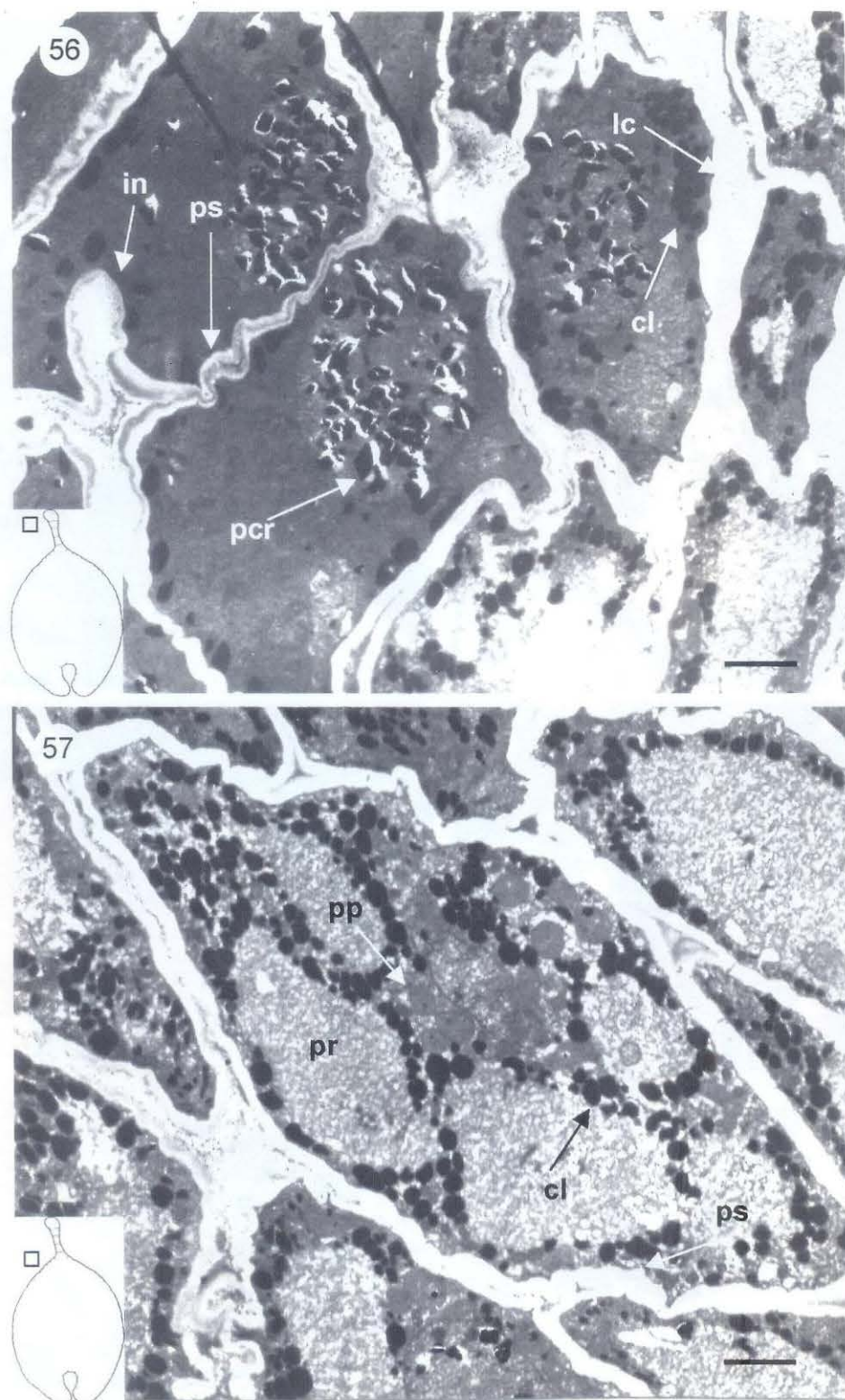
Figs. 50 e 51: Eletromicrografias em Microscopia de Transmissão de células do endosperma de *Ilex paraguariensis* St. Hil.. Gradiente da região do tegumento (parte superior) à região próxima ao embrião (parte inferior). 50. Células do endosperma de embrião globular; proplastídios (pp), retículo endoplasmático rugoso (rer); vacúolos (v) com granulações protéicas, núcleo (n) com nucléolo (nl), paredes celulares (pc) pouco espessas, células mais próximas ao tegumento (t) com citoplasma mais denso e as mais próximas à cavidade digestora (cd) com maior quantidade de corpos lipídicos (cl), barra=8µm; 51. Células do endosperma de embrião cordiforme, evidenciando espessamento das paredes (pc) e gradiente no aumento de deposição de reservas no sentido superior-inferior; células próximas ao tegumento (t) com menor quantidade de reservas, do que as próximas ao embrião; vacúolos contendo proteína (pr) circundados por corpos lipídicos (cl), barra=8µm



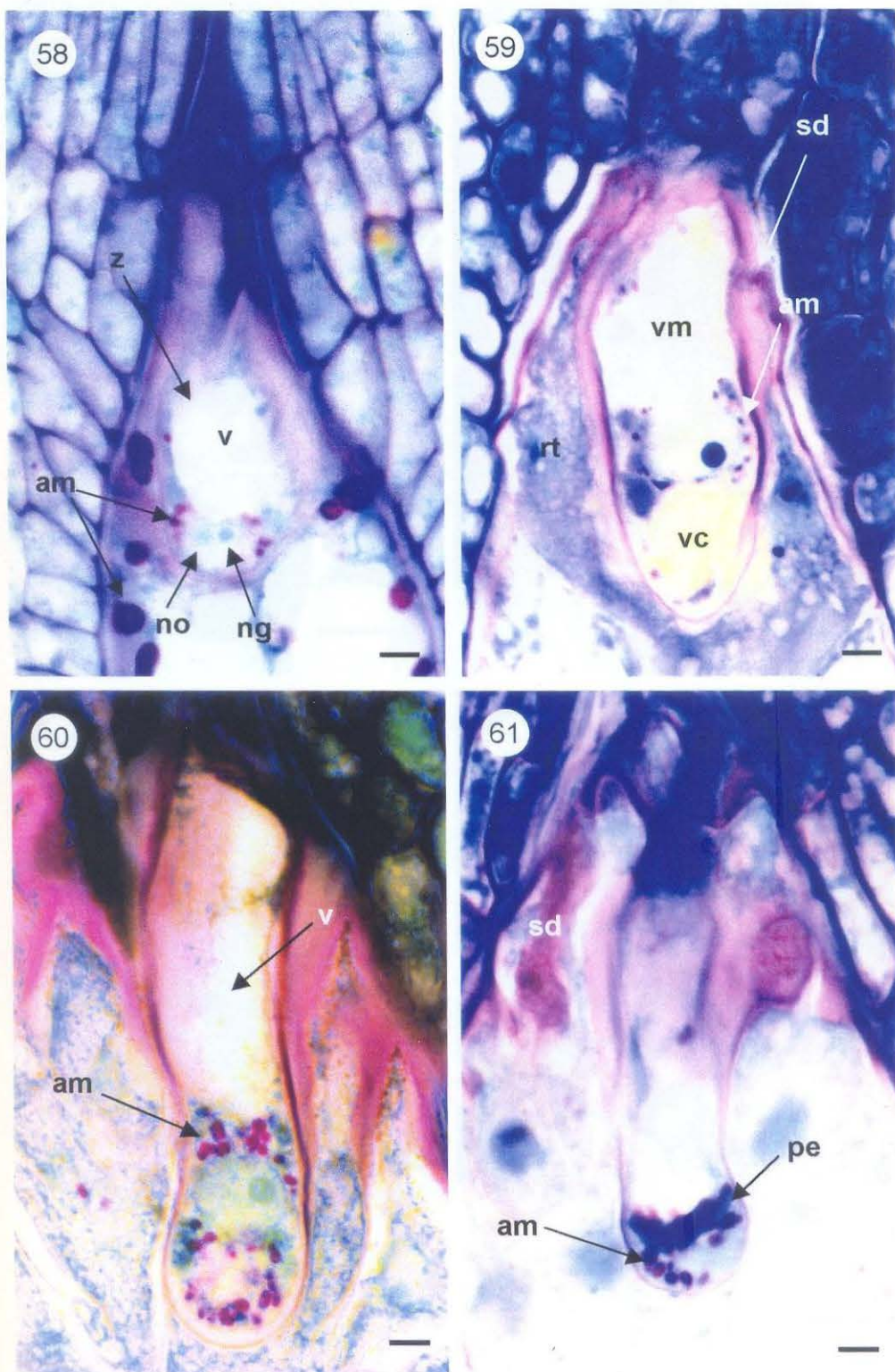
Figs. 52 e 53: Eletromicrografias em Microscopia de Transmissão de células do endosperma, de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil., com embriões em estágio cordiforme. Sementes semeados em março de 1997 e retiradas do solo em 06/05/1997. 52. Aspecto geral de uma célula localizada na região abaixo e ao lado dos cotilédones. Detalhe identifica a região observada. Paredes (p) espessas, reservas protéicas (pr) rodeadas por corpos contendo lipídios (cl), barra=2,5 μ m; 53. Detalhe de um vacúolo contendo reservas protéicas (pr) adensadas, com aspecto granuloso, rodeado por corpos lipídicos (cl) de diferentes tamanhos, barra=1 μ m



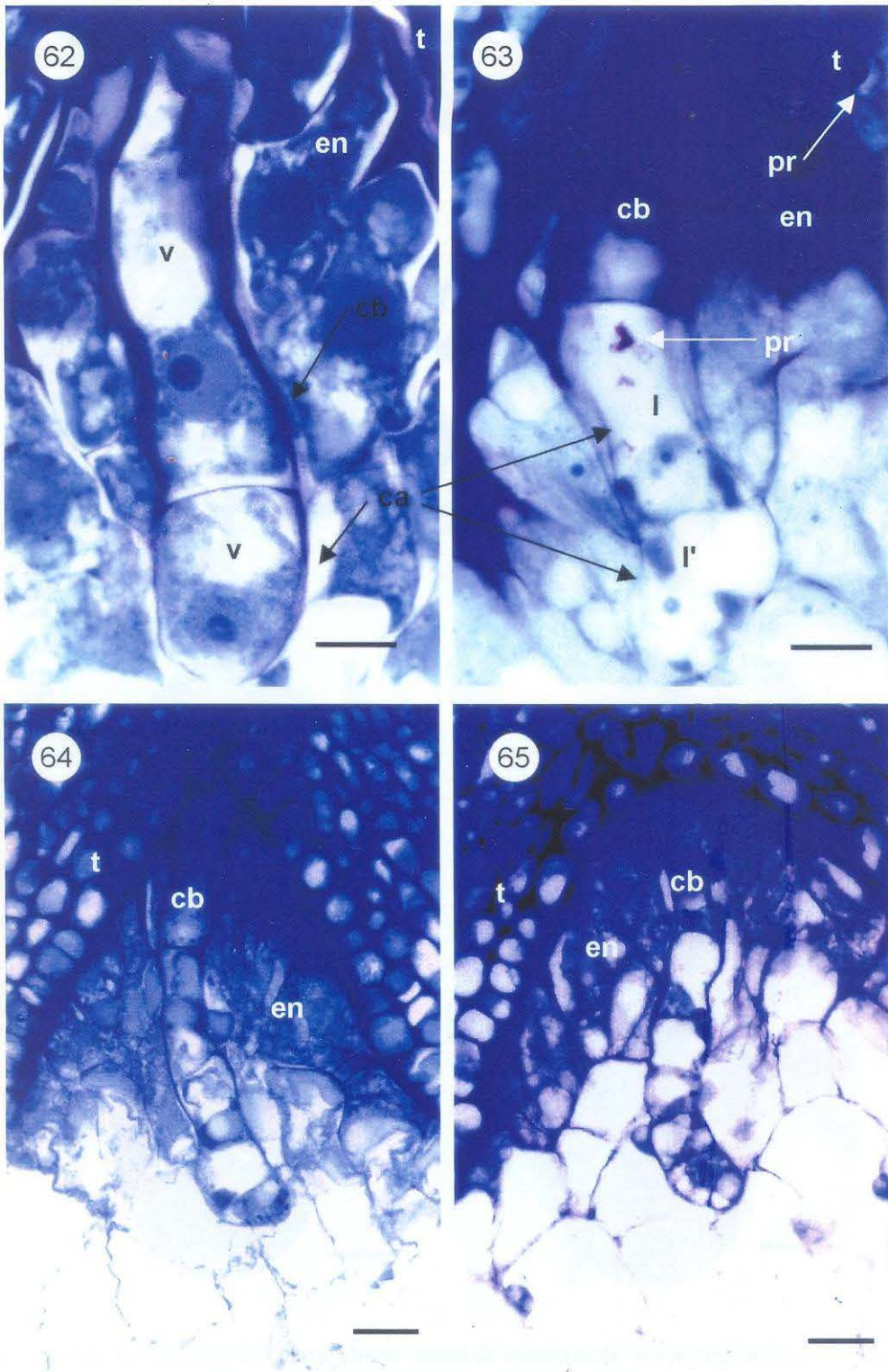
Figs. 54 e 55: Eletromicrografias em Microscopia de Transmissão, de células do endosperma, de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil., com embrião em estágio cordiforme tardio. 54. Região assinalada no detalhe localiza célula com reservas protéicas (pr) amorfas, dentro de vacúolos, estas rodeadas por corpos lipídicos (cl), com adensamento (al) destas substâncias na região periférica das mesmas. Citoplasma, com dictiossomos (dc) e retículo endoplasmático rugoso (rer) com ribossomos (r); parede celular (pc), barra=500nm; 55. Células da região assinalada no detalhe, com reservas protéicas (pr) amorfas dentro de vacúolos, com cavitações esféricas não eletrodensas (ce) e zonas com adensamento protéico (apr); vacúolos protéicos rodeados por corpos lipídicos (cl), com adensamento (al) destas substâncias na região periférica; parede celular (pc), barra=1 μ m



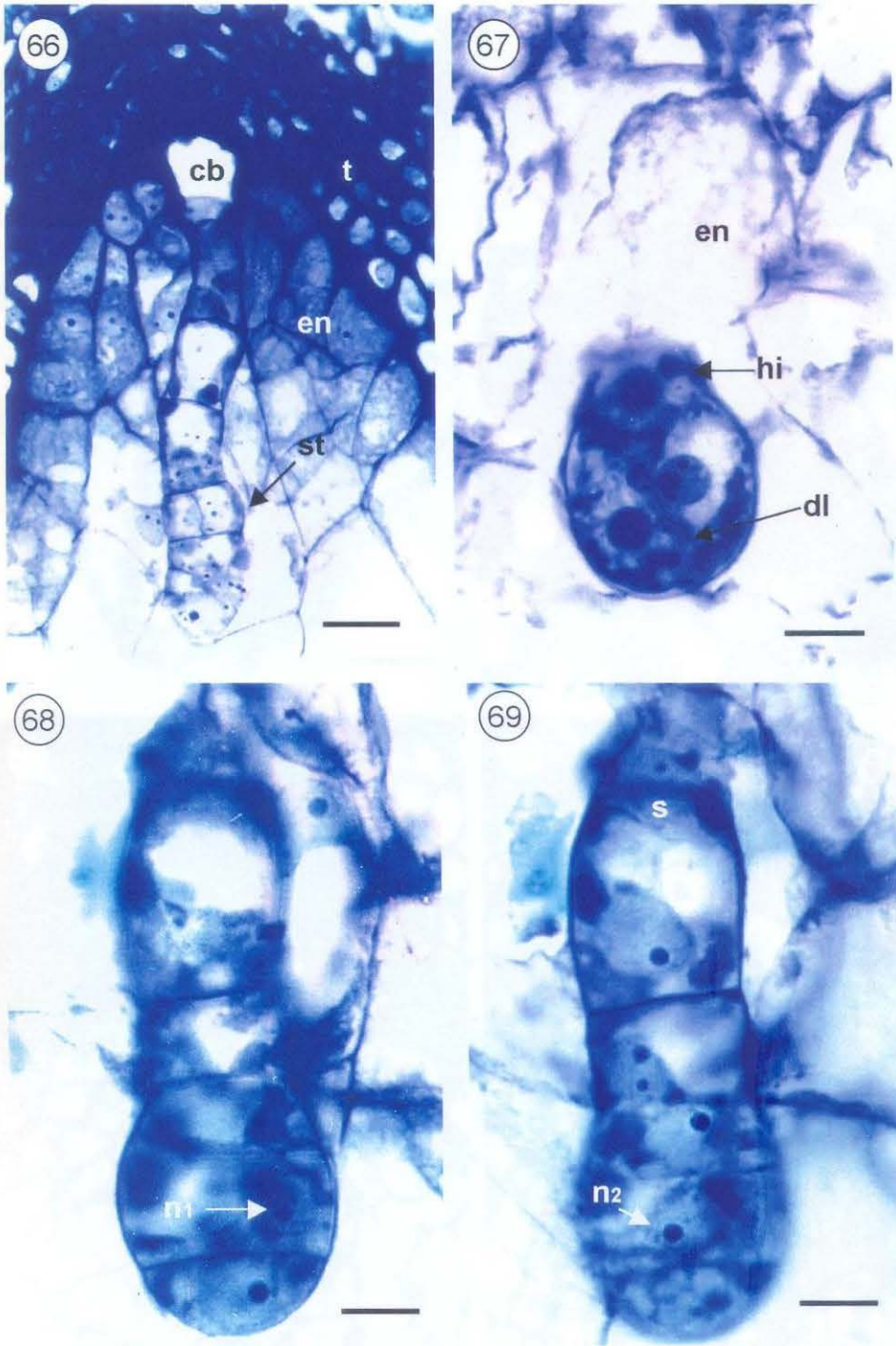
Figs. 56 e 57: Eletromicrografias em Microscopia de Transmissão, de células do endosperma de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil., com embrião em estágio cordiforme tardio. 56. Detalhe localiza células da região próxima ao suspensor, apresentando proteínas cristalizadas (pcr), dentro de vacúolos. Corpos menores com reservas lipídicas (cl), paredes celulares sinuosas (ps) com invaginações (in), e sinais de lise celular (lc), barra=2µm; 57. Detalhe com localização de células do endosperma, na região entre suspensor e embrião; vacúolos contendo reservas protéicas (pr), com aspecto granuloso, rodeados por corpos com reservas lipídicas (cl); observam-se proplastídios (pp) e paredes celulares sinuosas (ps), barra=2µm



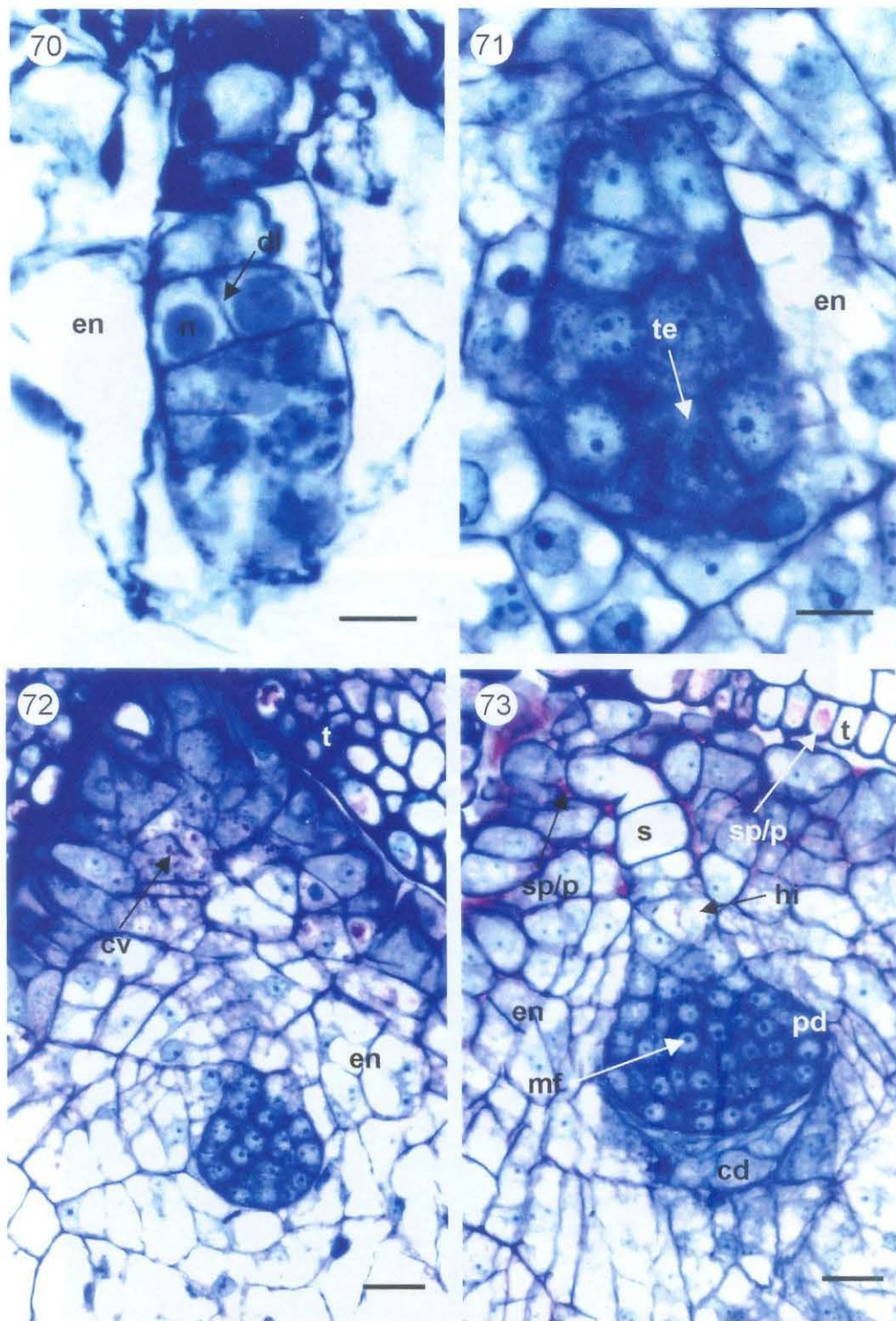
Figs. 58 a 61: Fotomicrografias do zigoto de *Ilex paraguariensis* St.Hil., seccionado longitudinalmente, em diferentes fases de desenvolvimento. 58. Zigoto (z) com vacúolo (v) no polo micropilar, núcleo com dois nucléolos, um pertencente a oosfera (no) e outro ao gameta masculino (ng); amido (am), barra=10µm; 59. Zigoto com vacúolo na porção micropilar (vm) e calazal (vc); amido (am) contornando o núcleo; restos da descarga o tubo polínico (rt); sinérgide degenerada (sd), barra=10µm; 60. Zigoto alongado, vacúolo (v) no polo micropilar, amido (am) contornando o núcleo, barra=10µm; 61. Prófase mitótica, com placa equatorial evidente (pe), amido (am), sinérgide degenerada (sd), barra=10µm



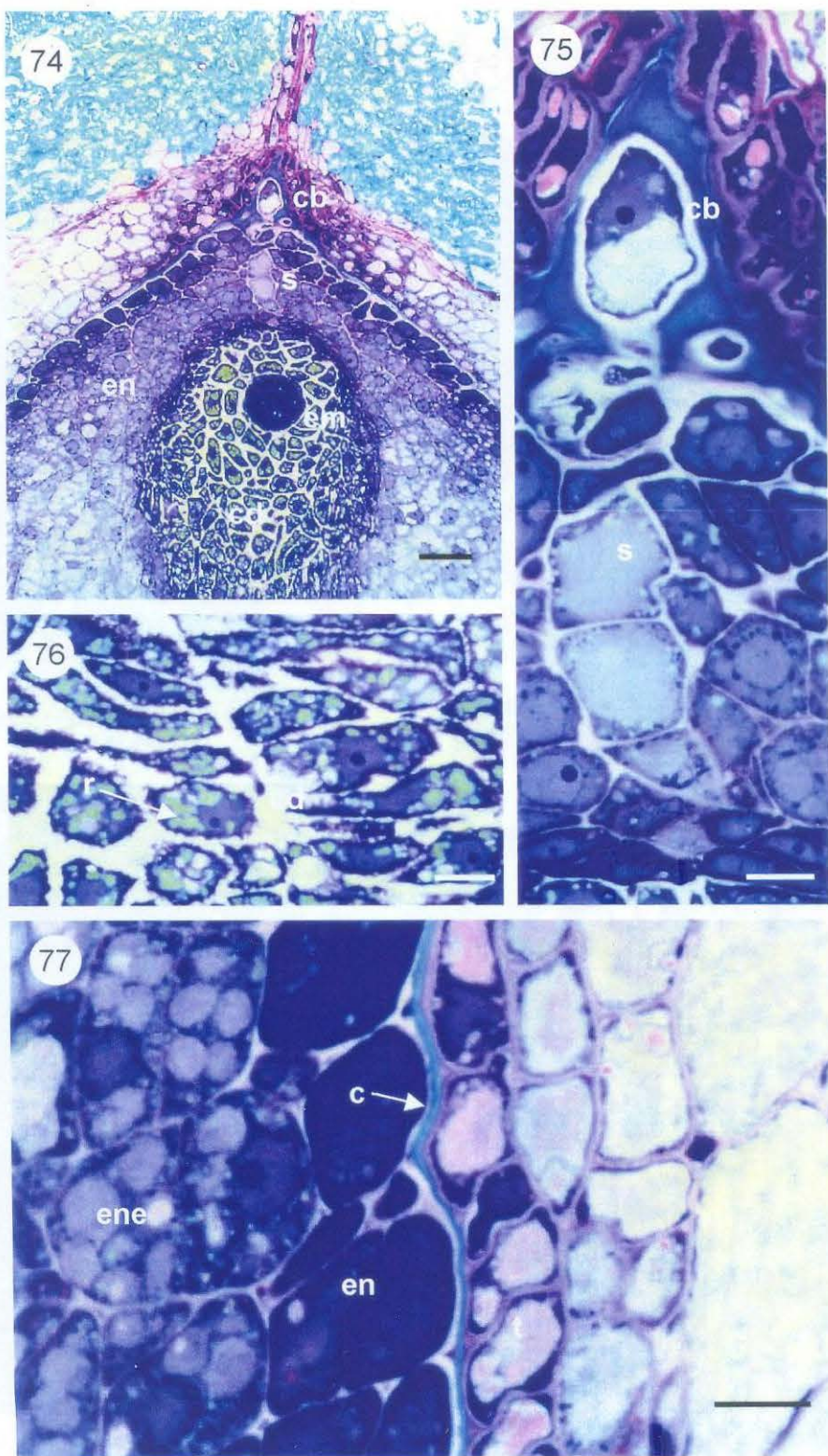
Figs. 62 a 65: Fotomicrografias da embriogênese inicial em *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secções longitudinais. 62. Proembrião bicelular, com célula basal (cb) e vacúolo (v) no polo micropilar, célula apical (ca) com vacúolo (v) de mesma orientação; endosperma (en); tegumento (t), barra=10 μ m; 63. Proembrião linear com três células; célula basal (cb), célula apical se dividiu, dando origem às células (I) e (I'); reservas protéicas (pr) no embrião e tegumento; endosperma (en); tegumento (t), barra=10 μ m; 64. Proembrião linear com cinco células, derivadas da célula I'; célula basal (cb); endosperma (en); tegumento (t), barra=20 μ m; 65. Proembrião linear com sete células, célula basal (cb); endosperma (en); tegumento (t), barra=20 μ m



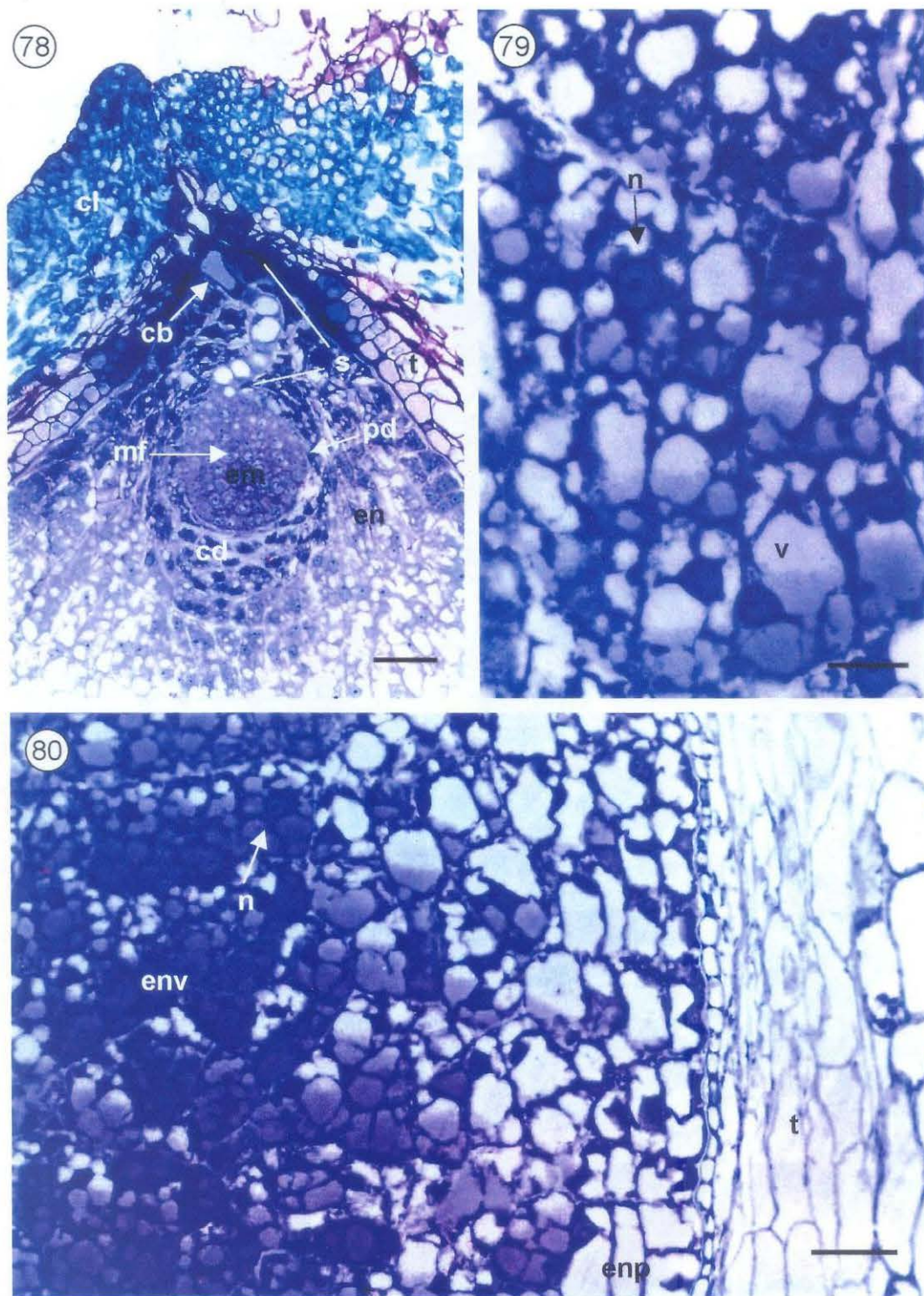
Figs. 66 a 69: Fotomicrografias da embriogênese inicial de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secções longitudinais. 66. Aspecto geral de proembrião com sete células, com divisão longitudinal de uma das células do suspensor (st) e célula basal com vacúolo no polo micropilar; endosperma (en); tegumento (t), barra=10µm; 67. Detalhe da divisão longitudinal (dl) da célula em posição calazal do proembrião com sete células, que origina o embrião quadrante; hipófise (hi); endosperma (en), barra=10µm; 68. e 69. Vista do embrião quadrante, em dois planos de foco. Em detalhe, célula subapical após a divisão, com um dos núcleos presentes na figura 68 (n1) e outro na figura 69 (n2); suspensor (s), barra=10µm



Figs.: 70 a 73: Fotomicrografias da embriogênese inicial em *Ilex paraguariensis* St.Hil., em secções longitudinais. 70. Proembrião octante, núcleos (n) proeminentes e ocorrência de divisões longitudinais (dl); endosperma (en), barra=10 μ m; 71. Proembrião pós-octante, célula em telófase (te), que originará a protoderme; endosperma (en), barra=10 μ m; 72. Proembrião pós-octante, células que compõe o suspensor estão em outra secção; acúmulo de corpúsculos vináceos (cv) na região micropilar e células do tegumento (t); endosperma (en), barra=20 μ m; 73. Embrião piriforme com protoderme (pd), meristema fundamental (mf), início de formação da cavidade digestora (cd); espaços intercelulares próximos ao suspensor (s) com substâncias pécicas e/ou proteínas (sp/p); células do tegumento (t) com acúmulo de substâncias róseas; hipófise (hi); endosperma (en), barra=20 μ m



Figs. 74 a 77: Fotomicrografias de secções semifinas, de embrião de *Ilex paraguariensis* St.Hil., em estágio globular, em secções longitudinais. 74. Vista geral do embrião (em) com suspensor (s) e célula basal (cb), circundados por endosperma (en) íntegro, e em processo de digestão, formando a cavidade digestora (cd), barra=100 μ m; 75. Detalhe do suspensor (s) com célula basal (cb) em destaque, barra=100 μ m; 76. Detalhe das células da cavidade digestora, células com substâncias de reserva (r), barra=100 μ m; 77. Zona limitrofe entre endosperma e tegumento: células do tegumento (t) com conteúdo róseo; endosperma com cutícula (c), células da camada externa do endosperma (en), não especializadas, mais internamente com início de especialização (ene), barra=100 μ m



Figs. 78 a 80: Fotomicrografias, de embrião de *Ilex paraguariensis* St. Hil. em estágio globular, em secções longitudinais 78. Embrião (em), com protoderme (pd) e meristema fundamental (mf) diferenciados; suspensor (s), célula basal (cb) evidente; tegumento (t); células do endosperma (en) em diferenciação e início de formação da cavidade digestora (cd); "capuz" de células lignificadas na região micropilar (cl), barra=50 μ m; 79. Detalhe das células do endosperma, em diferenciação, formando vacúolos (v); núcleo (n), barra=20 μ m; 80. Gradiente de diferenciação das células do endosperma: à direita, células do tegumento (t), em lise, epiderme e células adjacentes do endosperma pouco (enp) diferenciadas com vacúolos grandes, seguindo à esquerda, em direção ao embrião, vacúolos menores e em maior quantidade (env); núcleo (n), barra=10 μ m. Obs.: nas figuras 79 e 80 as secções foram submetidas ao reagente Coomassie Blue.

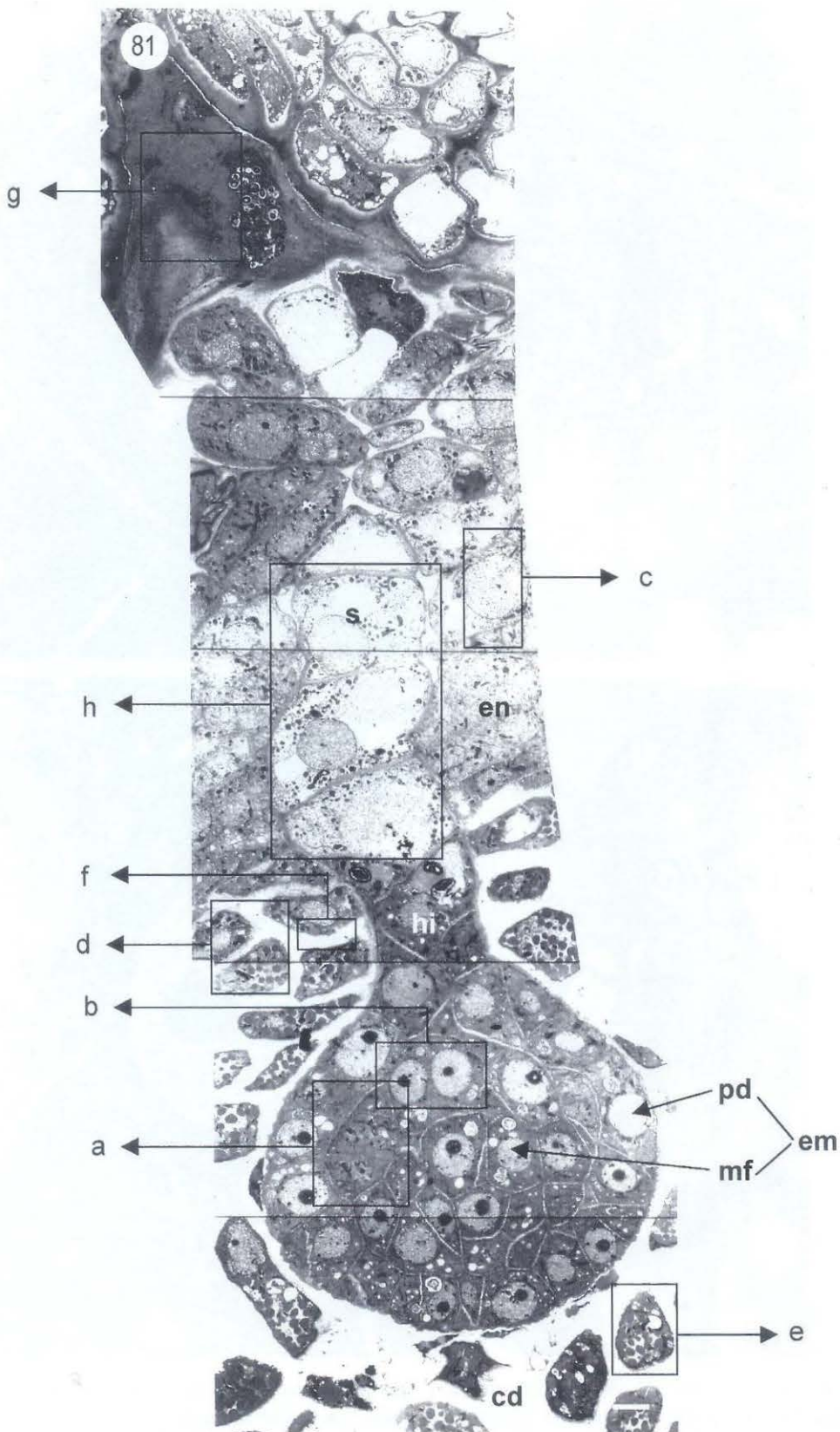
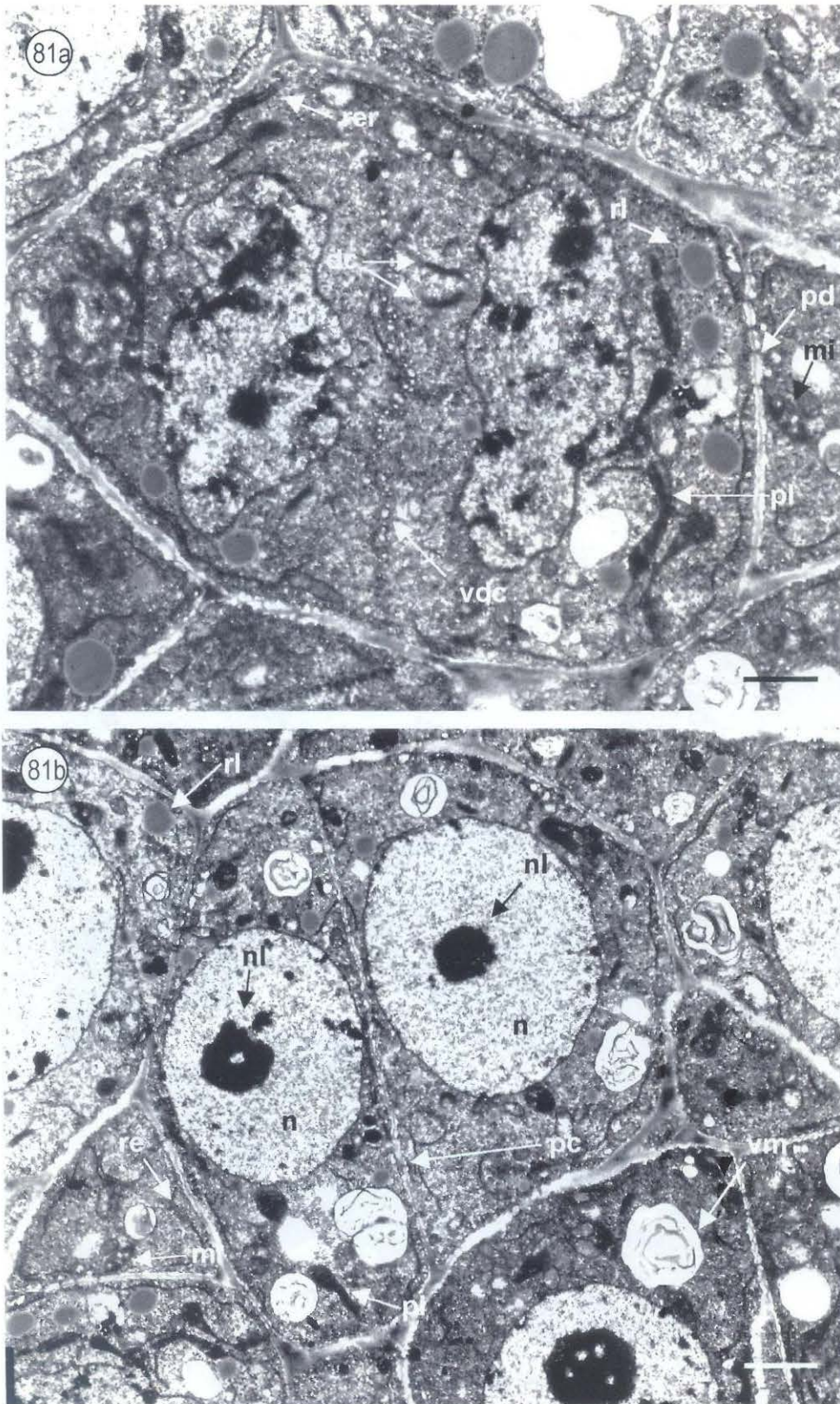
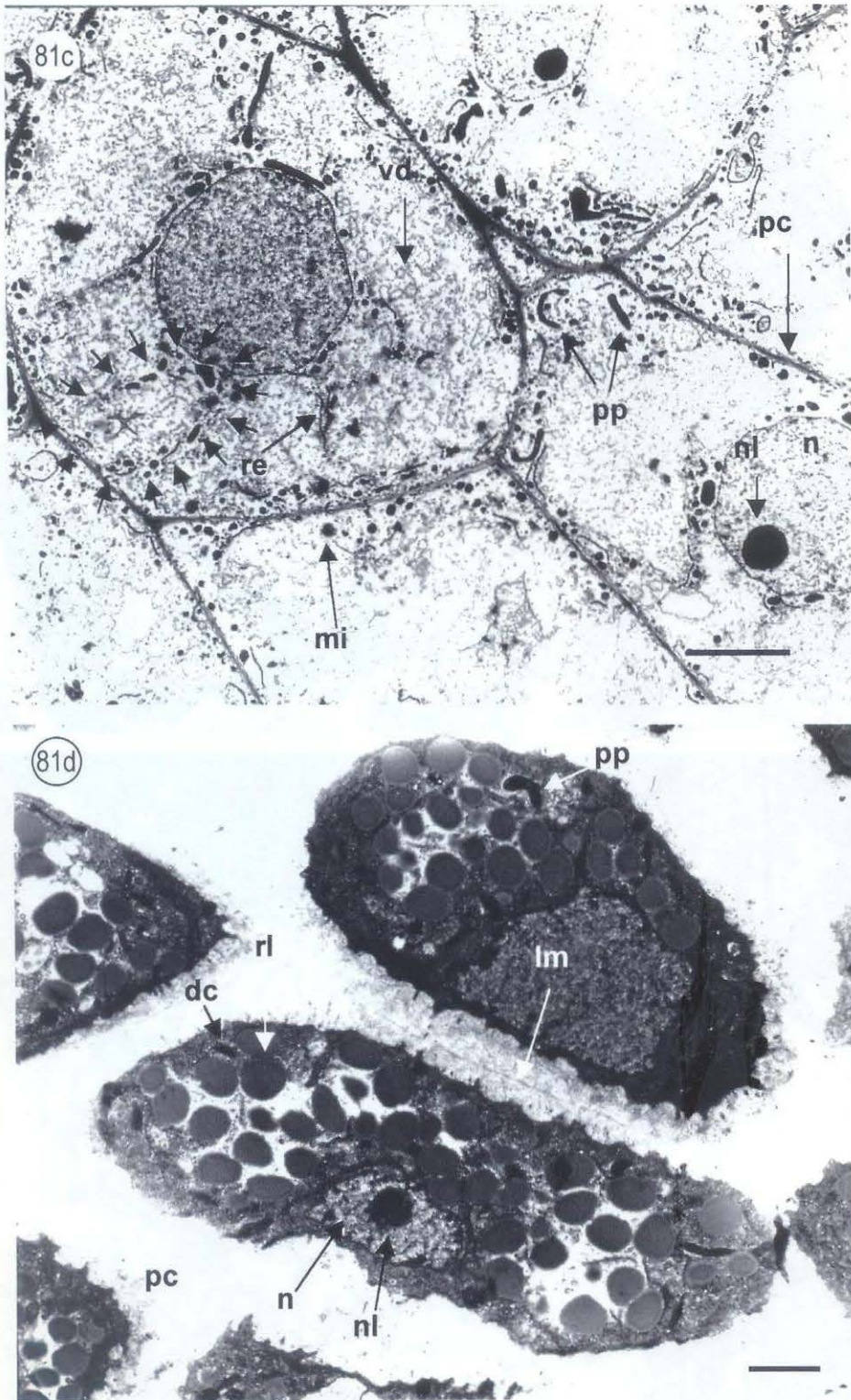


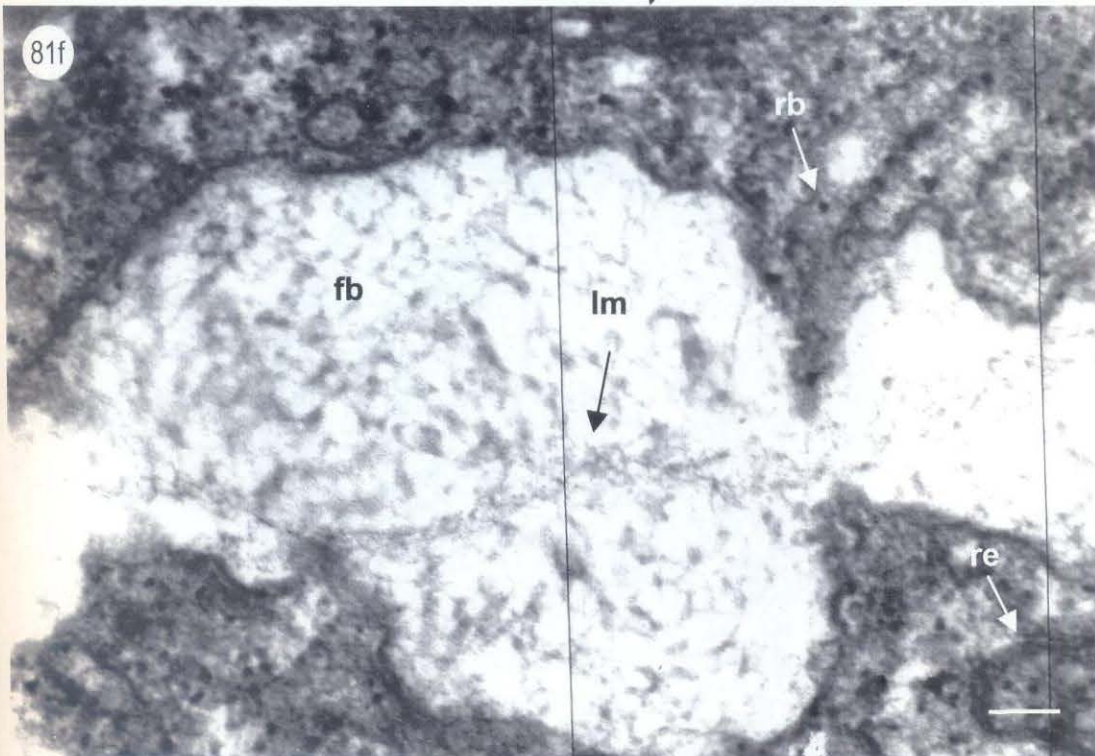
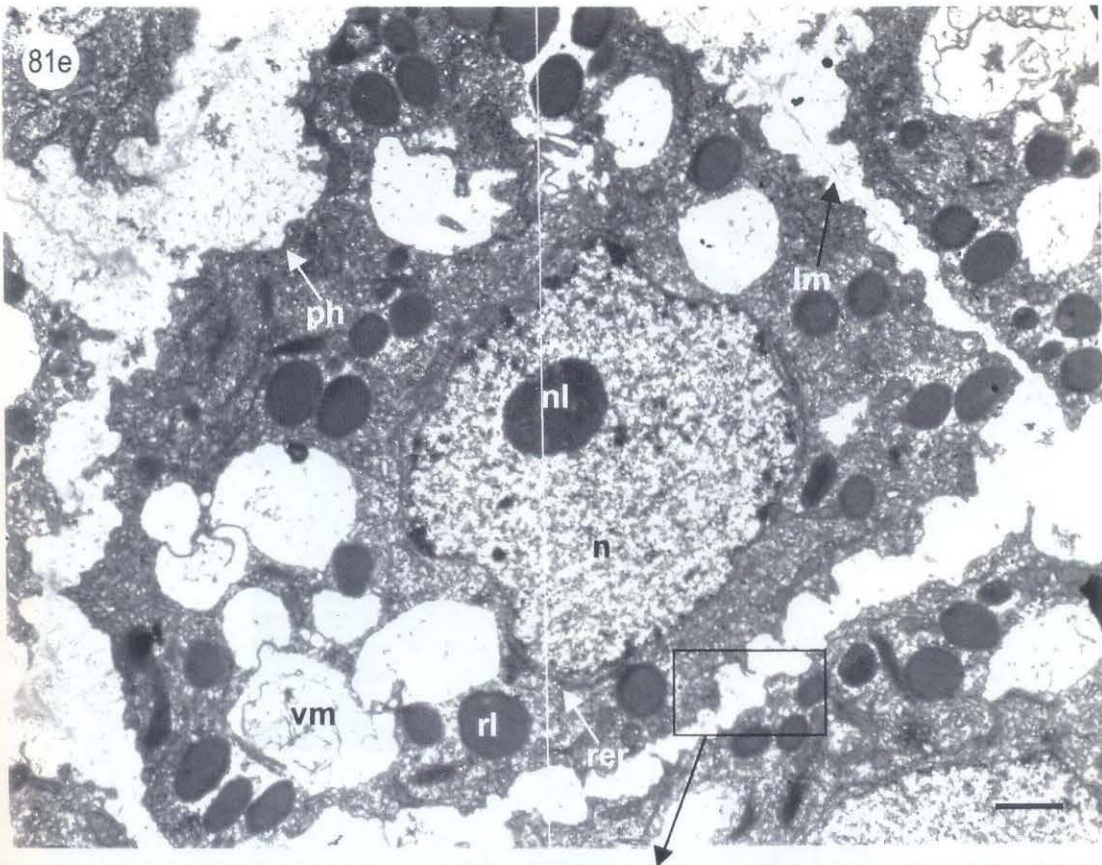
Fig. 81: Eletromicrografia em Microscopia de Transmissão de um embrião (em) de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em estágio globular, seccionado longitudinalmente, com protoderme (pd), meristema fundamental (mf), suspensor (s), hipófise (hi); endosperma (en) e cavidade digestora (cd), em evidência, barra=5 μ m. Detalhes de cada área demarcada, encontram-se nas figuras com as letras correspondentes.



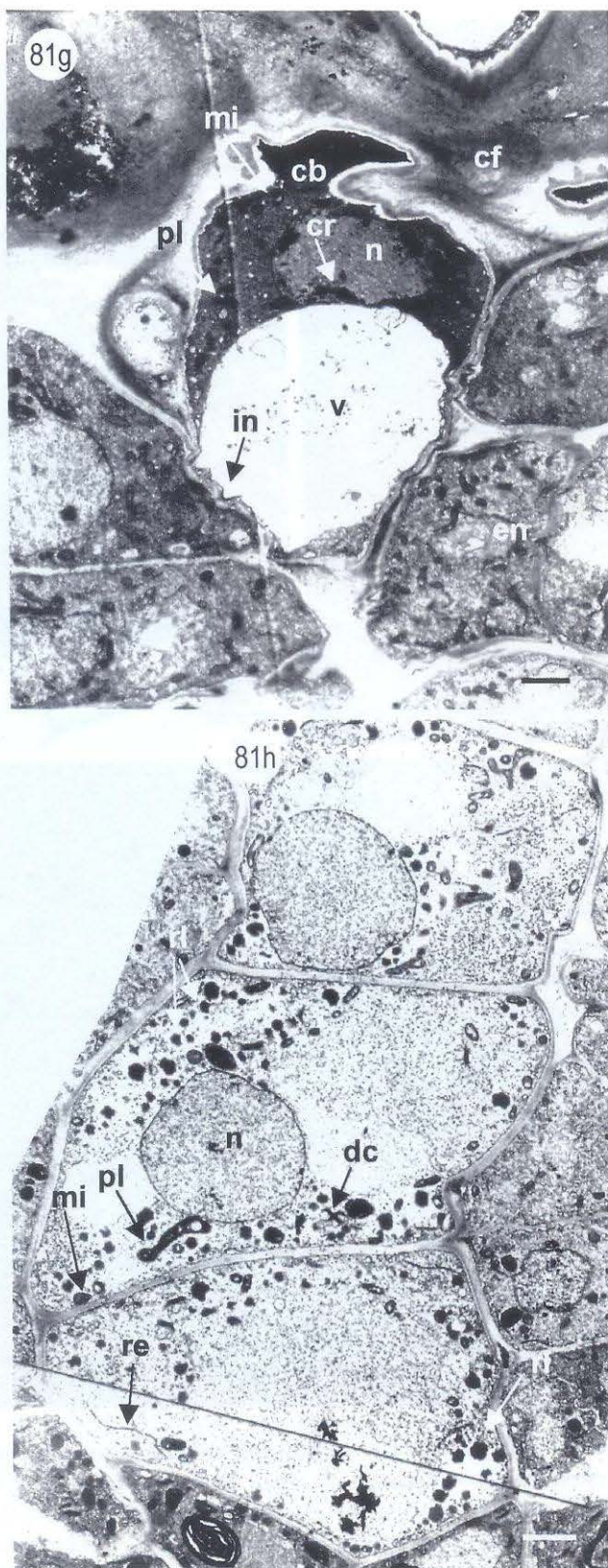
Figs. 81a, b: Eletromicrografias em Microscopia de Transmissão, de células de embrião de *Ilex paraguariensis* St. Hil. em estágio globular. **a.** Célula do embrião em divisão, início da formação da parede celular com vesículas dictiossômicas (vdc) na placa equatorial e dictiossomos (dc); plastídios (pl); mitocôndria (mi); núcleo (n) com cromatina ainda adensada, formação de reservas lipídicas (rl), retículo endoplasmático rugoso (rer), plasmodesmos (pl), barra=1 μ m; **b.** Célula do embrião, recém dividida, parede celular (pc), núcleos (n) com nucléolos (nl), vacúolos contendo enovelados de membranas (vm), reservas lipídicas (rl), retículo endoplasmático (re), plastídios (pl), mitocôndria (mi), barra=1 μ m



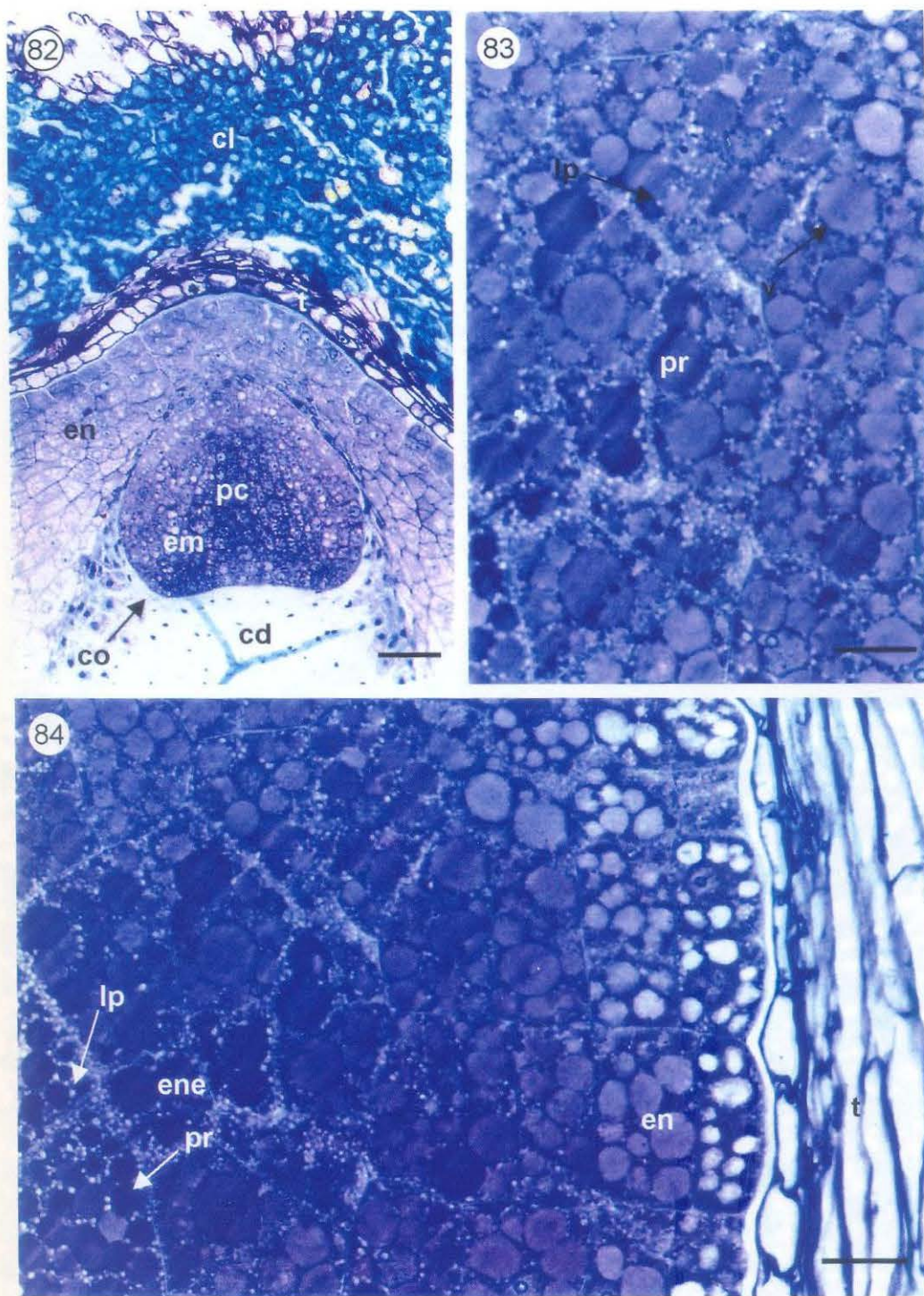
Figs. 81c, d: Eletromicrografias em Microscopia de Transmissão, de células do endosperma, de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil., embrião em estágio globular. c. Células da região lateral ao suspensor, com citoplasma denso, núcleo (n) em posição central, nucléolo (nl), grande quantidade de mitocôndrias (mi), parede celular (pc) pouco espessada, vesículas dictiosômicas (vd), proplastídios (pp), retículo endoplasmático (re); setas indicam início de formação de vacúolo que irá acumular proteínas, barra=8 μm ; d. Célula do endosperma localizada na cavidade digestora, parede celular (pc) expandida, lamela média (lm) identificável, núcleo (n) e nucléolo (nl), grande quantidade de reservas lipídicas (rl), mitocôndrias (mi), dictiosomos (dc) e alguns proplastídios, barra=2 μm



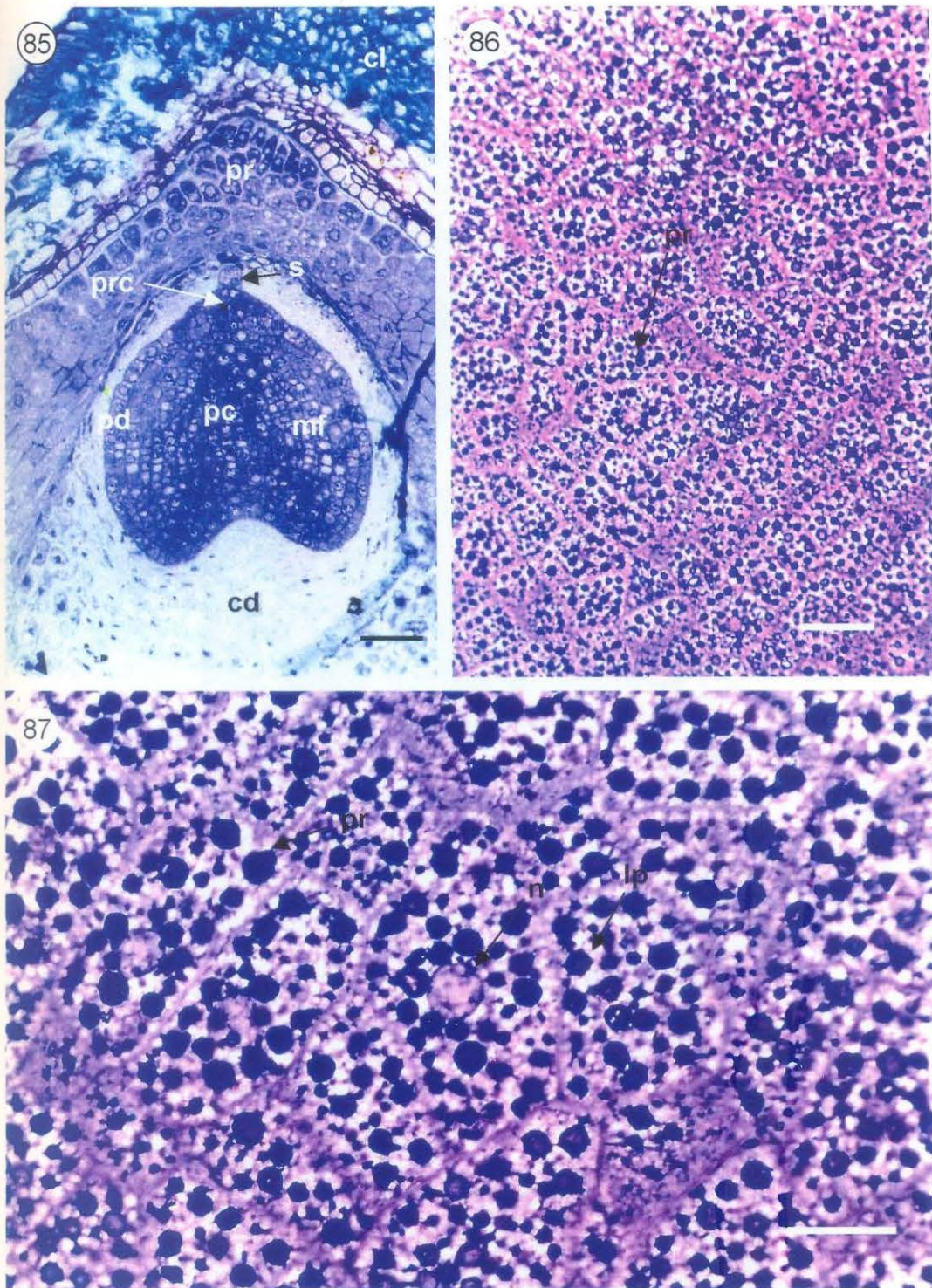
Figs. 81e, f: Eletromicrografias em Microscopia de Transmissão, de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil., embrião em estágio globular. Células do endosperma, durante a formação da cavidade digestora. e. Célula com paredes altamente hidratadas (ph), com lamela média (lm); núcleo (n) e nucléolo (nl), reservas lipídicas (rl); retículo endoplasmático rugoso (rer), vacúolos contendo enovelado de membranas (vm), barra=1 μ m f. Detalhe da parede celular expandida, com aspecto fibrilar alterado (fb) e lamela média (lm); grande quantidade de ribossomos (rb) e retículo endoplasmático (re) próximos à plasmalema, barra=100nm



Figs. **81g, h**: Eletromicrografias em Microscopia de Transmissão, de células do suspensor de embrião de *Ilex paraguariensis* St. Hil. em estágio globular. **g.** Célula basal (cb) com invaginações (in) e vacúolo (v) no polo calazal, núcleo (n) com cromatina adensada, mitocôndria (mi), plastídios (pl), dictiossomos (dc); parede periclinal externa envolta por compostos fenólicos (cf), endosperma (en), barra=2 μ m; **h.** Células do suspensor, com núcleo (n) ativo, poucos plastídios (pl), poucas reservas lipídicas (rl), mitocôndrias (mi), dictiossomos (dc), retículo endoplasmático (re), barra=2 μ m



Figs. 82 a 84: Fotomicrografias, de secções longitudinais de embrião de *Ilex paraguariensis* St. Hil. em estágio cotiledonar. 82. Embrião (em) com início de formação de cotilédones (co), procâmbio (pc); cavidade digestora (cd) e células do endosperma (en); tegumento (t); "capuz" de células lignificadas na região micropilar (cl), barra=50 μ m; 83. Detalhe de células do endosperma, com vacúolos (v) com acúmulo reservas protéicas (pr), lipídios (lp) contornando os mesmos, barra=20 μ m; 84. Gradiente de diferenciação das células do endosperma: à direita, células do tegumento (t), em lise; epiderme e células adjacentes do endosperma (en) com vacúolos com pouca quantidade de substâncias protéicas; à esquerda, em direção ao embrião (ene), grande quantidade de vacúolos protéicos (pr), circundados por lipídios (lp), barra=10 μ m. Nas figuras 83 e 84 as secções foram submetidas ao reagente Coomassie Blue.



Figs. 85 a 87: Fotomicrografias, de secções longitudinais de embrião cordiforme de *Ilex paraguariensis* St. Hil.. 85. Aspecto geral do embrião, com protoderme (pd), meristema fundamental (mf), procâmbio (pc), e primórdio radicular (prc) diferenciados; cavidade digestora envolvendo o embrião (cd) e acúmulo de proteínas (pr) na região micropilar do endosperma; tegumento (t); "capuz" de células lignificadas (cl), na região micropilar; barra=50µm; 86. Aspecto geral do endosperma com células especializadas, contendo proteínas (pr) circundadas por lipídios (lp); núcleo (n), barra=20µm; 87. Detalhe de células do endosperma, evidenciando proteínas (pr) circundadas por lipídios (lp); núcleo (n), barra=10µm. Nas figuras 86 e 87 as secções foram submetidas ao reagente Coomassie Blue.

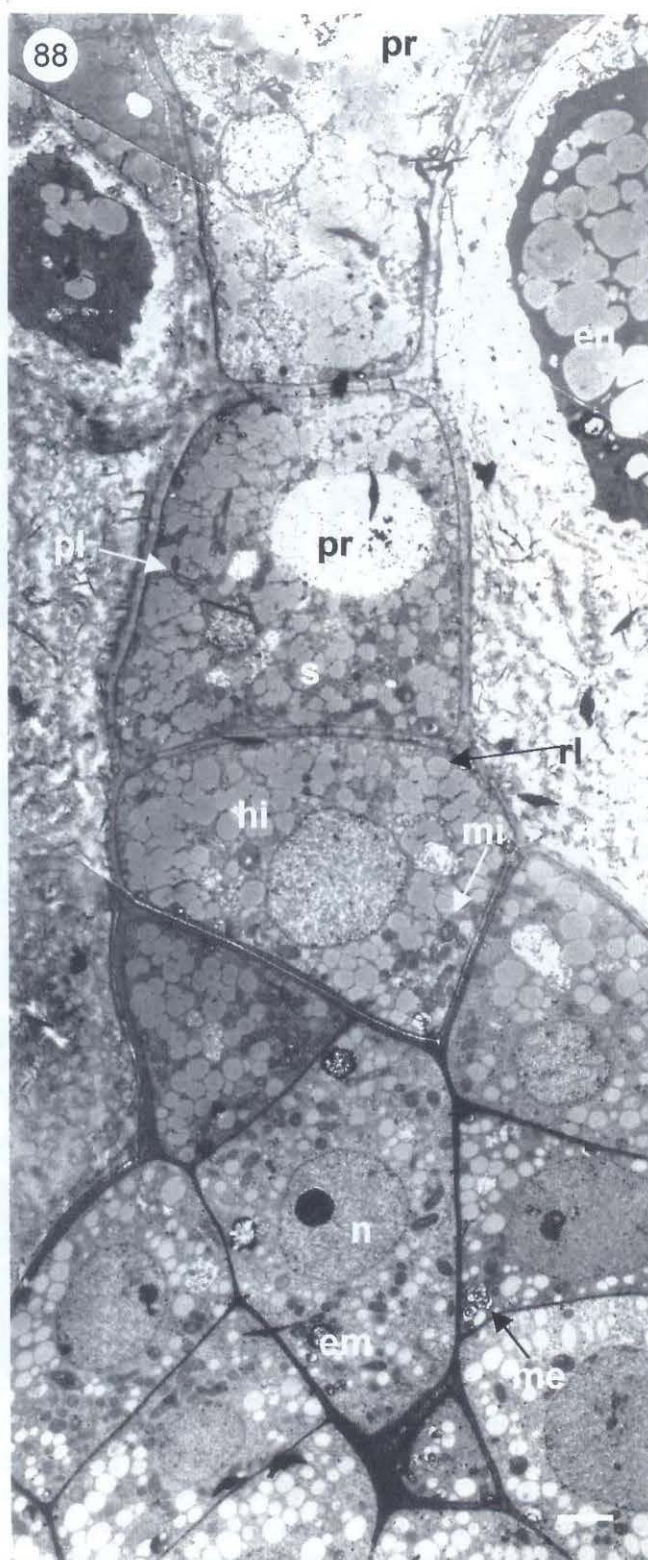
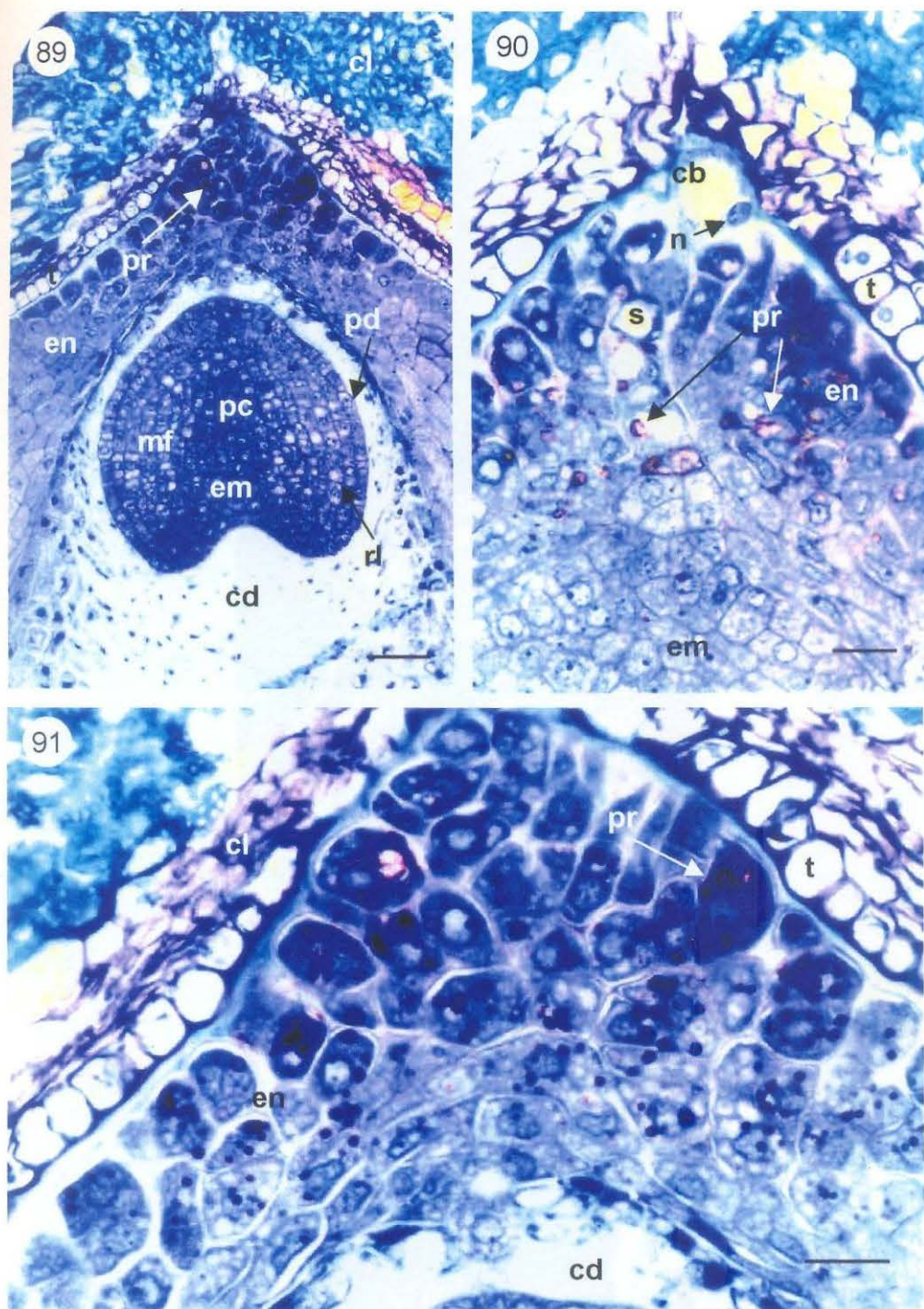


Fig. 88: Eletromicrografia em Microscopia de Transmissão, de parte do embrião cordiforme de *Ilex paraguariensis* St. Hil.. Células do suspensor (s), hipófise (hi), parte da protoderme e meristema fundamental do embrião (em), algumas células com núcleo bem evidente (n); endosperma (en) nos flancos do suspensor; reservas lipídicas (rl) e protéicas (pr) presentes em todas as células, grande quantidade de mitocôndrias (mi), enovelados de membrana (me), plastídios (pl), barra=2 μ m;



Figs. 89 a 91: Fotomicrografias de secções longitudinais de sementes de *Ilex paraguariensis* St Hil., de frutos maduros, coletados em 20/12/95-FZB-RS. 89. Aspecto geral do embrião (em) em estágio cordiforme, protoderme (pd), meristema fundamental (mf) e procâmbio (pc) diferenciados; grânulos protéicos (pr), formando mássulas, na região micropilar; início de acúmulo de reservas lipídicas (rl) no embrião; cavidade digestora (cd); endosperma (en); tegumento (t); células do "capuz", lignificadas (cl), barra=50 μ m; 90. Detalhe da região micropilar, embrião (em), suspensor (s), célula basal (cb) com núcleo e grande vacúolo; suspensor e endosperma (en), com grânulos protéicos (pr); células do tegumento (t) com substâncias esverdeadas (compostos fenólicos), barra=20 μ m; 91. Células do endosperma (en), na região micropilar, com acúmulo de grânulos protéicos (pr); cavidade digestora (cd), tegumento (t) com células em lise (cl), barra=20 μ m

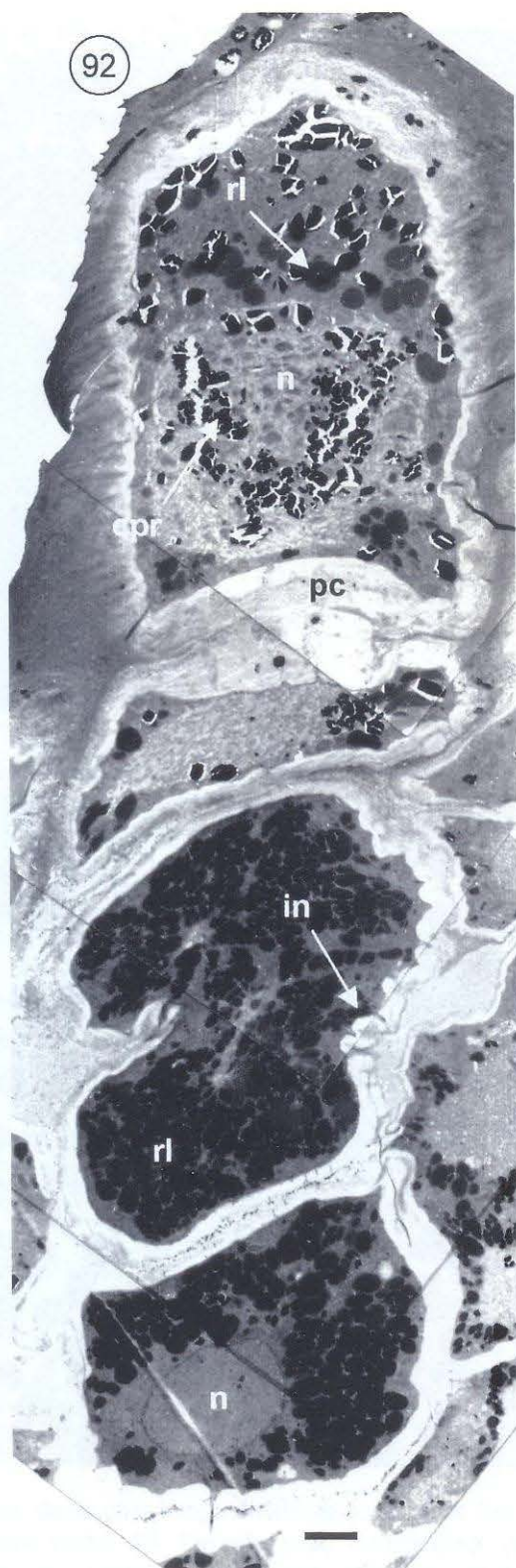
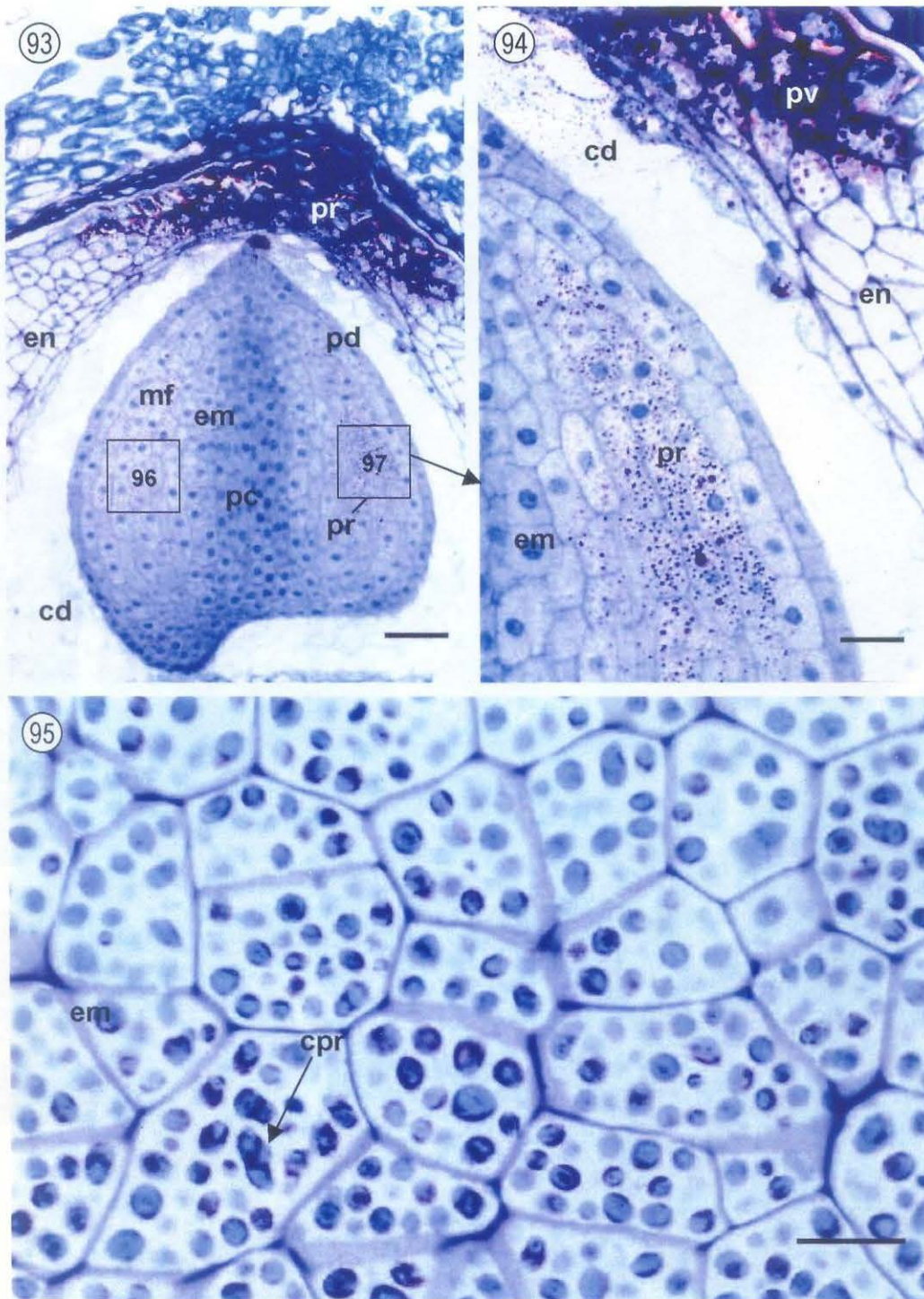


Fig. 92: Eletromicrografias em Microscopia de Transmissão, de embrião de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em estágio cordiforme. Suspensor em processo de Morte Celular Programada (MCP-Apoptose); célula basal (cb) com proteínas cristalizadas (cpr), estas não presentes nas células adjacentes; núcleo aparentemente picnótico (n), presença de reservas lipídicas (rl); parede celular muito espessa (pc); células do suspensor adjacentes à célula basal com grande quantidade de reservas lipídicas (rl), núcleo (n) e carioteca evidentes, paredes espessas, com invaginações (in), barra=2 μ m



Figs. 93 a 95: Fotomicrografias, de secções longitudinais, de semente de *Ilex paraguariensis* St.Hil. com embrião em estágio cordiforme tardio. 93. Embrião (em) evidenciando protoderme (pd), meristema fundamental (mf) e procâmbio (pc), rodeado pela cavidade digestora (cd) e endosperma (en); proteínas de coloração vinácea (pr) na região micropilar do endosperma e no meristema fundamental do embrião (detalhe em M..ET., fig. 96), barra=50µm; 94. Detalhe da figura 93 em M.O. e da mesma região, em M.E.T., fig. 97, barra=20µm; 95. Detalhe da zona do meristema fundamental (cortical) do embrião (em), salientando os corpos protéicos (cpr), com acúmulo destas substâncias em posição periférica, barra=10µm

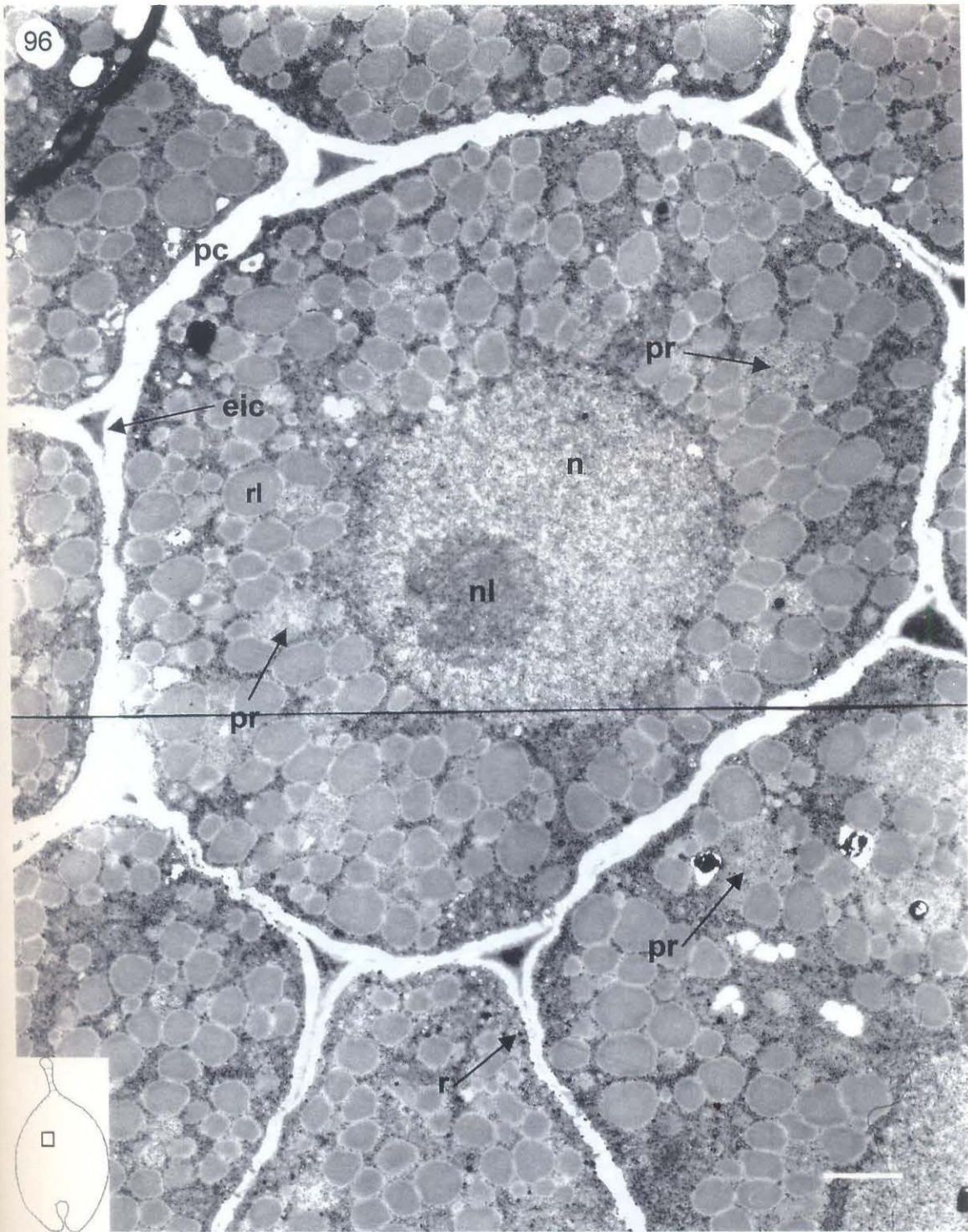


Fig. 96: Eletromicrografia em Microscopia de Transmissão, de células da região assinalada no detalhe, de embrião em estágio cordiforme tardio, de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Núcleo (n) de posição central, nucléolo (nl) evidente, grande quantidade de reservas lipídicas (rl), início de síntese protéica (pr); parede celular (pc) com espaços intrcelulares (eic), ribossomos (r) em pequena quantidade, barra=1 μ m.

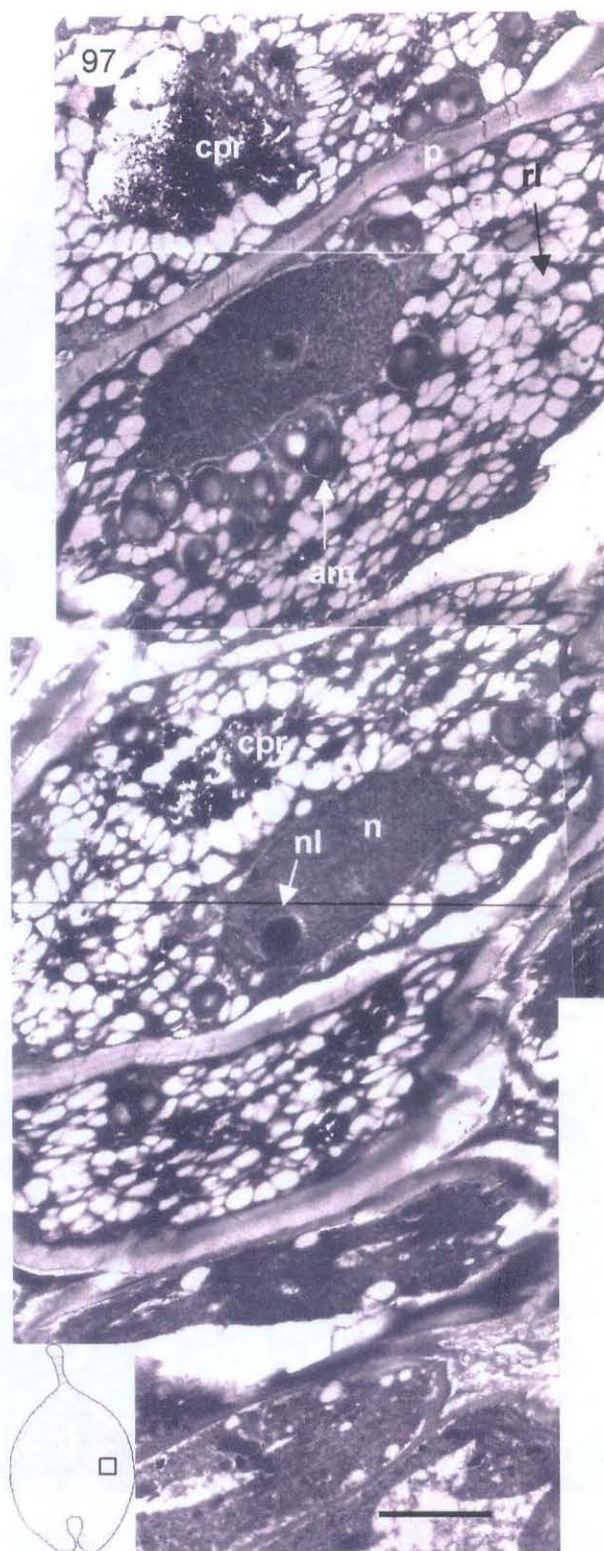
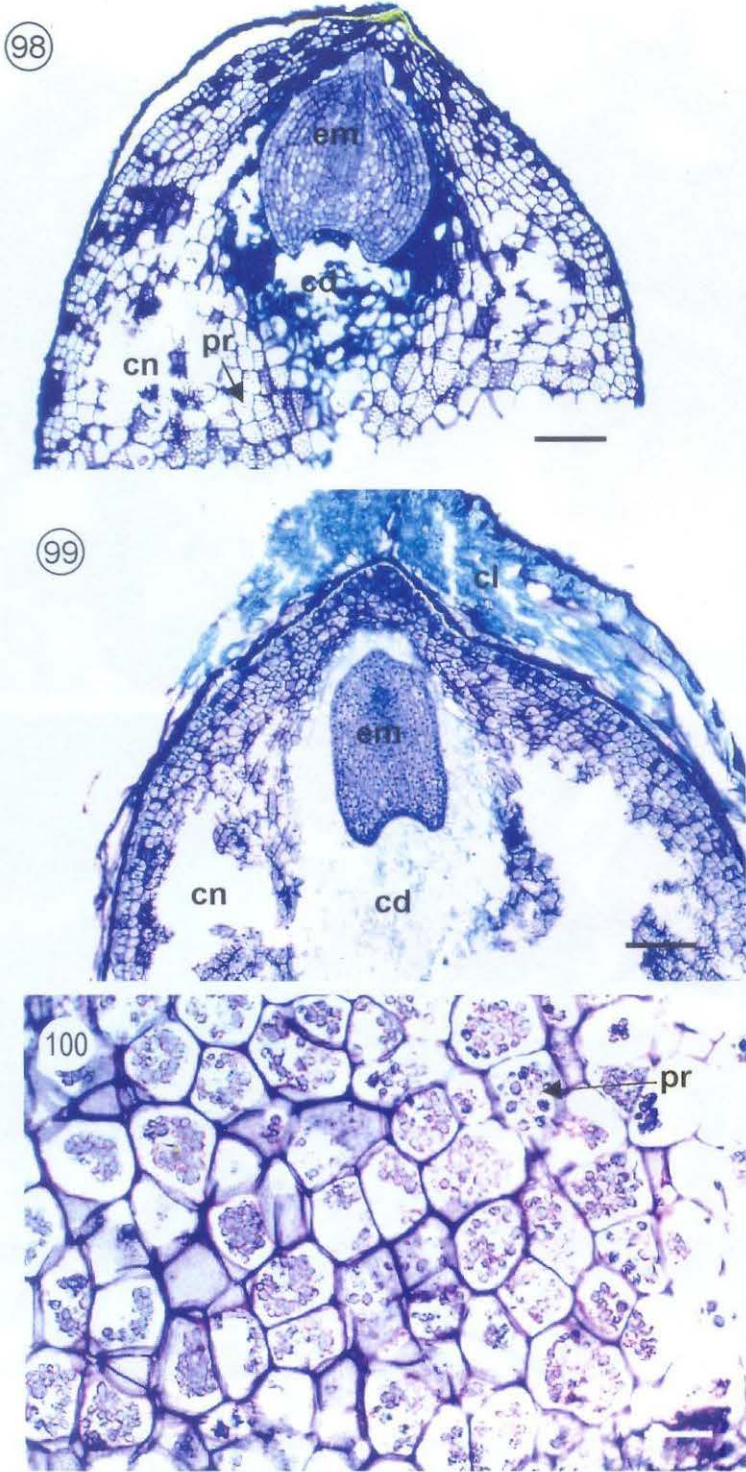
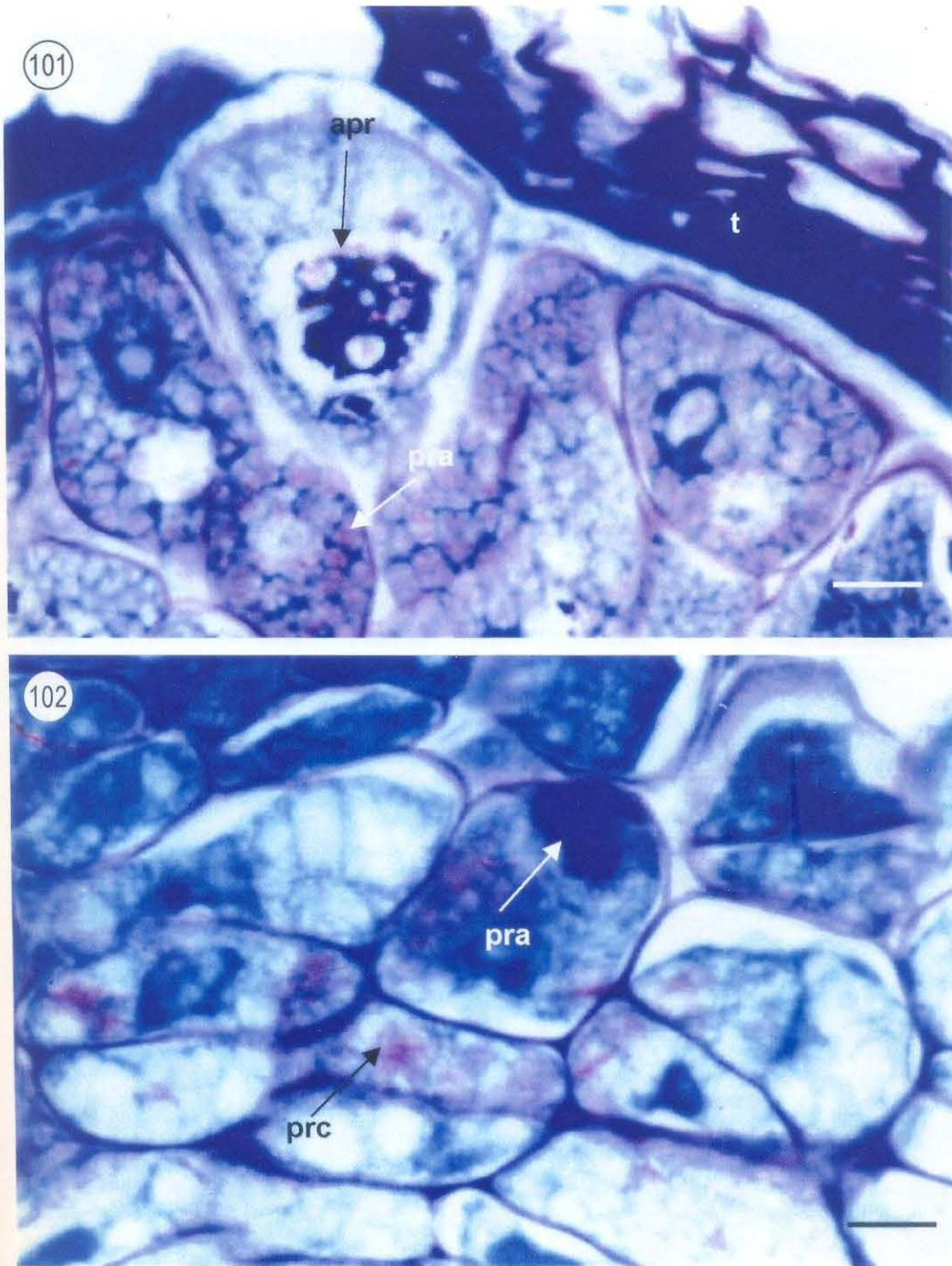


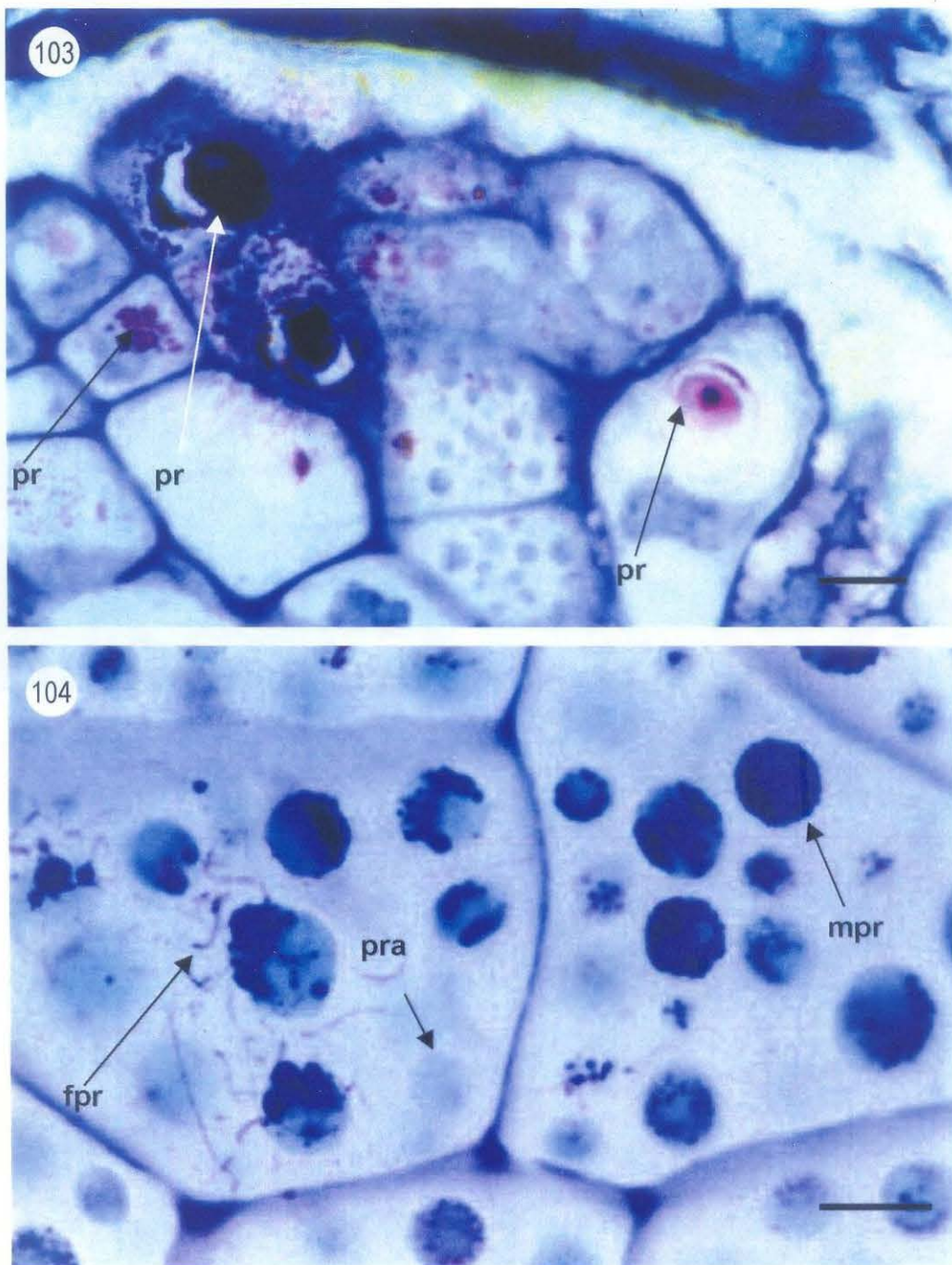
Fig. 97: Eletromicrografias em Microscopia de Transmissão, de células do meristema fundamental, região assinalada no detalhe, de embrião em estágio cordiforme tardio, de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil.. O material não passou pelo processo de osmificação em bloco. Núcleos (n) e nucléolos (nl) evidentes, grande quantidade com reservas lipídicas (rl), vacúolos com proteínas cristalizadas (cpr), amiloplastos (am) e parede celular (p) com pontoações, barra=3 μ m



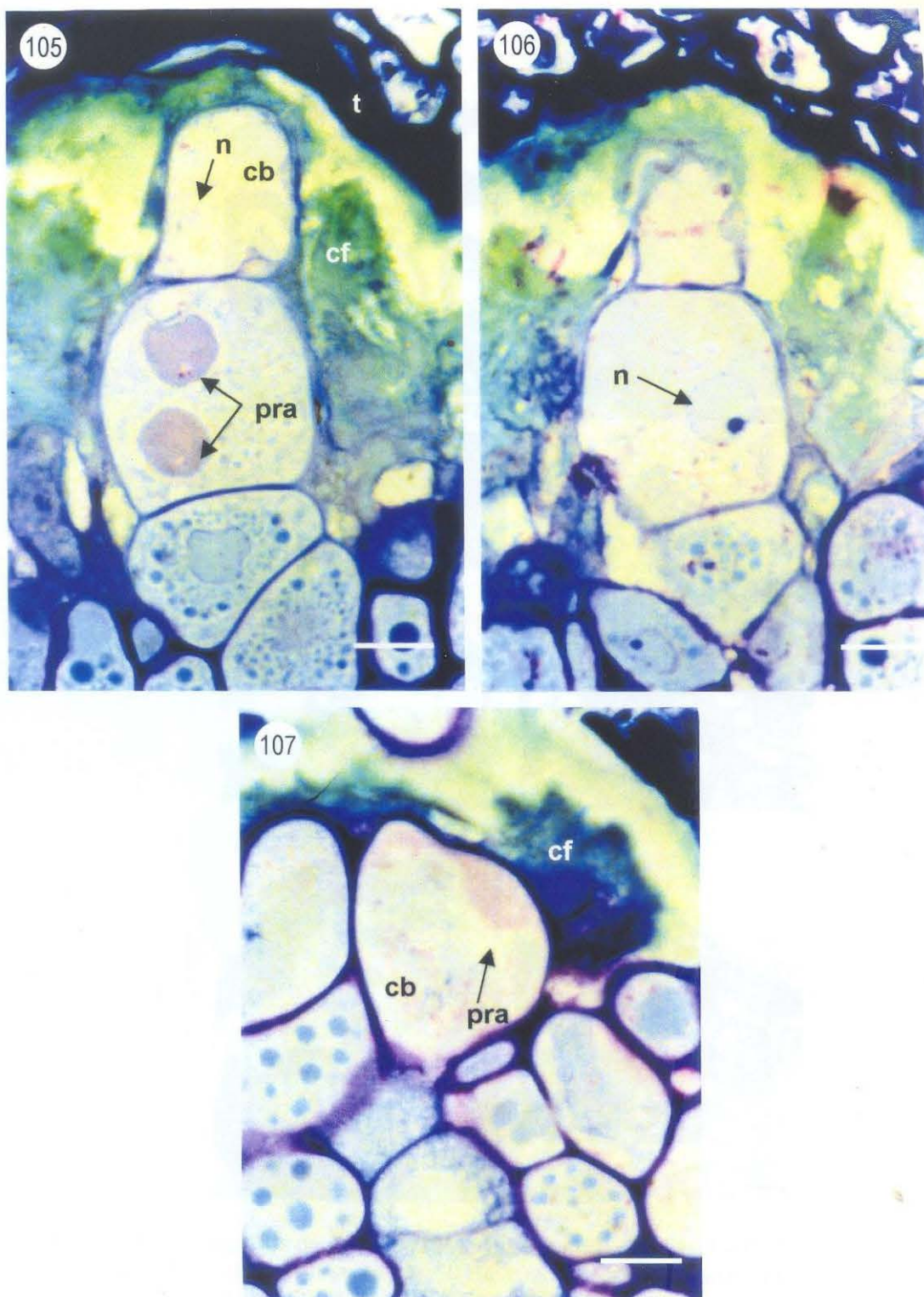
Figs. 98 a 100: Fotomicrografias de embrião e endosperma de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secções longitudinais, submetidas a processos de extração as proteínas. 98. Aspecto geral da semente tratada com ácido trifluoroacético, contendo embrião (em) em estágio cordiforme, proteínas (pr) ainda presentes, células não-penetradas pela resina (cn); cavidade digestora (cd), barra=50 μ m; 99. Aspecto geral da semente tratada com solução para extração de proteínas totais; embrião (em) em estágio de pós-coração, células não-penetradas pela resina (cn), cavidade digestora (cd), células do "capuz" lignificado (cl) na região micopilar, barra=50 μ m; 100. Detalhe do endosperma da figura 99, com presença de proteínas (pr), não-extraídas após o processo anteriormente citado, barra=20 μ m



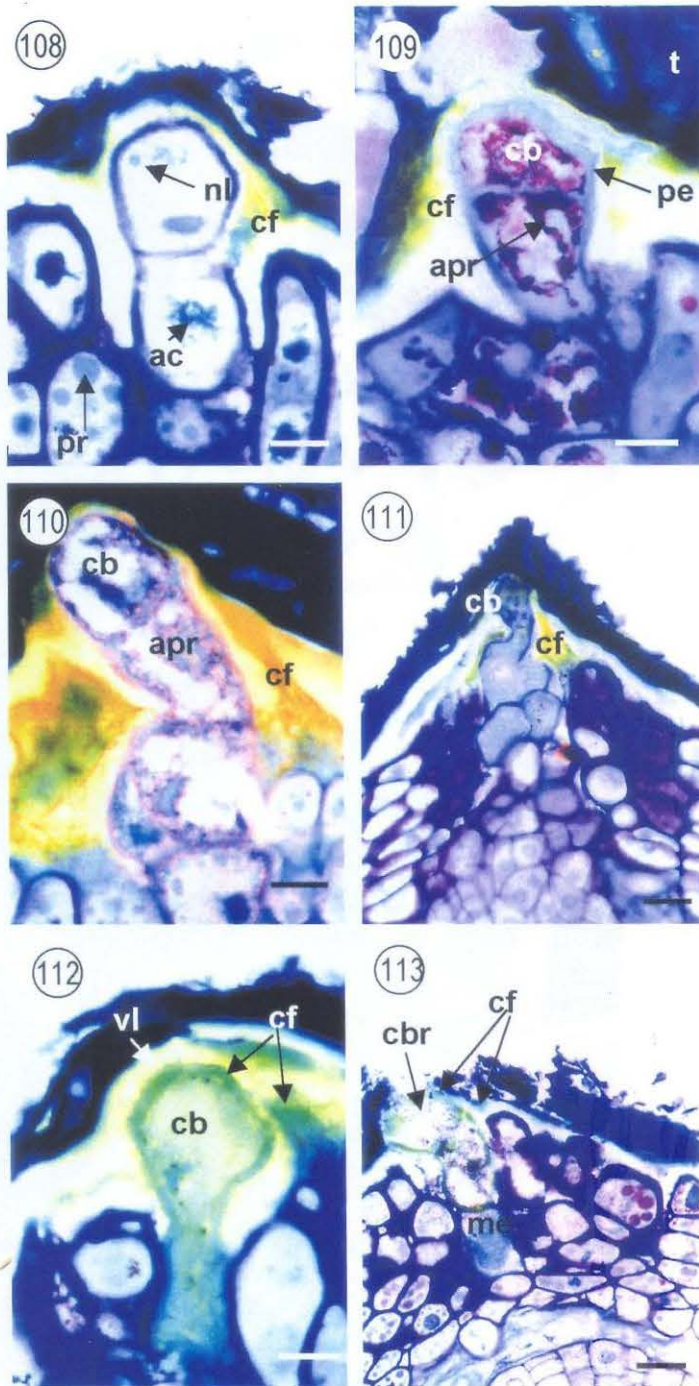
Figs. 101 e 102: Fotomicrografias de proteínas do endosperma na região micropilar, de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secções longitudinais. 101. Células com vacuoma contendo proteínas amorfas (pra) de coloração vinácea; células com adensamento de proteínas (apr) em vacúolos; tegumento (t), barra=20µm; 102. Proteínas sob forma de cristais tipo espículas (prc), no interior de vacúolos e proteínas amorfas (pra), barra=20µm



Figs. 103 e 104: Fotomicrografias, de diferentes padrões de proteínas em sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secções longitudinais. 103. Vacúolos na região micropilar do endosperma, com acúmulo de substâncias protéicas (mássulas-pr), barra=20 μ m; 104. Proteínas sob forma de filamentos (cadeias) protéicos (fpr), vacúolos com proteínas amorfas (pra) e vacúolos com mássulas protéicas (mpr), barra=10 μ m.



Figs. 105 a 107: Fotomicrografias do suspensor de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em início de Morte Celular Programada (MCP-Apoptose), em secção longitudinal. **105.** Célula do suspensor, abaixo da basal, com mássulas de proteínas amorfas (pra); compostos fenólicos (cf) envolvendo a célula basal e adjacente; núcleo (n) da célula basal (cb); tegumento (t), barra=10 μ m; **106.** Outra secção do mesmo material da fig. 105, mostrando o núcleo (n) da célula abaixo da basal, barra=10 μ m; **107.** Célula basal (cb) de outro embrião, com proteínas amorfas (pra) junto à parede celular, envoltas por halo hialino; compostos fenólicos (cf) envolvendo a célula basal e adjacentes, barra=10 μ m



Figs. 108 a 113: Fotomicrografias do processo de Morte Celular Programada (MCP-Apoptose) de células do suspensor em embriões de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secções longitudinais. **108.** Célula basal em início de MCP; nucléolo evidente (nl), célula posterior com adensamento de cromatina (ac); células do endosperma com vacúolos com proteínas amorfas (pr), barra=10 μ m; **109.** Célula basal e posterior com paredes espessadas (pe), condensação do citoplasma, adensamento protéico (apr); tegumento (t), barra=10 μ m; **110.** Célula basal (cb) e posterior, sem evidência de vitalidade, com adensamento protéico (apr), barra=10 μ m; **111.** Suspensor em avançado estágio de MCP, tanto da célula basal como das três adjacentes; grande quantidade de compostos fenólicos nas paredes e fora das células, redução do volume celular, barra=20 μ m; **112.** Célula basal desidratada, paredes espessadas, com vilosidades (vl) e compostos fenólicos, os mesmos sendo observados fora desta célula, barra=10 μ m; **113.** Célula basal rompida (cbr), paredes com compostos fenólicos (cf) e célula adjacente à esta com mássula de coloração esverdeada no seu interior (me), barra=20 μ m. Obs.: Destaque para a presença de compostos fenólicos (cf), ao redor da célula basal (região micropilar), em todas as figuras.

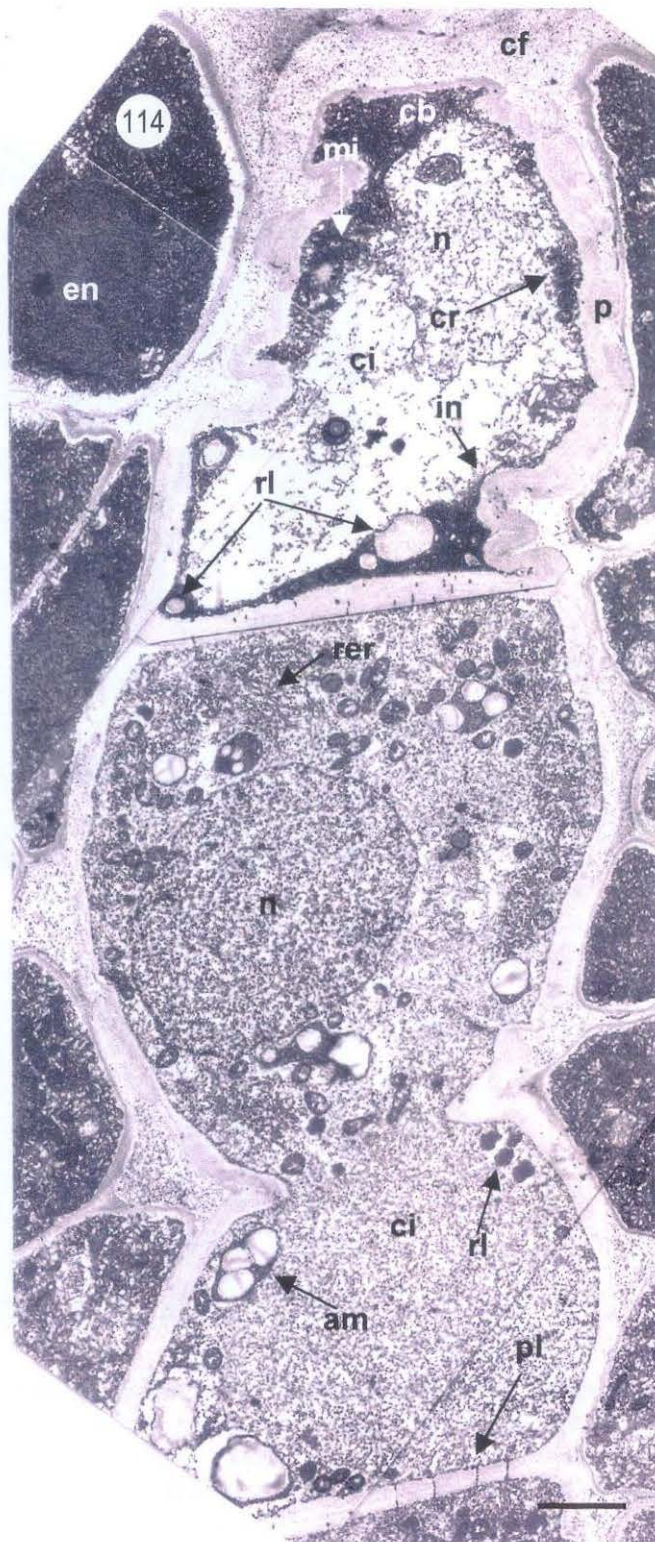
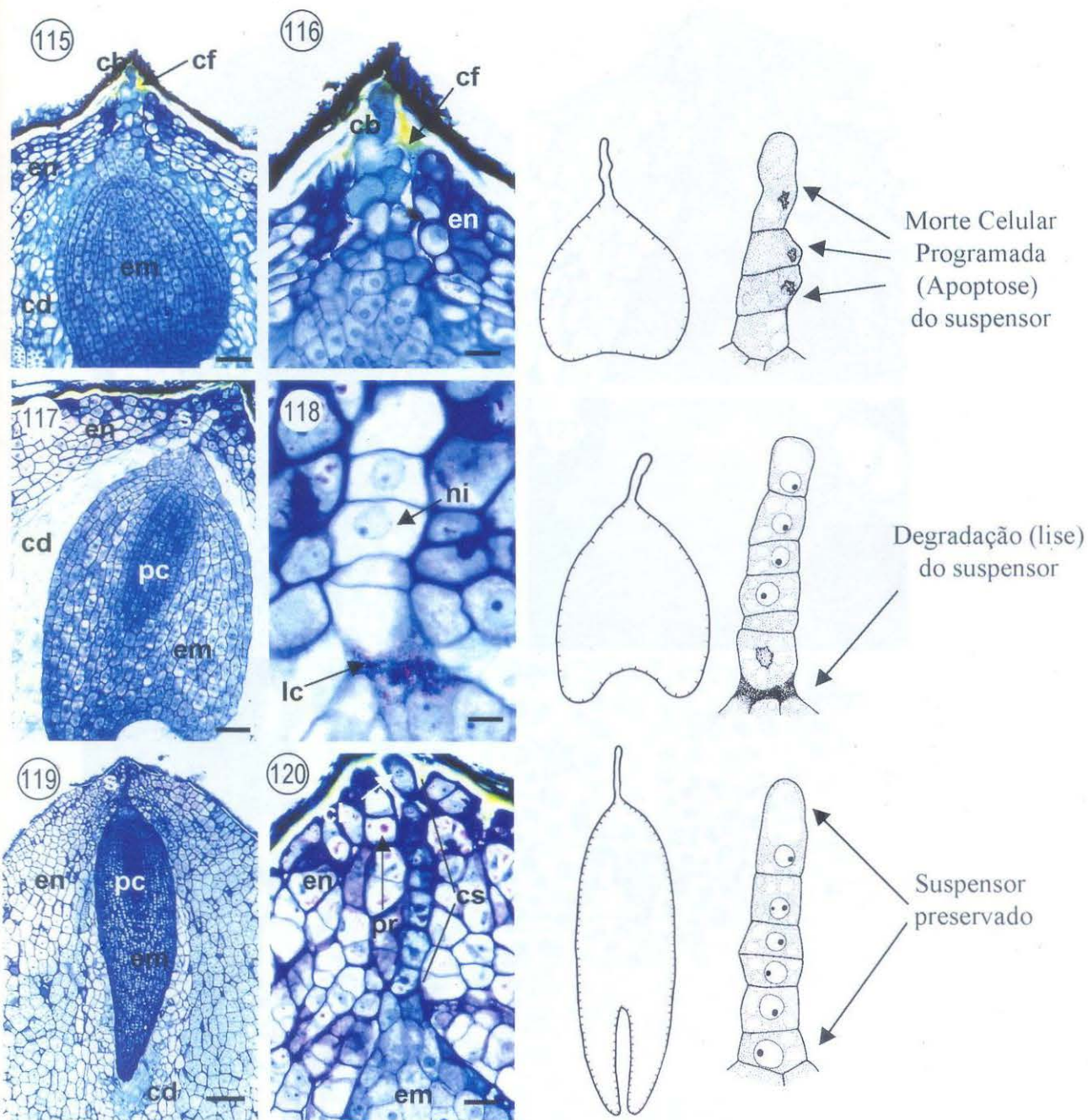
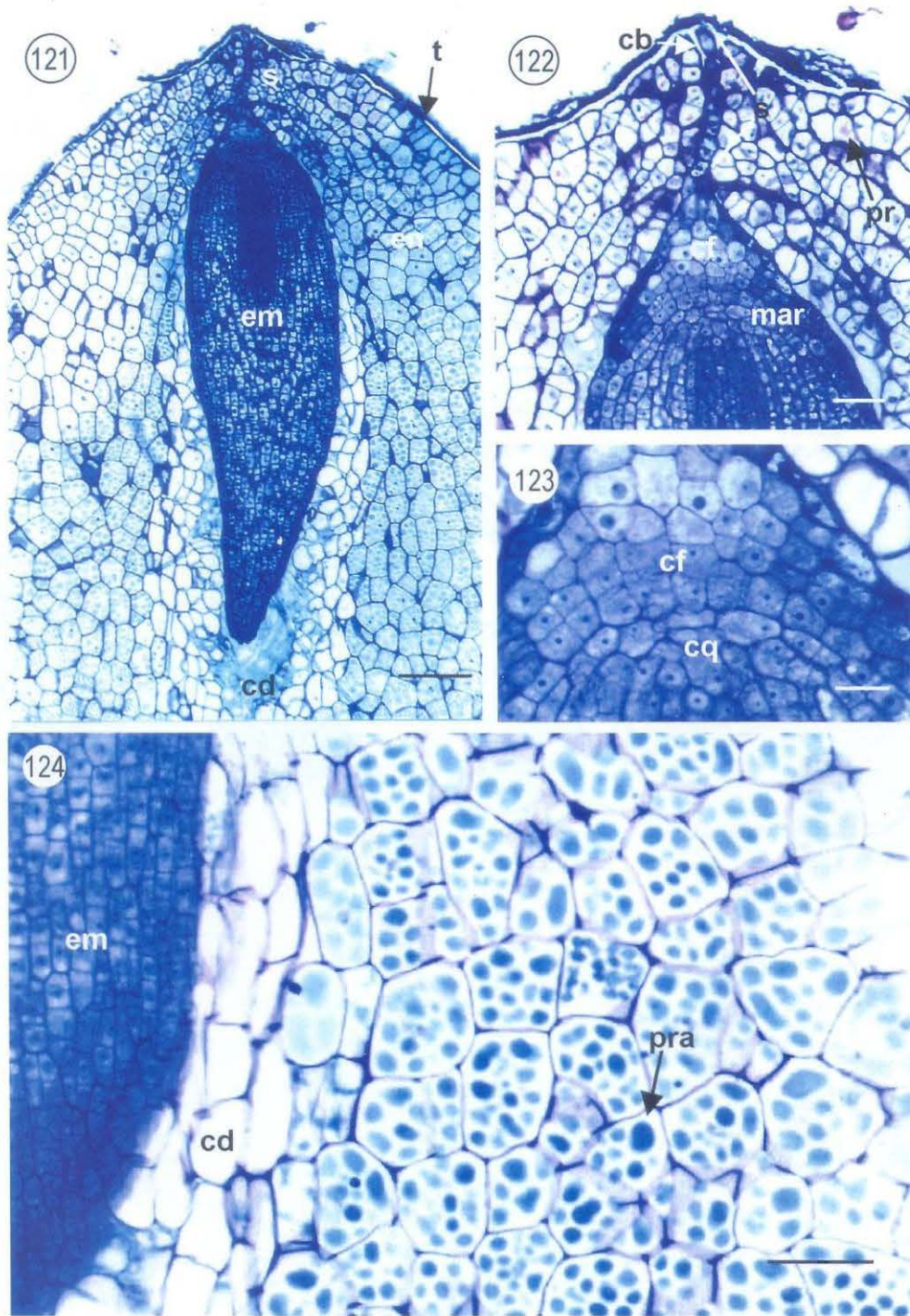


Fig. 114: Eletromicrografia em Microscopia de Transmissão, de embrião de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em estágio cordiforme, seccionado longitudinalmente. Suspensor com características de Morte Celular Programada (MCP-Apoptose); célula basal (cb) difere citologicamente das demais; citoplasma (ci) menos denso, cromatina (cr) desorganizada e agrupada no núcleo (n), paredes (p) espessas com invaginações (invilosidades); polo micopilar envolto por compostos fenólicos (cf); mitocôndrias (mi), endosperma (en). Demais células com citoplasma (ci) denso, grande quantidade amiloplastos (am), plasmodesmos (pl), núcleo (n) evidente, retículo endoplasmático rugoso (rer), poucas reservas lipídicas (rl), barra=3 μ m



Figs. 115 a 120: Fotomicrografias e esquemas, do comportamento do suspensor em *Ilex paraguariensis* Si. Hil. nas diversas fases da embriogênese, em secções longitudinais. 115. Embriões (em) em estágio cordiforme tardio com Morte Celular Programada (MCP-Apoptose) da célula basal (cb) e adjacentes; compostos fenólicos (cf), dentro e fora da célula; cavidade digestora (cd), endosperma (en), barra=50 μ m; 116. Detalhe da figura 115, barra=20 μ m; 117. Aspecto geral de embrião (em) em estágio cordiforme tardio, com procâmbio (pc) diferenciado e lise de células do suspensor (s); cavidade digestora (cd); endosperma (en), barra=50 μ m; 118. Detalhe do suspensor da figura 117, mostrando lise de células (lc), através da degradação da parede celular; formação de substâncias róseas nas células entre embrião e suspensor (região da hipófise); suspensor com núcleo íntegro (ni), em algumas células, barra=10 μ m; 119. Embrião em estágio de torpedo (em), procâmbio (pc), endosperma (en), cavidade digestora (cd); suspensor íntegro (s), barra=150 μ m; 120. Detalhe do suspensor do embrião (em) descrito na figura 119, com todas as células (cs), inclusive a basal (cb), com seus respectivos núcleos; reservas protéicas (pr) de coloração vinácea em células do endosperma, ao lado do suspensor, barra=20 μ m. Esquemas representativos do embrião e suspensor, ao lado de cada série.



Figs. 121 a 124: Fotomicrografias de embrião em estágio de torpedo (maduro), de sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil., em secções longitudinais; pirenos plantados em março e 1996, retirados do solo em 06/12/96. 121, Vista geral do embrião (em) com suspensor presente (s); endosperma (en) e pequena cavidade digestora (cd); tegumento (t), barra=150 μ m; 122, Região micropilar, mostrando suspensor (s), célula basal (cb) íntegra, coifa (cf) e meristema apical radicular (mar) diferenciados; endosperma com acúmulo de proteínas (pr), barra=50 μ m; 123, Detalhe da coifa (cf) e células do centro quiescente (cq), barra=20 μ m; 124, Gradiente endosperma-embrião, da direita para a esquerda: vacúolos com proteína amorfa (pra), cavidade digestora (cd), embrião (em), barra=10 μ m

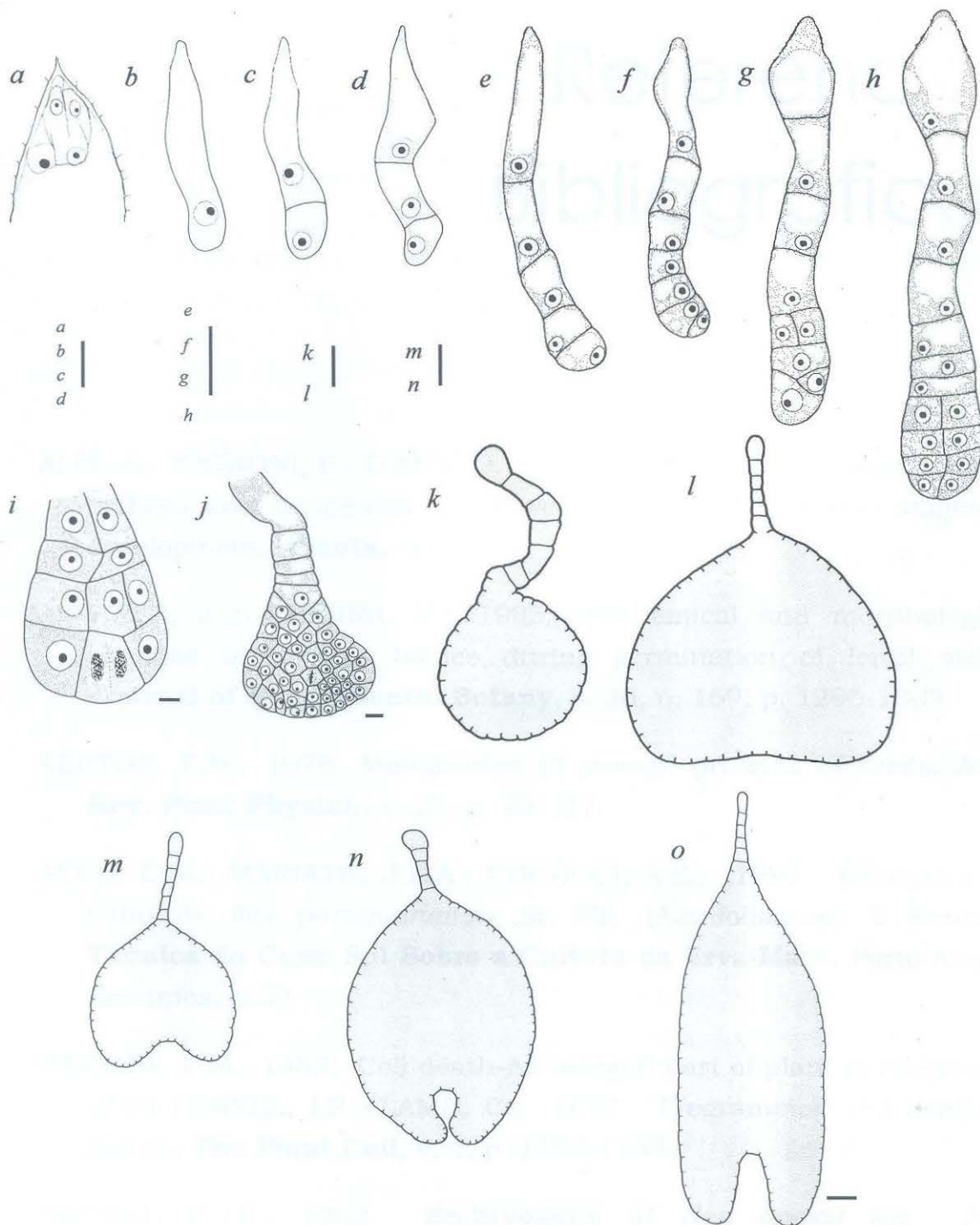


Figura: 125 a a o: Desenhos esquemáticos da embriogênese em *Ilex paraguariensis* St. Hil.. a. Zigoto logo após a fecundação; b. Zigoto em fase anterior à prófase mitótica; c. Proembrião bicelular; d. Proembrião com três células; e. Proembrião com cinco células; f. Proembrião com sete células; g. Formação do proembrião quadrante, com divisão longitudinal de célula do suspensor; h. Proembrião octante, barra figs. a, b, c, d = 80 μ m; barra figs. e, f, g, h = 160 μ m; i. Detalhe do proembrião pós-octante com início de diferenciação da protoderme; j. Embrião piriforme, com protoderme e meristema fundamental; k. Embrião globular; l. Embrião cotiledonar; m. Embrião cordiforme; n. Embrião cordiforme tardio; o. Embrião em estágio de torpedo; barra fig. i = 20 μ m; barra fig. j = 40 μ m; barra figs. k, l = 100 μ m; barra figs. m, n = 200 μ m; barra fig. o = 400 μ m

Referências Bibliográficas

- ALPI, A.; TOGNONI, F.; D'AMATO, F., 1975. Growth regulator levels in embryo and suspensor of *Phaseolus coccineus* at two stages of development. **Planta**, v. 127, p. 153-162.
- ALVAREZ, J.,; GUERRA, H., 1985. Biochemical and morphological changes in protein bodies during germination of lentil seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 36, n. 169, p. 1296-1303.
- ASHTON, F.M., 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 27, p. 95-117.
- AYUB, D.M.; MARIATH, J.E.A.; COCUCCHI, A.E., 1992. Ontogenia do fruto de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae). **I Reunião Técnica do Cone Sul Sobre a Cultura da Erva-Mate**. Porto Alegre. Resumos, p.50
- BARLOW, P.M., 1982. Cell death-An integral part of plant development, *apud* PENNEL, I.R.; LAMB, C., 1997. Programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1157-1168.
- BARRET, E. R., 1962. **Embryogeny of *Ilex opaca* Ait.** New Brunswick, New Jersey. Tese de doutorado.
- BELL, P.R, 1996. Megaspore Abortion: a consequence of selective apoptosis? **Int. J. Plant Sci.**, v.157, n.1, p. 1-7.
- BETHKE, P.C.; SCHUURINK, R.C.; JONES, R.L., 1997. Hormonal signaling in cereal aleurone. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, p. 1337-1356.

- BETHKE, P.C.; SWANSON, S.J.; HILLMER, S.; JONES, R.L., 1998. From storage compartment to lytic organelle: the metamorphosis of the aleurone protein storage vacuole. **Annals of Botany**, v. 82, p. 399-412.
- BEWLEY, J.D., 1997. Breaking down the walls – a Role for endo- β -mannanase in release from seed dormancy? **Trends in Plant Science**, v. 2, n.12, p. 464-469.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M., 1978. **Physiology and Biochemistry of Seeds – Vol.1 Development, Germination, and Growth**. Berlin : Springer-Verlag. 306p., il.
- BHALLA, P.L.; SINGH, M.B.; MALIK, C.P., 1981. Studies on the comparative biosynthetic activities of embryo and suspensor in *Tropaeolum majus* L. **Z. Pflanzenphysiol**, v. 103, p. 115-465.
- BOUMAN, F., 1984. The ovule In: JOHRI, B.M., **Embryology in Angiosperms**. Germany : Springer-Verlag. 830p.
- BOWLES, D. J., 1990. Defense-related proteins in higher plants. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 59, p. 873-907.
- BUVAT, R., 1989. **Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants**. Berlin: Springer-Verlag. 581p.
- CECCARELLI, N; LORENZI, R.; ALPI, A., 1981. Gibberellin biosynthesis in *Phaseolus coccineus* suspensor. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 102, p. 37-44.
- CHAMBERLAIN, C.J., 1932. **Methods in Plant Histology**. 5 ed. Chicago: The University of Chicago Press. 416p.
- CHAMBERLIN, M.A.; HORNER, H.T., 1993. Nutrition of ovule, embryo sac, and young embryo in soybean: an anatomical and autoradiographic study. **Can. J. Bot.**, v. 71, n. 9, p. 1153-1168.
- CHAPIN, F. S. & KEDROWSKI, R.A., 1983. Seasonal changes in nitrogen and phosphorus fractions and autumn retranslocation in evergreen and deciduous taiga trees. **Ecology**, v. 64, p. 376-391.

- CHEN, Z.; ILARSLAN, H.; PALMER, R. G.; SCOEMAKER, R. C., 1998. Development of protein bodies and accumulation of carbohydrates in a soybean (leguminosae) shiveled seed mutant. **Amer. J. Bot.**, v. 85, n.4, p. 492-499.
- CIONINI, P.G.; BENNICI, A.; ALPI, A.; D'AMATO, F., 1976. Suspensor, gibberellin and in vitro development of *Phaseollus coccineus* embryos. **Planta**, v. 131, p. 115-117.
- COCUCCI, A.E., 1981. Aspectos Ultraestructurales de la fertilizacion en angiospermas. **Kurtziana**, v. 14, p. 41-62.
- COCUCCI, A.E., 1986. Embriologia de angiospermas. **Rev. de la Academia Colombiana de Ciências Exactas Físicas Y Naturales**, v. XVI, n. 61.
- COCUCCI, A.E., 1995. **El processo sexual en angiospermas**. Cordoba: Academia Nacional de Ciências, 46p.
- COCUCCI, A.E.; DI FULVIO, T.E., 1969. Sobre la naturaleza nuclear de los "Cuerpos X". **Kurtziana**, v. 5, p. 317-323.
- COCUCCI, A.E.; MARIATH, J.E.A., 1995. Sexualidade das plantas. **Ciência hoje**, v. 18, nº 106, p. 50-61.
- COELHO, G.C., 1995. **Anatomia foliar e morfologia de inflorescências das espécies rio-grandenses de Ilex L. (Aquifoliaceae)** Porto Alegre. 101f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – UFRGS.
- COLE, B.L.; DEWEY, F.M.; HAWES, C.R., 1998. Immunocytochemical studies of the infection mechanisms of *Botrytis fabae*. **New Phytol.**, v. 139, p. 611-622.
- COPELAND, H.F., 1963. Structural notes on hollies (*Ilex Aquifolium* and *I. Cornuta*, Family Aquifoliaceae). **Phytomorphology**, v. 13, p. 455-464.
- COTTER, T.G.; AL-RUBEAI, M., 1995. Cell death (apoptosis) in cell culture systems. **Tibetech April**, v.13, Elsevier Trends Journals, p. 150-155.

- CRONQUIST, A., 1988. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden, 555 p.
- DAVIS, G.L., 1966. **Systematic embryology of the angiosperms**. USA : John Wiley & Sons, 528p.
- DELLAPORTA, L.S.; CALDERON-URREA, A., 1994. The sex determination process in Maize. **Science**, v. 266, p. 1501-1505.
- DENFFER, D.; SCHUMACHER, W.; MAGDEFRAU, K.; EHRENDORFER, F., 1976. **Strasburger's textbook of botany**. Stuttgart : Gustav Fischer Verlag. 877p
- DI FULVIO, T.E., 1983. Los "tipos" de endosperma y haustorios endospermicos, su clasificación. **Kurziana**, v. 16, p. 7-31.
- DI FULVIO, T.E., 1985. El sistema EODP en el ordenamiento de *Tubiflorae* y la endospermogénesis nuclear. **An. Acad. Nac. Cienc. Exac. Fis. y Nat.**, v. 37, p. 111-120.
- DIAPP, C.J., 1984. Espermo-anatomia e período de crescimento do embrião de *Ilex paraguariensis*. St. Hi. **Dusenya**, v. 14, n. 3, p. 113-121.
- DIMITRIEVA, M. I.; SOBOLEV, A.M.; KIRILLOVA, V.M., 1984. Storage proteins of the castor seed endosperm and embryo and their mobilization during germination. **Fiziologia Rastenii**, v. 31, n. 1, p. 40-49.
- DUMAS, C., et al., 1984. Emerging physiological concepts in fertilization. **What's New Plant Physiol.**, v. 15, p. 17-20.
- DURZAN, D. J., 1996. Protein ubiquitination in diploid parthenogenesis and early embryos of norway spruce. **Int. J. Plant. Sci.**, v. 157, n. 1, p. 17-26.
- EDWIN, G.; REITZ, R., 1967. Aquifoliáceas. **Flora Ilustrada Catarinense I (AQUI)**. Itajaí : Herbário Barbosa Rodrigues. 47p.
- ELLIS, R.E., YUAN, J., HORVITZ, R.H., 1991. Mechanisms and function of cell death. **Annu. Ver. Cell. Biol.**, v. 7, p. 663-698.

- FAHN, A., 1989. **Plant Anatomy**. Singapore: Pergamon Press. 544p.
- FERREIRA, A.G., 1997. **Estrutura e desenvolvimento da semente e embrião**. I Congresso Sul-Americano da Erva-Mate; II Reunião Técnica do Cone Sul Sobre a Cultura da Erva-Mate. Curitiba. Resumos.
- FERREIRA, A.G., CUNHA, G.G.; SILVEIRA, T.S., 1991. *In vitro* germination of immatur embryos of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Phyton**, v. 52, n. 1, p. 27-32.
- FRIEDMAN, W.E., 1998. The evolution of double fertilization and endosperm: an "historical" perspective. **Sex Plant Reprod.**, v. 11, p. 6-16.
- FUKUDA, H., 1997. Tracheary element differentiation. **Plant cell**, v.9, p. 1147-1156.
- GABRIEL, B.L., 1982. **Biological electron microscopy**. New York : Van Nostrand Reinhold Company Inc. 264p.
- GÄRTNER, P.J.; NAGL, W., 1980. Acid phosphatase activity in plastids (Plastolysomes) of senescing embryo-suspensor cells. **Planta**, v. 149, p.341-349.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEM-SASSON, S. A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentaion. **The Journal of Cell Biology**, v. 119, n.3, p. 493-501.
- GERASSIMOVA, H., 1933 Fertilization in *Crepis capillaris*. **Cellule**, v. 42: 103-148, *apud* MAHESHWARI, P., 1950. **An introduction to the embryology of angiosperms**. New Delhi : McGraw-Hill Publishing Company LTD, 1983. 5th Reprint. 453p.
- GERLACH, D.V., 1977. **Botanische Mikrotechnik**. Stuttgart : Georg-Thienne Verlag. 311p.
- GERRITS, P.O.; SMID, L., 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. v. 132, p. 81-85.

- GIBERTI, C.G., 1990. *Ilex theezans*, especie confirmada para nuestra flora. clave de las especies argentinas del genero *Ilex* (Aquifoliaceae). **Bol. Soc. Arg. de Bot.**, v. 26, n. 3-4, p. 1-4.
- GOLDBERG, R.B.; BEALS, T.P.; SANDERS, P.M., 1993. **Plant cell**, v. 5, 1217-1229.
- GREENBERG, J. T., 1996. Programmed cell death : a way of life for plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 12094-12097.
- GREENBERG, J. T.; GUO, A.; KLESSIG, D. F.; AUSUBEL, F. M., 1994. Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. **Cell**, v. 77, p. 551-563.
- GUILLIERMOND, A., 1908 Recherches cytologiques sur la germination des graines de quelques graminées et contribution a l'étude des grains d'aleurone. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.**, v. 10, p. 141-226.
- HARA-NISHIMURA, I.; SHIMADA, T.; HATANO, L.; TAKEUCHI, Y.; NISHIMURA, M., 1998. Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. **The Plant Cell**, v. 10, p. 825-836.
- HAVEL, L.; DURZAN, D.J., 1996. Apoptosis in plants. **Bot. Acta**, v. 109, p. 268-277.
- HEIMANN-WINAWER, P., 1919. Beiträge zur embryologie von *Colchium autumnale* L. Arb. Inst. allg. Bot. **Pflanzenphysiol.**, Univ. Zürich, 21, *apud* MAHESHWARI, P., 1950. **An introduction to the embryology of angiosperms**. New Delhi : McGraw-Hill Publishing Company LTD, 1983. 5th Reprint. 453p.
- HERR, J.M. Jr., 1961. Endosperm development and associated ovule modifications in the genus *Ilex* L. **J. Elisha Mitchell Society**, v. 77, n. 1, p.26-32.
- HERR, Jr., J.M., 1971. A new clearing-squash technique for study of ovule development in angiosperms. **Amer. J. Bot.**, v. 58, n. 8, p. 785-790.

- HERRERO, M., 1992. From pollination to fertilization in fruit trees. **Plant Growth Regulation**, v. 11, p. 27-32.
- HERTEL, R.J.G., 1954. Contribuição para fitologia teórica. – II Alguns conceitos na carpologia. **Humanitas**, v. 4, n. 4, p. 1-43.
- HESLOP-HARRISON, J.S., 1992. The angiosperm stigma **In: CRESTI, M; TIEZZI, A. Sexual Plant Reproduction**. Germany : Springer-Verlag, p.59-68.
- HESLOP-HARRISON, Y., 1981. Stigma Characteristics and Angiosperm Taxonomy. **Nord. J. Bot.**, v. 1, p. 401-420.
- HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K.R., 1997. The receptive surface of the angiosperm stigma. **Ann. Bot.**, v. 41, p. 1233-1258.
- HEUSER, E.D., 1990. ***Ilex paraguariensis* St. Hil : Endosperma e embrião durante a embriogênese tardia**. Porto Alegre. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de Concentração Botânica, Instituto de Biociências, UFRGS 69p.
- HOFF, R.J., 1987. Dormancy in *Pinus monticola* seed related to stratification time, seed coat and genetics. **Can. J. For Res.**, v. 17, p. 294-289, *apud* STONE, S. L.; GIFFROD, D.J., 1997. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early-seedling growth. storage proteins reserves. **Int. J. Plant Sci.**, v.158, n. 6, p. 727-737.
- HU, C. Y.; ROGALSKI, F; WARD, C., 1979. Factors mantaining *Ilex* rudimentary embryos in the quiescent state and the ultrastructural changes during *in vitro* activation. **Bot. Gaz.**, v. 140, n. 3, p. 272-279.
- HU, C.H.; FERREIRA, A.G., 1989. *In vitro* embryology of *Ilex*. In: PARÉ, J.; BUGNICOURT, M. **Some Aspects and Actual Orientation in Plant Embryology**. Moulet: Amiens. p. 1-286.
- HU, C.-Y., 1978. Material and methods in *Ilex* embryo culture. **Holly Letter of Holly Soc. Amer.**, v. 61, p. 4-7.

- ILARSLAN, H.; PALMER, R. G.; IMSANDE, J.; HORNER, H. T., 1997. Quantitative determination of calcium oxalate and oxalate in developing seeds of soybean (Leguminosae). **Amer. J. Bot.**, v. 84, n. 8, p. 10422-1046.
- JACOBSEN, J.V.; KNOX, R.B.; PYLIOTIS, N.A., 1971. The structure and composition of aleurone grains in the barley aleurone layer. **Planta (Berl.)**, v. 101, p. 189-209.
- JENSEN, W.A., 1962. **Botanical histochemistry - principles and practice**. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 408p.
- JENSEN, W.A., 1972. The embryo sac and fertilization in agiosperms. **Harold L. Lyon Arbor Lect**, v. 3, p. 1-32.
- JENSEN, W.A., 1998. Double fertilization: a personal view. **Sex Plant Reprod.**, v. 11, p. 1-5.
- JOHANSEN, D.A., 1950. **Plant embryolog**. Waltham: Chronica Botanica. 305p.
- JOHRI, B.M., 1984. **Embryology in Angiosperms**. Germany: Springer-Verlag. 830p.
- JONES, A.M.; DANGL, J. L., 1996. Logjam at the styx: programmed cell death in plants. **Trends in plant science, reviews**, v. 1, n. 4, p. 114-119.
- KAPIL, R.N.; BHATNAGAR, A.K., 1975. **Phytomorphology**, v. 25, p. 334-368, *apud* RUSSEL, D.S., 1992. Double fertilization. **International Review of Cytology**, v. 140, p. 357-388.
- KAPIL, R.N.; BHATNAGAR, A.K., 1981. Ultrastructure and biology of female gametophyte in flowering plants. **International Review of Cytology**, v. 70, p. 291-341.
- KAPLAN, D.R., 1984. Alternative modes of organogenesis in higher plants. In: WHITE, R.A.; DICKISON, C.W., **Contemporary problems in plant anatomy**. Florida, Academic Press. 540p.

- KERR, J.F.R.; GOMBÉ, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. B., 1995. Anatomical methods in cell death. In: SCHWARTZ, L. M.; OSBORNE, B. A (eds.). **Cell Death: methods in cell biology** v. 46. New York: Academic Press. p. 1-27.
- KERR, J.F.R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R., 1972. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239.
- KNOX, R.B.; SINGH, M.B., 1987. New perspectives in pollen biology fertilization. **Annals of Botany**, v. 60, n. 4, p. 15-37.
- KRAEMER, K.H., 1997. ***Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate): distribuição de saponinas e estudos iniciais em culturas de células em suspensão.** Porto Alegre. 155f.. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – UFRGS.
- LILLIE, R.D., 1965. **Histopathologic technic and practical histochemistry.** New York : McGraw-Hill Book Company. 751p.
- LINSKENS, H.F., 1969. Fertilization mechanisms in higher plants. In: Metz, C.B.; Monroy, A. **Fertilization.** New York : Academic Press 2: p.189-253.
- LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z., 1996. The biology of cell death and its relation to aging. In: **Cellular Aging and Cell Death.** Wiley-Liss, Inc. p. 167-180.
- LOESNER-GOSHEN, D.; PORTNOY, V. H.; MAYER, A. M.; JOEL, D. M., 1998. Pectolytic activity by the haustorium of the parasitic plant *Orobanche* L. (Orobanchaceae) in host roots. **Annals of Botany**, v. 81, p. 319-326.
- LÖFGREN, A., 1917. **Familias naturales phanerogamas.** Rio de Janeiro : Imprensa Nacional. 611p.
- LORENZI, R.; BENNICI, A.; CIONINI, P. G.; D'AMATO, 1978. Embryo-suspensor relations in *Phaseollus coccineus* : cytokinins during seed development. **Planta**, v. 143, p.59-62.

- MAHESHWARI, P., 1950. **An introduction to the embryology of angiosperms.** New Delhi : McGraw-Hill Publishing Company LTD, 1983. 5th Reprint. 453p.
- MAHESHWARI, P., 1963. **Recent advances in the embryology of angiosperms.** New Dehli : International Society of Plant Morphologists, University of Dehli. 467p.
- MALIK, C.P.; SINGH, M.B., 1979. Embryo suspensor in angiosperms- structural and functional aspects. **Current Advances in Plant Reproductive Biology**, v. 1, p. 257-292.
- MALIK, C.P.; VERMANI, S.; BHATIA, D.S., 1976. III Histochemical characteristics of suspensor during embryo development in *Brassica campestris* Linn. Var. , Sarson. **Acta histochem.**, v. 57, p. 178-182.
- MARIATH, J.E.A.; COELHO, G. C.; SANTOS, R. P.; HEUSER, E. D.; AYUD, D. M.; COCUCCI, A. E., 1995. Aspectos anatômicos e embriológicos em espécies do gênero *Ilex* In: Winge, H.; Ferreira, A.G.; Mariath, J. E. A.; Tarasconi, L.C. (eds) – **Erva-Mate Biologia e Cultura no Cone Sul**, Porto Alegre, Editora da Universidade/ UFRGS, p.263-280.
- MARIATH, J.E.A.; SANTOS, R.P.; HEUSER, E. D., 1997. **Biologia reprodutiva da Erva-Mate.** I Congresso Sul-Americano da Erva-Mate; II Reunião Técnica do Cone Sul Sobre a Cultura da Erva-Mate. Curitiba. Resumos
- MAURITZON, J.V., 1936. Zur embryologie und systematischen abgrenzung der reihen terebinthales und celastrales. **Botaniska Notiser, Lund**, p.161-212.
- McANISH, M.R.; HETHERINGTON, A.M., 1998. Encoding specificity in Ca²⁺ Signalling Systems. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 1.
- McDOWELL, E.M., 1978. In: **Diagnostic Electron Microscopy.** Trump & Jones eds. Wiley, p. 113-139.

- MILLER, E.A.; ANDERSON, M.A., 1999. Uncoating the mechanisms of vacuolar protein transport. **Trends in plant science**, v.4, n°2, p. 46-48
- MOHR, H.; SCHOPFER, P., 1995. **Plant physiology**. Berlin: Springer-Verlag. 629p. il.
- NAGL, W., 1976a. Ultrastructural and developmental aspects of autolysis in embryo-suspensor. **Ber. Deutsch. Bot. Ges.**, v. 89, p. 301-311.
- NAGL, W., 1974. The *Phaseolus* suspensor and its polytene chromosomes. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 73, p. 1-44.
- NAGL, W., 1976. Early embryogenesis in *Tropaeolum majus* L.: ultrastructure of the embryo-suspensor. **Biochem. Physiol. Pflanzen**, v. 170, p. 253-260.
- NAGL, W., 1977. "Plastolysomes" – Plastids involved in the autolysis of the embryo-suspensor in *Phaseolus*. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 85, p. 45-51.
- NATESH, S.; RAU, M.A., 1984. The embryo. **In: JOHRI, B.M. (ed) Embryology of Angiosperms**. Berlin : Springer-Verlag. p. 377-443.
- NEWCOMB, W.; FOWKE, L.C., 1974. *Stellaria media* embryogenesis: the development and ultrastructure of the suspensor. **Can. J. Bot.**, v. 52, p. 607-615.
- NIKLAS, C.O., 1987. Estudios embriológicos y morfológicos en la yerba mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Bonplandia**, v. 6, n. 1, p. 45-56.
- O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E., 1981. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne : Termacarphi Pty Ltd. 345p.
- OTEGUI, M.; LIMA, C.; MALDONADO, S.; DE LEDERKREMER, R. M., 1998. Histological and chemical characterization of *Myrsine laetevirens* seed. **Int. J. Plant Sci.**, v. 159, n. 5, p. 762-772.

- OWENS, N.J.; CATALANO, G. L.; MORRIS, S. J.; ATIKEN-CHRISTIE, J., 1997. The reproductive biology of Kauri (*Agathis australis*). IV. Late embryogeny, histochemistry, cone and seed morphology. **Int. J. Plant Sci.**, v. 158, n. 4, p. 395-407.
- OWENS, N.J.; CATALANO, G. L.; MORRIS, S. J.; MIRSA, S., 1992. The ultrastructural, histochemical, and biochemical development of the post-fertilization megagametophyte and zygotic embryo of *Pseudotsuga menziesii*. **Can. J. For. Res.**, v. 23, p. 816-827.
- PENNEL, I.R.; LAMB, C., 1997. Programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, v. 9, p. 1157-1168.
- PREGO, I.; MALDONADO, S.; OTEGUI, M., 1998. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. **Annals of Botany**, v. 82, p. 481-488.
- PRZYBYLLOK, T.; NAGL, W., 1977. Auxin concentration in embryo and suspensor of *Tropaeolum majus*, as determined by mass fragmentation (single ion detection). **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 84, p. 463-465.
- RAGHAVAN, V., 1986. **Embryogenesis in Angiosperms. A Developmental and Experimental Study**. Cambridge University Press. 303p.
- RAGHAVAN, V., 1997. **Molecular Embryology of Flowering Plants**. USA : Cambridge University Press. 690p.
- REISSEK, S., 1861. CELASTRINEAE, ILICINEAE ET RHAMNEAE. In: MARTIUS, K.(ed.). **Flora Brasiliensis**, v. 11, t. 1, p.36-74, Leipzig.
- REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. 1983. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. **Sellowia** v.34-35, p. 284-292.
- RODRIGUEZ, L.; REYES-ESPARZA, J.A., 1995. Apoptosis: características generales y sus implicaciones en procesos fisiopatológicos. **Biotecnología Aplicada**, v. 12, n. 2, p. 1-8.
- ROST, T. L., 1971. Fine structure of endosperm protein bodies in *Setaria Lutescens* (Gramineae). **Protoplasma**, v. 73, p. 475-479.

- ROST, T. L., 1972. The ultrastructure and physiology of protein bodies and lipids from hydrated dormant and nondormant embryos of *Setaria lutescens* (Gramineae). **Amer. J. Bot.**, v. 59, n. 6, p. 607-616.
- RUSSEL, D.S., 1992. Double fertilization. **International Review of Cytology**, v. 140, p. 357-388.
- SANTOS, R.P., 1993. **Androsporogênese/androgametogênese e desenvolvimento do androsporângio em *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae)**. Porto Alegre. Dissertação de Bacharelado, Curso de Graduação em Ciências Biológicas, área de Concentração Botânica, UFRGS.
- SANTOS, R.P., 1995. **O Andrófito de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae): estrutura e citoquímica do tubo polínico e grão de pólen**. Porto Alegre. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Botânica, UFRGS.
- SCHOENBERG, M.M.; DINOUTTI, L.A., 1989. Ontogênese do fruto de *Ilex paraguariensis* St.Hil. – I– Morfologia externa e interna da flor. **Estudos de Biologia**, n. XXII. PUC-Paraná.
- SCHULTZ, S.P.; JENSEN, W., 1969. *Capsella* embryogenesis: the suspensor and the basal cell. **Protoplasma**, v. 67, p. 139-163.
- SCHURHOFF, P.N., 1921. Die entwicklungsgeschichte von *Ilex aquifolium*. **Berichte der deutschen botanischen gesellschaft**, v. 39, p. 377-379.
- SCHWARTZ, B. W.; VERNON, D. M.; MEINKE, D. W., 1996. Development of suspensor: differentiation, communication, and programmed cell death during plant embryogenesis. In: **Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development** (Larkins, B.A. and Vasil, I.K., eds.), Kluwer
- SCHWARTZ, B. W.; VERNON, D. M.; MEINKE, D. W., 1997. Role of the suspensor in early embryo development. **Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants**, v. 2.

- SCHWARTZ, B. W.; YEUNG, E. C.; MEINKE, D. W., 1994. Disruption of morphogenesis and transformation of the suspensor in abnormal suspensor mutants of *Arabidopsis*. **Development**, v. 120, p. 3235-3245.
- SCHWARTZ, L.M., SMITH, S. W.; JONES, M. E. E.; OSBORNE, B. A., 1993. Do all programmed cell death occur via apoptosis? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 980-984, February.
- SERRATO-VALENTI; MARRIOTTI, M. G.; CORNARA, L.; CORALLO, A., 1998. A histological and structural study of *Phacelia tanacetifolia* endosperm in developing, mature, and germinating seed. **Int. J. Plant Sci.**, v. 159, n. 5, p. 753-761.
- SING, M. B.; PREM; LATA BHALLA; MALIK, C. P., 1980. Activity of some hydrolytic enzymes in autolysis of embryo suspensor in *Tropeolum majus* L. **Ann. Bot.** , v. 45, p. 523-527.
- SOUÈGES, R., 1936. Embryogénie des Campanulacées: développement de l'embryon chez *Campanula patula*. Paris, **C.R. Acad. Sci.**, v. 202: 2009-2011.
- SOUTHWORTH, D.S., 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. **J. Histochem Cytochem**, v. 21, p. 73-80.
- SPJUT, R.W., 1994. **A systematic treatment of fruit types**. New York: The New Botanical Garden. 181p., il.
- SPURR, A. R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 26, p.31-43.
- STEEVES, T.A.; SUSSEX, I.M. 1989. The role of the suspensor. In: **Patterns in Plant Development**. Cambridge : Cambridge Univ. Press. p. 36-39.
- STEEVES, T.A.; SUSSEX, I.M., 1989. Analytical and experimental studies of embryo development. In: **Patterns in Plant Development**. Cambridge: Cambridge Univ. Press. 26-45

- STONE, S. L.; GIFFROD, D.J., 1997. Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early-seedling growth. storage proteins reserves. **Int. J. Plant Sci.**, v.158, n. 6, p. 727-737.
- SUSSEX, I.M.; CLUTTER, M.; WALBOT, V.; BRADY, T., 1973. Biosynthetic activity of the suspensor of *Phaseolus coccineus*. **Cariologia**, v. 25, p. 261-272.
- UCHIYAMA, Y., 1995. Apoptosis: the history and trends of its studies. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 58, n. 2, p. 127-137.
- VAN WENT, J.L., 1992. Pollen Tube in the Embryo Sac and Fertilization In: CRESTI, M; TIEZZI, A. **Sexual Plant Reproduction**. Germany : Springer-Verlag, p.135-141.
- VAN WENT, J.L.; WILLEMSE, M.T.M., 1994 Fertilization In: JOHRI, B.M., **Embryology in Angiosperms**. Germany : Springer-Verlag. 830p.
- VENABLE, J.H.; COGGESHALL, R., 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 25, p. 407.
- VIJAYARAGHAVAN, M.R.; PRABHAKAR, K., 1984 The endosperm In: JOHRI, B.M., **Embryology in Angiosperms**. Germany : Springer-Verlag. 830p.
- WANG, H.; WU, H-m.; CHEUNG, A.Y., 1996. Pollination induces mRNA poly(A) tail-shortening and cell deterioration in flower transmitting tissue. **The Plant Journal**, v. 9, n. 5, p. 715-727.
- WARDLAW, C.W., 1955. **Embryogenesis in plants**. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- WILLIAMS, G.T.; SMITH, C. A.; McCARTHY, N. J.; GRIMES, E. 1992. Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends in Cell Biology*, v. 2, p. 263-267.
- WILLIAMS, G.T.; SMITH, C., 1993. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. **Cell**, v. 74, p. 777-779.

- WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R.; CURRIE, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, v. 68, p. 251-306.
- YEUNG, E. C., 1980. Embryogeny of *Phaseolus*: the role of the suspensor. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 96, p. 17-28.
- YEUNG, E.C.; CLUTTER, M.E., 1979. Embryogeny of *Phaseolus coccineus*: the ultrastructure and development of the suspensor. **Can. J. Bot.**, v. 57, p.120-136.
- YEUNG, E.C.; MEINKE, D., 1993. Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1371-1381. (American Society of Plant Physiologists).
- YEUNG, E.C.; SUSSEX, I.M., 1979. Embryogeny of *Phaseolus coccineus*: the suspensor and the growth of the embryo-proper *in vitro*. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 91, p. 423-433.