

TESE BOT/121

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Ilex paraguariensis St. Hil.: Endosperma e
Embrião Durante a Embriogênese
Tardia

Elliane Diefanhaelen Hender

Porto Alegre, 1990

ESCLARECIMENTOS AOS CONSULENTES

Esta dissertação de mestrado segue os preceitos do regimento do Curso de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e as normas vigentes, nesta data, estabelecidas pela Comissão Coordenadora do Curso.

"Artigo 37 -6°- Após retificações sugeridas pela Comissão Examinadora, o candidato deverá encaminhar a dissertação em 10 (dez) vias DATILOGRAFADAS à Comissão Coordenadora, dentro de um prazo de três meses após a defesa. As retificações deverão ser apresentadas sob a forma de adendo no final da dissertação, não sendo permitidas modificações no texto original da mesma".

Assim posto, os consulesntes deverão consultar este adendo, que conterà as sugestões da banca examinadora e comentários do candidato, bem como errata, quando houver.

A Comissão Coordenadora

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Qui Fagnano

Co-orientador: Prof. Jorge Ernesto de Araujo

Porto Alegre

1950

Eliane Diefenthaler Heuser

Universidade Federal do R.G.S.
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
BIBLIOTECA

Ilex paraguariensis St. Hil.: Endosperma e Embrião

Durante a Embriogênese Tardia

TESE BOT/121

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas - área de concentração Botânica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Guí Ferreira

Co-orientador: Prof. Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Porto Alegre

1990

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Alfredo G. Ferraz, pela orientação e apoio na realização
deste trabalho.
- Ao Prof. Jorge E. A. Strass, pelo auxílio e auxílio prestados.
- A Prof. Dra. Myriam Camp, pelas orientações e sugestões.
- A Prof. Dra. Helga Winge, pela colaboração e interesse.
- Ao Prof. Dr. Paulo Luiz Oliveira, pelas sugestões durante todo trabalho.
- A Prof. Lyda Botelho, pela revisão por aspectos linguísticos.
- Ao colega Carlos Frederico Wöhler, pelas orientações em técnicas de
análise vegetal e sugestões críticas.
- A bibliotecária Dilma Nazareno, pela orientação quanto à apresentação
das referências bibliográficas.
- Aos funcionários Maria Ruse e Edson de Jesus, pelas reprogravações fotográficas.
- A secretária Adriana Carvalho, pelo auxílio técnico no final deste trabalho.
- Em especial aos Laboratórios de Fisiologia e Anatomia Vegetal, pelo
atendimento.
- Ao Prof. Dr. Manoel de Cássio, pelas orientações e sugestões.
Especialmente aos meus pais.

Ao meu marido e

aos meus filhos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alfredo G. Ferreira, pela orientação e apoio na realização do presente trabalho.

Ao Prof. Jorge E. A. Mariath, pelo estímulo e auxílio prestados.

À Profa. Dra. Magdolna Hampe, pelos ensinamentos e sugestões.

À Profa. Dra. Helga Winge, pela colaboração e interesse.

Ao Prof. Dr. Paulo Luiz Oliveira, pelas sugestões durante todo trabalho.

À Profa. Lydia Schifino, pela revisão dos aspectos lingüísticos.

Ao colega Carlos Frederico Widholzer pelos ensinamentos em técnicas de anatomia vegetal e sugestões críticas.

À bibliotecária Dilma Nascente, pela orientação quanto à apresentação das referências bibliográficas.

Aos fotógrafos Mara Kuse e Edmundo Chao, pelas reproduções fotográficas.

À acadêmica Adriane Carvalho, pelo auxílio técnico no final deste trabalho.

Aos colegas dos Laboratórios de Fisiologia e Anatomia Vegetal, pelo incentivo e amizade.

À Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, área de concentração Botânica, pelo apoio recebido.

Ao departamento de Botânica, por ter possibilitado a utilização dos Laboratórios.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

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

RESUMO	VII
SUMÁRIO	IX
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	2
2.1. COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	2
2.2. SELEÇÃO DO MATERIAL INSTÂNCIA	2
2.3. ANÁLISE DO SOLO	2
2.4. ANÁLISE DO SOLO	2
2.5. CALIBRE SOBRE TEMPERATURA	2
2.6. RETIRADA DAS AMOSTRAS	2
2.7. ANÁLISE MORFOANATOMICA	2
2.8. TESTES HISTOQUÍMICOS	2
2.8.1. Testes para hidratos	2
2.8.2. Testes para proteínas	2
2.8.2.1. Reação de NINÉDRINA SCHIBT	2
2.8.2.2. Reação de SAKAGUCHI	2
2.8.2.3. Reação de MILLON	2
2.8.3. Testes para reservas carboidratos da parede e conteúdo dos grãos	2
2.8.3.1. Testes para amido	2
2.8.3.2. Testes para glicose	2
2.8.3.3. Testes para polissacarídeos	2

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	III
SUMÁRIO.....	V
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
2.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	5
2.2 SELEÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	5
2.3 MONTAGEM DO EXPERIMENTO.....	5
2.4 ANÁLISE DO SOLO.....	6
2.5 DADOS SOBRE TEMPERATURAS.....	6
2.6 RETIRADA DAS AMOSTRAS.....	6
2.7 ANÁLISE MORFOANATÔMICA.....	7
2.8 TESTES HISTOQUÍMICOS.....	8
2.8.1 Testes para lipídios.....	8
2.8.2 Testes para proteínas.....	8
2.8.2.1 Reação de NINHIDRINA-SCHIFF.....	8
2.8.2.2 Reação de SAKAGUCHI.....	8
2.8.2.3 Reagente de MILLON.....	9
2.8.3 Teste para reservas, constituintes de parede e secreções em geral.....	9
2.8.4 Testes para taninos.....	9
2.8.5 Teste para amido.....	9
2.8.6 Teste para polissacarídeos totais.....	9

3. RESULTADOS	10
3.1 ANÁLISE DE SOLOS.....	10
3.2 DADOS METEOROLÓGICOS.....	10
3.3 MEDIDAS DE EMBRIÕES.....	10
3.4 DESCRIÇÃO DA SEMENTE.....	11
3.5 MORFOANATOMIA DO DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO.....	12
3.5.1 Estágio globular.....	12
3.5.2 Estágio de coração.....	12
3.5.3 Estágio de pós-coração.....	13
3.5.4 Estágio de torpedo.....	13
3.5.5 Estágio maduro.....	13
3.6 HISTOQUÍMICA.....	14
4. DISCUSSÃO.....	17
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
6. FIGURAS.....	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXO I.....	69
ADENDO.....	70

RESUMO

Sementes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) necessitam, "in situ", de um longo período para germinar - 6 a 8 meses - e a percentagem de germinação é muito baixa. Quando os embriões são excisados e cultivados "in vitro", a embriogênese pode completar-se em duas semanas. As causas quanto a esses aspectos do desenvolvimento embrionário tardio ainda não estão bem esclarecidas. A interrupção da embriogênese "in vivo" deve-se, provavelmente, à imaturidade do embrião. O baixo índice germinativo pode estar sendo causado por degeneração prematura do suspensor, em alguma das fases desse desenvolvimento.

Visando contribuir para a elucidação desse problema, foram feitos estudos morfoanatômicos - tanto em material fresco como em material fixado - nas diversas fases do desenvolvimento embrionário, em pirenos de *Ilex paraguariensis*, cultivados a campo durante doze meses. Lotes foram coletados em intervalos de aproximadamente vinte dias e analisados, permitindo a constatação de mudanças estruturais tais como, formação de cotilédones, aumento gradativo do eixo embrionário, diferenciação de tecidos e espessamento helicoidal de elementos de condução. Pôde-se observar, particularmente, a presença do suspensor, órgão identificável em estrutura embrionária, durante as diversas fases da embriogênese, em estágio inicial, como também em estágios mais avançados do desenvolvimento.

Testes histoquímicos permitiram verificar a natureza lipoprotéica das reservas do endosperma. Estas reservas, em estágios mais avançados de desenvolvimento embrionário, apresentam-se modificadas, na região próxima ao embrião, mostrando a ocorrência de utilização das mesmas.

ABSTRACT

The seeds of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) take a long time to germinate - 6 to 8 months - and a high percentage of them fail to develop. When the embryos are excised and cultured "in vitro", embryogenesis may be completed in two weeks. The reasons for this late embryonic development are not quite clear. The interruption of "in vivo" embryogenesis is probably due to embryo immaturity. The low rate of germination is possibly a result of early degeneration of the suspensor during some stage of development.

In order to elucidate this problem, morphoanatomical studies were carried out using both fresh and fixed material taken at different stages of embryonic development. *Ilex paraguariensis* pyrenes were cultivated under field conditions over twelve months. Samples were collected and analysed at 20 days intervals. Thus, structural changes could be observed, such as the formation of cotyledons, the gradual growth of the embryo axis, tissue differentiation and helicoidal thickening in conduction elements.

The suspensor could be found in the embryony structure during the various stages of embryogenesis ranging from initial to advanced.

Histochemical tests demonstrated the lipoproteic nature of the endosperm reserves. In advanced stages of embryogeny, these reserves are modified near the embryo, showing that they are in fact being used.

1. INTRODUÇÃO

Ilex paraguariensis St. Hil., popularmente denominada de erva-mate, pertence à família Aquifoliaceae. O gênero está representado por cerca de 660 espécies (Edwin & Reitz, 1967), sendo que em território brasileiro ocorrem aproximadamente 70 delas (Löfgren, 1917).

O termo popular erva-mate não seria o mais apropriado, pois é uma espécie arbórea. As árvores dessa espécie, que deveriam ser denominadas erveiras (Luft, com. pessoal), quando adultas podem atingir 12 a 30 metros de altura. É uma espécie dióica - nativa do sul da América do Sul - com flores imperfeitas estaminadas que possuem ovário rudimentar não funcional e flores imperfeitas carpeladas com estaminódios.

Constitui-se árvore símbolo do Rio Grande do Sul, conforme o disposto na Lei Estadual 7439/80.

É de suas folhas que, após colhidas e passadas por diversos processos de transformação, se obtém a erva-mate, insumo básico para o preparo do chimarrão, bebida usada inicialmente apenas pelos índios e, hoje em dia, de largo consumo no sul do Brasil, no Uruguai, na Argentina, no Paraguai, no Chile e na Bolívia (EMBRAPA, 1985), e de relevante expressão econômica em algumas regiões do Rio Grande do Sul.

Apesar de ser uma espécie de uso secular e cultivada há muitos anos, pouco se conhece sobre sua biologia.

Os frutos são classificados como drupas (Reissek, 1861), como baga-drupa (Edwin & Reitz, 1967), como drupóides (Kuniyoski, 1983). Segundo classificação carpológica de Hertel (apud Diapp, 1984), o fruto pertence à classe dos Eucarpos,

subclasse Drupóide, gênero Nuculanídeo, apresentando 4 núculas, cada uma envolvendo uma amêndoa, ou seja, constituindo uma semente. O termo, entretanto, mais indicado para a classificação desse fruto, segundo seu aspecto morfoanatômico, seria nukulânio (Giberti, 1979), termo empregado por Beck (apud Font Quer, 1953) para drupa policárpica com o epicarpo e mesocarpo carnosos ou coriáceos e com o endocarpo endurecido e geralmente lenhoso.

O fruto é tetralocular, tetraspérmico, com mesocarpo carnoso, endocarpo lenhoso. Externamente apresenta-se globoso, de superfície lisa e coloração variável entre o branco, várias tonalidades de rosa e o vermelho arroxado, quando atinge a maturidade plena. A coleta dos frutos se efetua entre os meses de janeiro e março.

O pireno é o órgão de dispersão das sementes. É formado pela semente mais endocarpo lenhoso. A semente com dois envoltórios, inclui endosperma e embrião.

Os embriões, em *Ilex paraguariensis*, quando o fruto está maduro, ainda estão em fase inicial de desenvolvimento, apresentando-se em estágio coração (Ferreira & Hu, 1984). Embriões rudimentares são comuns no gênero *Ilex* (Martin, 1946), tendo sido encontrados tais embriões em onze de suas espécies (Hu, 1975).

Os pirenos dessa espécie, quando colocados no solo, em condições favoráveis para germinação, necessitam de seis ou mais meses para germinar (Lendner, 1918), e seu poder germinativo é considerado baixo, ocorrendo germinação de forma não uniforme e lenta (Schuch, 1985). A demora na germinação deve-se, em parte, à necessidade de os embriões completarem seu desenvolvimento.

Diz-se que sementes são dormentes quando são viáveis e não germinam sob condições de temperatura, umidade e oxigênio, normalmente consideradas adequadas (Roberts, 1972).

Existem diversas causas que podem provocar dormência em sementes, dentre elas Crocker (apud Ives, 1923) menciona: embrião rudimentar; completa inibição na absorção de água; resistência mecânica dos envoltórios; interferência dos envoltórios na absorção de oxigênio; estado de dormência do próprio embrião.

Cerca de quarenta e seis gêneros de angiospermas apresentam sementes dormentes pela presença de embriões rudimentares, em estágio ainda de coração, quando o fruto está maduro (Martin, 1946). O período de desenvolvimento do embrião, após a maturação do fruto - do estágio de coração até o de maduro - foi definido como embriogênese tardia (Barret, 1962).

As sementes de erva-de-são-joão são erroneamente classificadas como duras (Ferreira Filho & Tarragó, apud Mello, 1980), por não estarem de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Ministério da Agricultura, 1976). Esta seria a denominação dada a sementes que permanecem sem absorver água por um período de tempo mais longo que o normal, porém a dormência de *Ilex paraguariensis* não é devida à impermeabilidade dos envoltórios à água. (Mello, 1980).

Um processo amplamente usado pelos produtores de mudas de erva-de-são-joão, como pré-tratamento das sementes de *Ilex paraguariensis*, é o da estratificação para quebrar a dormência das sementes (Schneider & Petry, 1985). A estratificação

consiste em deixar as sementes armazenadas sob o solo, por um período aproximado de seis meses, para depois semeá-las em canteiros (Lessing, 1985).

Schuch (1985) afirma que o índice germinativo acumulado de sementes frescas é significativamente maior do que aquele encontrado em sementes estratificadas.

Como todas as técnicas convencionais de horticultura, usadas para quebra de dormência, foram tentadas sem sucesso para *Ilex aquifolium*, foi experimentada a cultura "in vitro" de embriões e obtida germinação no curto período de duas a oito semanas (Hu, 1978). O mesmo procedimento foi repetido, com sucesso, usando-se embriões de *Ilex paraguariensis* (Cunha e cols., 1988).

Porém, em culturas "in situ", as pesquisas realizadas até o presente momento ainda não evidenciam resultados satisfatórios em termos de abreviar o tempo do processo germinativo ou de elucidar as causas que levam as sementes de *Ilex* a entrarem em dormência, com parada do crescimento do embrião.

Verifica-se que há um claro gradiente norte-sul no grau de maturidade dos embriões de *Ilex paraguariensis* (Amaral e cols., 1989), o que sugere existirem também fatores relacionados com o clima que podem manter esses embriões em estágio rudimentar.

Objetivos

O presente trabalho, buscando contribuir à elucidação do problema em estudo, propõe-se a acompanhar o desenvolvimento morfoanatômico da embriogênese tardia, procurando identificar as prováveis causas da demora de germinação e os baixos índices de germinabilidade de sementes de *Ilex paraguariensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

Para o presente trabalho, frutos de *Ilex paraguariensis* foram coletados de diversas árvores, em fevereiro de 1987, em Mato Leitão, município de Venâncio Aires-RS, colocados em sacos plásticos e estocados em geladeira a uma temperatura de ± 4 °C (Hu, 1978), até março de 1987, início do experimento.

2.2 SELEÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Dos frutos coletados, foram selecionados apenas os brancos - em cultura "in vitro", os embriões dos frutos nesse estágio de coloração são os que germinam melhor (Cunha, com. pessoal), - e destes foi tomada uma amostra num total de 750 frutos, procedentes de diversas árvores. A seguir, foram macerados sob água corrente, para retirada da polpa e separação dos pirenos, tendo-se tido o cuidado de evitar a secagem dos pirenos, pois isto poderia provocar uma dormência secundária (Hu, com. pessoal).

2.3 MONTAGEM DO EXPERIMENTO

Foram tomados lotes de 50 pirenos, colocados em sacos de tela plástica de 10x10cm e misturados com solo rico em matéria orgânica (comercialmente-terra vegetal). Estes sacos foram dispostos em uma sementeira de 55cm de comprimento x 36cm de largura por 15cm de altura, e recobertos pelo mesmo tipo solo, usado anteriormente. A sementeira foi protegida por tela plástica,

para evitar ataque de animais, colocada sobre tijolos, ao ar livre, em local sombrio e foi mantida úmida.

2.4 ANÁLISE DO SOLO

Para caracterizar o tipo de substrato usado no experimento, foi realizada a análise do solo, no Laboratório de Solos da Faculdade de Agronomia, UFRGS, segundo métodos adotados pela Rede Oficial de Laboratórios de Análises de Solos RS/SC, (ROLAS), apresentados em Siqueira (1987).

2.5 DADOS SOBRE TEMPERATURAS

As temperaturas do ar e solo e as precipitações ocorridas durante o período do experimento foram obtidas através de dados coletados pelo 8º Distrito de Meteorologia de Porto Alegre, situado a 3 km do local do experimento e os dados sobre Normais Climatológicas, através de publicações do Instituto Nacional de Meteorologia (1969). Esses dados estão registrados nos gráficos e no diagrama e foram trabalhados através de programa Excel para computadores Macintosh (figuras 1, 2, 3 e 4).

2.6 RETIRADA DAS AMOSTRAS

A retirada dos pirenos do solo ocorreu em intervalos de aproximadamente 20 dias, ao longo de 12 meses em que foram recuperados e recontados. Do total de cinquenta pirenos da amostra, vinte foram usados para verificação anatômica, e trinta tiveram seus embriões excisados e medidos com auxílio de microscópio óptico (marca Zeiss-Jena, modelo Laboval), equipado com ocular de fio móvel. O eixo hipocótilo-radícula, maior comprimento do embrião, foi tomado

como medida básica. A partir dos resultados destas medições, foi feita uma regressão polinomial quadrática, usando o programa "StatView 512", para computadores do tipo MacIntosh, para a obtenção da curva de crescimento dos embriões (figura 5). Estes mesmos dados foram utilizados para indicação da percentagem de embriões, nos diferentes estágios de desenvolvimento, e estão descritos no diagrama de barras obtido através do programa Excel para computadores MacIntosh (figura 6).

2.7 ANÁLISE MORFOANATÔMICA

Para o estudo anatômico, retirou-se a semente dos pirenos, com auxílio de lâminas cortantes, resistentes (Industrial single-edged razor blades; Hu, 1978) e agulhas histológicas, manipuladas sob microscópio estereoscópio (marca Zeiss-Jena, modelo Citoval). As sementes foram fixadas em FAA 50% (Johansen, 1940) por 2 dias, e, a seguir, transferidas para etanol 50%, como conservante. Essas foram processadas segundo os métodos tradicionais de inclusão em parafina, através de uma série etílica (Johansen, 1940), utilizando-se um processador automático de tecidos (Histotécnico Oma). Após este procedimento, o material foi emblocado e seccionado longitudinalmente com uso de micrótomo rotativo (marca Erma, tipo Minot) em cortes de 8 micrômetros de espessura. Os cortes foram aderidos às lâminas com adesivo de Haupt (Johansen, 1940) ou Bissing (Bissing, 1974) e corados com Safranina e Verde Rápido ou Azul de Toluidina (Gerlach, 1977).

A análise anatômica foi realizada ao microscópio óptico (marca Leitz, modelo Dialux 20 EB), provido de câmara clara e aparelhagem fotográfica (marca Leitz, modelo Leica MD2). A escala que acompanha as fotomicrografias foi obtida

através de lâmina micrometrada, fotografada nos diferentes aumentos utilizados e projetada sob as mesmas condições de ampliação.

2.8 TESTES HISTOQUÍMICOS

Para a realização dos testes histoquímicos, diferentes tratamentos foram aplicados, de acordo com técnicas específicas, em cortes, tanto de material fresco seccionado a mão livre como em lâminas com cortes desparafinizados.

2.8.1 Testes para lipídios

Para evidenciar a presença de lipídios, foi aplicado teste de SUDAN IV (Gerlach, 1977), modificado por Silva Filho (com. pessoal). A modificação consta em diluir a solução estoque em partes iguais de álcool 96° e não em H₂O, como indica a rotina, evitando a precipitação do corante. Da mesma forma, na seqüência da rotina, quando o material deveria ser lavado em H₂O, usou-se álcool 96°. Foi empregado também o teste de SUDAN IV Rawlins (apud Clark, 1981) que, além da presença de lipídios, evidencia paredes suberizadas e cutícula.

2.8.2 Testes para proteínas

2.8.2.1 Reação de NINHIDRINA-SCHIFF (Yasuma & Ichikawa, 1953), modificada por Jensen (1962), foi feita para evidenciar proteínas totais. Para controle desta reação, procedeu-se à desaminação e acetilação de material correspondente, cuja coloração revela a presença dos mesmos radicais livres, porém em compostos não protéicos.

2.8.2.2. Reação de SAKAGUCHI (Van Pilsum, 1959), foi usada para testar a presença do aminoácido arginina das proteínas.

2.8.2.3. Reagente de MILLON, utilizado para identificar a presença de proteínas, grupos fenólicos, éteres fenólicos e seus glicosídeos (Sass, 1940).

2.8.3 Teste para reservas, constituintes de parede e secreções em geral

Reativo de STEIMETZ modificado (Lima, 1963), teste de múltiplas aplicações, usado por permitir a obtenção de resultado policrômico, devido à multiplicidade de constituintes que o reagente evidencia.

2.8.4 Testes para taninos

Reações com SULFATO FERROSO (Reeve, apud Jensen, 1962) e com CLORETO FÉRRICO (Haslam, 1966) foram feitas para testar a presença de taninos.

2.8.5 Teste para amido

Reagente de MELZER (Gilbertson & Ryvardeen, 1986) foi utilizado para tentar identificar a presença de grãos de amido.

2.8.6 Teste para polissacarídeos totais

Reação PAS (Gerlach, 1977), que testa a presença de polissacarídeos totais, celulose, glicose e amido, foi feita com a presença ou não de ácido periódico. O teste com a ausência de ácido periódico foi utilizado como controle da técnica.

3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DE SOLOS

Os resultados da análise do solo, usado no experimento estão apresentados no Anexo I, que mostra os parâmetros deste substrato.

3.2 DADOS METEOROLÓGICOS

As temperaturas do ar e do solo no período de março de 1987 a fevereiro de 1988, estão apresentadas nas figuras 1 e 3. A figura 2 mostra as normais de 30 anos de temperaturas do ar. O diagrama de barras (figura 4) compara os dados sobre as precipitações durante o período do experimento com as normais de 30 anos (1931 a 1960). Analisando os dados constantes no diagrama, pode-se observar que a precipitação não foi um fator relevante para o desenvolvimento dos embriões. Os períodos mais secos foram compensados com regas, para manter a umidade necessária ao desenvolvimento do embrião.

3.3 MEDIDAS DE EMBRIÕES

Os embriões foram excisados das sementes, medidos segundo seu maior eixo (hipocótilo-radícula) e os dados obtidos apresentados na figura 5. A partir destes resultados, pôde-se observar que o crescimento dos embriões acentuou-se 8 meses após o início do experimento, tendo algumas unidades atingido tamanho de embrião maduro no final deste período, ou seja, 12 meses após o plantio (figura 6). Ao longo deste tempo, foram encontrados, com mais frequência, embriões em estágio de coração, medindo de 0,35 a 0,45 mm, com

baixas percentagens de embriões menores que 0,25mm. Somente no final do experimento, observaram-se embriões com mais de 1,00 mm (figura 6).

3.4 DESCRIÇÃO DA SEMENTE

As sementes de *Ilex paraguariensis*, desconsiderando os envoltórios (figura 7) medem, em média, 3,06mm de comprimento. São envoltas externamente por um endocarpo lenhoso, constituindo o pireno (figura 8). Abaixo do endocarpo lenhoso há uma camada de esclereídeos com espessamento de parede, concentrado nas paredes periclinais internas e anticlinais. Logo abaixo desta camada, há um parênquima formado por células achatadas de paredes delgadas. Estas três camadas envolvem o endosperma, que é formado por células de tamanho irregular, sendo que a camada mais externa de células do endosperma é coberta por uma cutícula (figuras 9 e 10).

As células do endosperma contêm reservas, cuja distribuição e concentração se modificam ao longo do desenvolvimento embrionário (figuras 11 e 12), sendo essas modificações mais evidentes na região próxima ao embrião em estágios mais avançados (figura 34).

O embrião, localizado na região micropilar do endosperma, ocupa apenas uma pequena área no interior deste tecido nutritivo (figura 13). Durante o desenvolvimento, seu comprimento varia de 0,25mm a 1,5mm, que, acrescido de seus aspectos morfológicos, pode ser classificado nos estágios de globular, de coração, pós-coração, torpedo e maduro. Também na região micropilar do endosperma, circundando o embrião e estendendo-se mais profundamente no endosperma, em maior ou menor grau, está a cavidade de digestão, originada pela lise de células do endosperma, resultante, provavelmente, da ação de enzi-

mas. A dimensão desta cavidade, aparentemente, não está relacionada com os diferentes estágios de desenvolvimento do embrião, pois embriões em início de desenvolvimento podem apresentar cavidades mais avantajadas do que embriões mais desenvolvidos (figuras 13 e 14).

Na porção do ápice radicular do embrião, encontra-se o suspensor, órgão de fixação e nutrição do embrião. Está presente desde estágios mais iniciais do desenvolvimento do embrião, apresentando-se unisseriado com uma célula identificável, (figura 15) ou com mais de uma célula (figuras 16 e 17), podendo, através de divisões transversais e longitudinais, formar um suspensor com mais de uma fileira de células, em fases mais adiantadas de desenvolvimento (figuras 18 e 19). Degenera-se de forma mais precoce (figuras 20 e 21) ou tardia (figuras 22 e 23), durante o desenvolvimento embrionário.

3.5 MORFOANATOMIA DO DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO

3.5.1 Estágio globular

Os embriões nesse estágio caracterizam-se por possuir forma esférica sem modificações aparentes a nível de morfologia externa. Durante as análises morfoanatômicas não foram encontrados embriões nesse estágio.

3.5.2. Estágio de coração

Nas amostras das primeiras coletas, a maioria dos embriões se apresentavam no estágio de coração. Este estágio caracteriza-se pela formação dos

primórdios cotiledonares, não havendo diferenciação nítida de tecidos, (figura 24).

3.5.3 Estágio de pós-coração

Neste estágio, os embriões estão mais desenvolvidos. Há início de diferenciação dos tecidos. A protoderme é o primeiro tecido a ser identificável (figura 25).

Na porção apical radicular evidencia-se o promeristema, onde se localizam as células iniciais, que darão origem à raiz primária (figura 26).

Nesta mesma fase, já há início da formação do procâmbio, com células mais longas e estreitas que, inicialmente, só ocupam a parte central do eixo hipocótilo radícula (figura 27), estendendo-se mais tarde até os cotilédones (figura 28).

3.5.4 Estágio de torpedo

O eixo embrionário e cotilédones estão bem desenvolvidos (figura 29), com diferenciação mais pronunciada de elementos procambiais. As células iniciais do ápice radicular são bem visíveis.

3.5.5 Estágio maduro

Os cotilédones estão bem mais desenvolvidos do que nos estágios anteriores (figuras 30 e 32). As zonas meristemáticas ficam bem delimitadas, distinguindo-se protoderme, procâmbio e meristema fundamental (figura 31). O ápice radicular apresenta células iniciais bem evidentes, parcialmente cobertas por células de conteúdo mais denso, que formam a coifa (figura 33). Há diferenciação clara de sistema de condução, com células mais longas e estreitas na região do

meristema provascular e diferenciação de elementos condutores do xilema - elemento vascular com espessamentos helicoidais - (figura 34).

Nesta fase de desenvolvimento do embrião, nota-se uma pronunciada modificação nas reservas das células do endosperma (figuras 12 e 34).

3.6 HISTOQUÍMICA

Os testes realizados permitiram identificar a natureza das reservas do endosperma e estão sumarizados na tabela abaixo.

Tabela 1- Reações em sementes de erveira em material fresco (Fr.) e material fixado (Fx.)

	Endosperma						Envoltórios					
	Reservas		Parede Cel.		Cutícula		Interno		Externo			
	Fr.	Fx.	Fr.	Fx.	Fr.	Fx.	Fr.	Fx.	Fr.	Fx.		
Sudan IV Gerlach	+++	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	
Sudan IV Rawlins	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Steimetz	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	
PAS c/ác.per.	ñ	-	ñ	++	ñ	-	ñ	-	ñ	-	-	
Ninhydrina-Schiff	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Millon	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Intensidade de coloração:	forte						+++					
	médio						++					
	fraco						+					
	sem coloração						-					
	teste não realizado						ñ					

O material fresco, não - corado (controle), apresenta um envoltório interno de cor castanha e um envoltório externo de cor dourada, enquanto as paredes, o conteúdo celular, a cutícula e o endosperma são hialinos (figura 35).

Os testes realizados para lipídios foram positivos em material fresco, sendo que a coloração mais intensa foi obtida com SUDAN IV (Gerlach, 1977), que evidenciou o conteúdo lipídico das células e a cutícula em torno do endosperma (figura 36).

Estes testes, aplicados em material fixado, foram negativos, pois os lipídios são eliminados pelos solventes orgânicos, durante a rotina de processamento do material, para inclusão em parafina.

Os testes realizados para proteínas totais (Reação de Ninhidrina-Schiff), evidenciaram presença de grupos protéicos através da coloração rosada de corpúsculos do protoplasto (figura 38). Esta reação também corou intensamente o embrião, mostrando presença de proteínas (figura 37). Os controles deste teste, submetidos à acetilação e desaminação, deram resultado negativo, demonstrando não haver grupos α -amino e α -carboxil de compostos não protéicos, confirmando, portanto, a natureza química das reservas do endosperma.

Em material fixado, ficaram destacados somente os corpúsculos protéicos, com cor rosa claro (figura 39), provavelmente por dissolução das estruturas lipídicas envolventes dos vacúolos que as continham.

Com o reagente de MILLON obteve-se uma fraca coloração telha, para os corpúsculos protéicos do endosperma. A cutícula corou de alaranjado.

A reação de SAKAGUCHI, que evidencia a presença de proteínas contendo arginina, produziu resultado negativo.

Com Reativo Universal de STEIMETZ, evidenciaram-se as reservas lipídicas do endosperma e da cutícula, com coloração alaranjada. Os envoltórios interno e externo coraram em tons amarelados. Os corpúsculos protéicos assumiram uma

coloração dourada, possivelmente devido à coloração dos envoltórios lipídicos das membranas vacuolares (figura 40). Este teste serviu ainda para verificar a presença de amido, tendo apresentado resultado negativo, o que foi confirmado pelo teste com reagente de MELZER.

Os dois testes aplicados para taninos resultaram negativos para semente, tanto em material fresco quanto fixado (figura 41).

A Reação PAS com ácido periódico evidenciou com cor rosa a presença de polissacarídeos nas paredes celulares do endosperma e polissacarídeos solúveis na cavidade de digestão que circunda o embrião (figura 42). A mesma reação sem ácido periódico resultou negativa.

Após a realização dos testes histoquímicos, pôde-se identificar que as reservas do endosperma são de natureza lipoprotéica, sem ocorrência de amido, e evidenciar polissacarídeos na parede celular.

4. DISCUSSÃO

Na germinação de sementes, pode haver uma discrepância entre os resultados obtidos em condições de laboratório e de campo, para um mesmo lote de sementes (Mayer & Poljakof-Mayber, 1975).

Optou-se por montar o experimento ao ar livre, para tentar repetir as condições ambientais naturais, onde usualmente ocorre o desenvolvimento dos embriões de *Ilex paraguariensis* e a germinação. Apesar de o solo ser mais que um substrato passivo para a semente, levaram-se em consideração somente suas propriedades físicas, pois, em experimentos anteriores, havia sido verificado que, em solos com alto teor de argila, ocorre maior retenção de água, com deficiência de oxigênio, o que não é favorável à sanidade das sementes da espécie. Em Siqueira (1987) há sugestões quanto à adubação e ao plantio para esta espécie, não havendo referência quanto ao tipo de solo. As sementes possuem normalmente os elementos minerais essenciais, para que a plântula seja independente de suprimentos externos por um considerável período de tempo (Kozlowski, 1972).

As condições climáticas ambientais - como temperatura e água - têm profundas influências sobre a germinação.

Algumas sementes dormentes necessitam de flutuação de temperatura, para saírem deste período (Fenner, 1985), outras necessitam de choque térmico de baixa temperatura, seguido de altas temperaturas, para induzir uma germinação mais rápida (Kozlowski & Kramer, 1979).

A germinação é um processo complexo e de múltiplas etapas; uma mudança na temperatura pode afetar uma fase deste processo individualmente, desenca-

deando o fenômeno e podendo induzir o processo germinativo como um todo. Alguns resultados obtidos sugerem ser a alternância de temperatura o que determina a germinação. O procedimento mais comum usado para exposição de sementes a baixas temperaturas é o da estratificação. Durante este tempo podem ocorrer modificações na semente, como aumento do número de células do eixo embrionário. Neste período, o balanço das substâncias de crescimento pode mudar consideravelmente, tendo sido constatada a presença de inibidores de crescimento, como ácido abscísico (ABA), em muitas sementes. Observou-se que, durante estratificação, o nível de ABA cai nas sementes de *Juglans regia* e *Corylus avellana*. Em alguns casos, porém, a necessidade de baixas temperaturas pode ser substituída por tratamento com ácido giberélico, supondo-se que, na estratificação este ácido seria formado (Mayer & Poljakof-Mayber, 1975).

Foi observado que a percentagem de germinação de sementes frescas de *Ilex paraguariensis*, plantadas diretamente no solo, é mais alta do que a das sementes que sofreram o processo de estratificação (Schuch, 1983).

Comparando os gráficos de temperaturas do ar e solo (figuras 1 e 3) com o de desenvolvimento dos embriões (figura 5), constata-se que os embriões de pirenos plantados diretamente no solo, sem sofrer processo de estratificação, passaram por um período de altas temperaturas, seguindo-se os meses de inverno, com temperaturas mais baixas, em que não apresentaram crescimento. Quando houve um aumento da temperatura na primavera e no verão, ocorreu o crescimento de muitos deles.

A temperatura pode ter influenciado favoravelmente no desenvolvimento dos embriões de diversas maneiras. O período frio ou as oscilações térmicas po-

dem ter atuado no mecanismo da quebra de dormência. Quando esta ocorreu, os embriões, já mais desenvolvidos, encontraram a temperatura ótima para completar o desenvolvimento.

Baixas temperaturas resultam em baixa atividade respiratória e baixo quociente respiratório, o que favorece o acúmulo de materiais formativos para a germinação (Stokes, 1965). Observações feitas em 1664 por Evelyn, J.S. (apud Stokes, 1965) mostram que, colocando sementes de *Ilex* em solo ou areia úmida, em barris, ao ar livre, durante o inverno, elas germinam bem, o que não ocorre se forem colocadas durante a primavera.

O tamanho dos embriões tem uma correlação com o estágio de amadurecimento embrionário. Dependendo do autor, a classificação dos embriões, nos vários estágios de desenvolvimento, apresenta diferenças quanto aos intervalos de medidas de comprimento, considerando o eixo maior do embrião, como é demonstrado na tabela a seguir.

Tabela 2 - Classificação dos embriões segundo medidas de seu maior eixo, em mm

Estágios de desenvolvimento	Ferreira e Hu (1984)	Niklas (1987)	presente trabalho
globular	< 0,30	< 0,19	< 0,20
coração	0,30 a 0,50	0,20 a 0,29	0,20 a 0,45
pós-corção	0,50 a 0,70	0,30 a 0,40	0,45 a 0,70
torpedo	0,70 a 1,40	0,40 a 0,80	0,70 a 1,00
maduro	> 1,40	> 1,00	> 1,00

Coelho, G.C. e cols. (com. pessoal) propuseram um índice quantitativo para indicar as referidas fases de desenvolvimento embrionário. Este índice expressa a razão entre comprimento e largura máxima de embriões excisados e foi relacionado com as fases de desenvolvimento denominadas por outros autores, através de uma avaliação visual qualitativa (Ferreira & Hu, 1984). A própria denominação "heart-shaped" sugere o critério visual que originou esta denominação. As fases foram delimitadas de acordo com intervalos de classe, tanto pela medida dos índices calculados como por avaliação visual simples, sugerida por Hu (com. pessoal).

Este índice, aplicado ao material em lâminas permanentes, do presente trabalho, foi o que melhor se ajustou à classificação dos embriões, levando em conta não somente as medidas, mas também as condições morfoanatômicas nos diferentes estágios.

Para os embriões frescos, o critério de medida foi o do comprimento do eixo maior do embrião, pois, nesta fase do experimento, os resultados do trabalho sobre o índice das medidas ainda não havia sido relatado. O resultado dessas medidas consta no diagrama de barras da figura 6. A maior parte dos embriões encontra-se em estágio de coração, apresentando medidas que variam de 0,20 a 0,45mm.

Dados ainda não publicados sobre tamanho de embriões de frutos recém coletados de *Ilex paraguariensis*, encontrados em trabalhos de vários autores, confirmam que a moda da distribuição destes embriões recai sempre no estágio de coração (Winge; Cunha; Almeida-Cortez, com. pessoal). Estes dados, bem como

os do presente trabalho, sugerem que os embriões em *Ilex paraguariensis* entram em dormência neste estágio.

Winge e col. (com. pessoal) sugerem que esta dormência se instala quando os frutos ainda se encontram na planta-mãe, pois embriões de frutos brancos apresentam, neste período, medidas semelhantes às de embriões de frutos maduros.

Este caráter rudimentar dos embriões, comparado ao do desenvolvimento do fruto, foi descrito por Ives (1923) para o gênero *Ilex*, confirmado por Hu (1975) para onze espécies do respectivo gênero e por Ferreira e Hu (1984) para *Ilex paraguariensis*.

Hu e cols. (1979) sugere que embriões rudimentares de várias espécies de *Ilex*, cessam seu desenvolvimento no estágio de coração, com diferenciação dos três sistemas de tecido: protoderme, meristema fundamental e procâmbio.

Analisando os embriões morfoanatomicamente, nas diversas fases de desenvolvimento, pôde-se observar que nas fases iniciais, apresentavam-se em estágio de coração, com cotilédones pouco desenvolvidos, o que não seria comum para embriões de frutos maduros. Estes embriões poderiam ser classificados como dormentes, já que lhes é necessário, após a liberação da unidade de dispersão, um período adicional de desenvolvimento antes de se tornarem capazes de germinar, como sugerem Bewley e Black (1982). Para embriões de *Ilex paraguariensis* completarem este desenvolvimento, são necessários alguns meses. Durante este período, não há uma sincronia no desenvolvimento, pois alguns embriões permanecem em estágio de coração, enquanto outros iniciam o desenvolvimento, ocorrendo a diferenciação de tecidos esperada no desenvolvimento embrionário, ou seja, desenvolvimento dos primórdios cotiledonares

com início de diferenciação da protoderme e identificação das células iniciais do meristema apical da raiz, seguida de uma progressiva diferenciação dos tecidos de condução com elementos vasculares com espessamentos helicoidais (figura 34) e coifa (figura 33). Estas últimas diferenciações só foram observadas em embriões de pirenos que se encontravam há 10 meses no solo, não tendo sido identificadas em nenhuma etapa anterior do desenvolvimento.

Sementes de *Ilex paraguariensis* plantadas ao mesmo tempo podem germinar ao longo de vários meses (Winge e cols., com. pessoal). Isto leva a crer que o desenvolvimento dos embriões seja irregular, embora necessitem de um tempo mínimo para o desenvolvimento, sem o qual nenhum embrião germina.

Na análise, observou-se que, durante o desenvolvimento, alguns embriões, nos diferentes estágios, apresentavam suspensor. Este órgão é normalmente encontrado em estágios iniciais do desenvolvimento, constituindo-se parte do próprio embrião (Monnier, 1978).

Segundo Johri (1984) e Yeung e Sussex (1979) o suspensor parece ter um papel dinâmico não somente para nutrir o embrião em estágios específicos de desenvolvimento, mas exerce também um controle no crescimento, suprindo-o de importantes fitoormônios. Em *Capsella*, as paredes que separam as células individuais do suspensor são atravessadas por numerosos plasmodesmos, o que facilitaria a passagem destes nutrientes (Schulz & Jensen apud Johri, 1984). Sua taxa de crescimento é usualmente maior nos estágios iniciais da embriogênese (Johri, 1984).

Em *Ilex paraguariensis*, os embriões, em estágios menos avançados, apresentaram suspensor com poucas células enfileiradas (figuras 15, 16 e 17), en-

quanto embriões mais desenvolvidos mostraram suspensor pluricelular, com mais de uma fileira de células. (figura 18 e 19). O suspensor com múltiplas fileiras celulares poderia não aparecer, persistindo em certos casos, mais simples até sua degeneração.

O suspensor não foi encontrado em todos os embriões, sugerindo, em alguns casos, a ocorrência de sua degeneração em etapas do desenvolvimento inicial, quando os embriões ainda não têm capacidade de se nutrir ou que apresentam má formação deste.

Cionini e col. (apud Johri, 1984) demonstraram que, em *Phaseolus coccineus*, a remoção do suspensor não tem efeito em estágios tardios da embriogênese. Ácido giberélico (GA) pode substituir parcialmente a função do suspensor em cultura "in vitro", indicando que este órgão fornece GA ao embrião jovem. Alpi (apud Johri, 1984) mostrou que, em *Phaseolus*, no estágio de coração, o suspensor tem aproximadamente trinta vezes mais GA que no embrião, sendo semelhante a situação para citocininas e auxinas.

A ultra-estrutura do suspensor levou alguns autores a crerem que ele esteja envolvido na síntese de fitormônios, pois a abundância de retículo endoplasmático liso, observada nas células do suspensor, é característica de células ativas na síntese de terpenoídeos e GA (Johri, 1984).

Newcomb e Fowke (apud Yeung & Sussex, 1979) lançaram a hipótese de que a função do suspensor seria a de sintetizar substâncias não produzidas no embrião.

As células do suspensor sintetizam proteínas e lipídios e provavelmente produzem hormônios e enzimas, incorporando triptofano, precursor do ácido indolacético, entre outras substâncias (Buvat, 1989). Devido a esses aspectos,

duas funções foram atribuídas às células do suspensor - a de fornecer nutrientes ao embrião e a de secretar hormônios e enzimas.

Em *Phaseolus coccineus*, a presença do suspensor estimula o crescimento do embrião em cultura "in vitro", tendo sido obtido um maior número de plantas, quando este se encontra em estágio de coração (Yeung & Sussex, 1979). Os mesmos autores, ainda na referida obra, em estudos detalhados sobre ontogenia e estrutura do suspensor, confirmaram que o efeito do suspensor é específico para determinados estágios.

A presença do suspensor em cultura "in vitro", diretamente preso ou bem próximo ao embrião em estágio de coração, pode estimular seu crescimento, ao contrário do que ocorre com aqueles cultivados em sua ausência. Este fato sugere que o suspensor atua na síntese e/ou na secreção de substâncias utilizáveis para o desenvolvimento do embrião (Yeung & Sussex, 1979).

A progressiva independência do embrião com relação ao suspensor sugere que ele se tenha tornado auto-suficiente para giberilinas. Há evidências de que o endosperma não estaria bem desenvolvido, quando o embrião atinge o estágio globular, sendo consumido apenas nos estágios mais tardios da embriogênese, quando cessa a atividade do suspensor (Steeves & Sussex, 1989).

Em *Ilex paraguariensis*, as reservas protéicas encontram-se distribuídas dentro de células, por todo o tecido do endosperma já bem formado, não havendo maior concentração em regiões mais periféricas, e, por isso, não foi possível caracterizar uma camada de aleurona. Analisando estas reservas, puderam-se notar modificações tanto em material fresco como em fixado. Ao longo do desenvolvimento do embrião foram verificadas alterações morfológicas das reser-

vas. A figura 38 mostra células do endosperma, em secção de material fresco, nos quais foi evidenciada a presença de proteínas pelo teste de proteínas totais. Estas proteínas encontram-se dentro de vacúolos, ocupando grande parte da célula e sua análise sugere a existência de mais de um tipo de proteína .

Segundo Ashton (1976), os corpúsculos protéicos podem ser organelas esféricas ou ovais que contêm proteínas de reserva e outras substâncias, unidas por uma singular membrana limitante. Estudos da ultra-estrutura interna destes corpúsculos mostram que eles podem variar a estrutura interna e o tamanho.

Rost (apud Ashton, 1976) classificou as proteínas das angiospermas em três grupos, de acordo com as subunidades presentes: corpúsculos protéicos sem subunidades; corpúsculos protéicos com subunidades globóides; corpúsculos protéicos com subunidades globóides e cristalóides.

Na figura 39, o endosperma de material fixado mostra grande número de corpúsculos protéicos isolados, ovais, distribuídos no interior da célula. As modificações morfológicas foram causadas pela ação dos solventes orgânicos usados durante o processamento, que devem ter destruído a membrana lipoprotéica que envolve as proteínas.

Em cortes com material fixado, feitos durante as diversas fases de desenvolvimento do embrião, pôde-se observar que as reservas do endosperma, na região próxima ao embrião em estágio maduro, se apresentavam morfológica-mente diferentes (figuras 12 e 34) das reservas do endosperma de embriões em estágios menos avançados (figura 11). Nos estágios mais avançados, as reservas mostravam-se mais aglutinadas, ocupando grande parte da célula.

O que mais comumente ocorre com os corpúsculos protéicos, durante a germinação, é um intumescimento, seguido por uma degradação interna das proteínas, fusão de vacúolos e aparecimento de massas de proteínas parcialmente degradadas e/ou corpúsculos protéicos (Ashton, 1976). Bain & Mercer (apud Ashton, 1976) observaram que, em cotilédones de *Pisum sativum*, o conteúdo protéico se mostra aglomerado ou vacuolado, indicando uma quebra interna dos corpúsculos protéicos.

A utilização das reservas do endosperma é controlada pelo embrião que secreta fatores controladores, como giberelinas, que são sintetizadas pelo embrião, antes da mobilização das reservas do endosperma (Bewley & Black, 1982).

Em cevada, nas células de aleurona tratadas com GA, os corpúsculos protéicos coalescem e dão origem a vacúolos que ocupam a maior parte do volume celular (Paleg & Hyde, apud Ashton, 1976).

Em Leguminosas, no início do processo de germinação, a semente absorve água e os corpúsculos protéicos incham e, subsequente, as proteínas são degradadas a aminoácidos, devido a um acréscimo das atividades de endo e exopeptidases (Alvarez & Guerra, 1985).

Quando o suspensor supre o embrião dos necessários nutrientes e fitormônios para seu desenvolvimento, poucas modificações são observadas no endosperma. No embrião mais desenvolvido, sem suspensor, o metabolismo para germinação é ativado e, possivelmente, seja autótrófico para fitormônios, passando o embrião a nutrir-se, então, das reservas do endosperma, modificando sua estrutura morfológica.

Mello (1980), com teste de biureto em material seco, conclui serem as reservas das sementes de *Ilex paraguariensis*, proteínas e carboidratos. Diapp (1984), testando a presença de lipídios, na mesma espécie, com papel sulfite e Sudan III, chegou à conclusão complementar da existência também de lipídios. Tendo-se utilizado outros testes histoquímicos, pôde-se chegar à conclusão de que a natureza das reservas é lipoprotéica. Esta identificação é corroborada pela natureza lipoprotéica das reservas encontradas em *Ilex opaca*, bem como ausência de amido nas reservas (Ives, 1923). Isto foi verificado também para *Ilex paraguariensis*, tendo-se aplicado os testes de Melzer e Steimetz.

Os resultados obtidos permitiram evidenciar a importância de prosseguir nos estudos da embriogênese de *Ilex paraguariensis*, em particular do suspensor e sua ultra-estrutura. Sugere-se ainda estudos sobre a mobilização das reservas do endosperma desta mesma espécie, durante o desenvolvimento do embrião e germinação, para poder melhor precisar o momento em que ocorre a utilização das mesmas e confirmar as considerações apresentadas no presente trabalho.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há uma soma de fatores e/ou uma interação destes, que podem estar influenciando no lento desenvolvimento e na baixa percentagem de germinação de *Ilex paraguariensis*.

A dormência nos pirenos pode estar sendo causada pela presença de embrião rudimentar, que necessita de um período de pós-maturação para completar o seu desenvolvimento. Esta constatação foi evidenciada pelo grande número de embriões que ainda se encontravam em estágio de coração, durante o período do experimento.

Parece haver necessidade de um período de baixas temperaturas ou oscilações térmicas para quebra de dormência, e, subseqüentemente, de um período de temperaturas mais elevadas para promover a germinação.

A permanência do suspensor, por mais tempo, durante o desenvolvimento embrionário, permitiria aos embriões tornarem-se autotróficos quanto à regulação de crescimento, ocorrendo, então, uma dormência menos pronunciada nessas sementes.

Há modificação nas reservas do endosperma, na região próxima ao embrião, quando este se encontra em estágios mais avançados de desenvolvimento. Esta ocorrência sugere a utilização das reservas somente naquelas unidades cujo embrião se tornou autotrófico.

Os resultados dos testes histoquímicos permitiram confirmar a natureza lipoproteica das reservas do endosperma.

6. FIGURAS

A apresentação das fotografias foi feita em conjuntos que são precedidos de descrição geral, seguida de detalhes correspondentes às figuras e respectivas legendas.

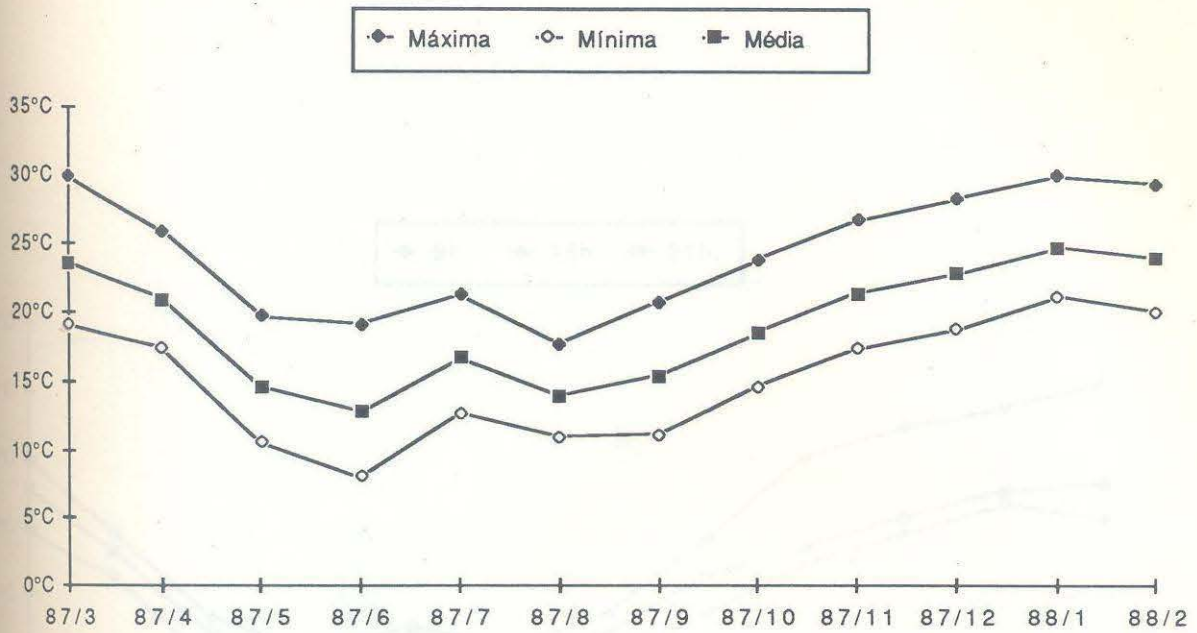


Figura 1: Médias mensais das temperaturas máxima, média e mínima do ar no período do experimento, março de 1987 a fevereiro de 1988

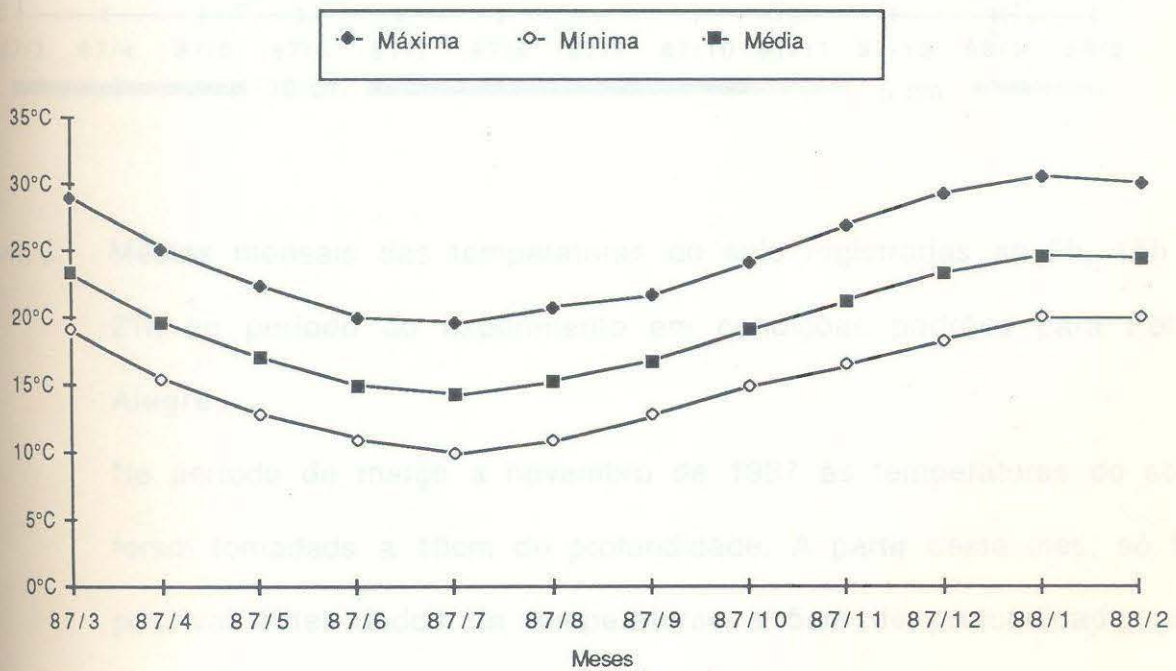


Figura 2: Normais das temperaturas máxima, média e mínima do ar no período de 1931 a 1960 em Porto Alegre.

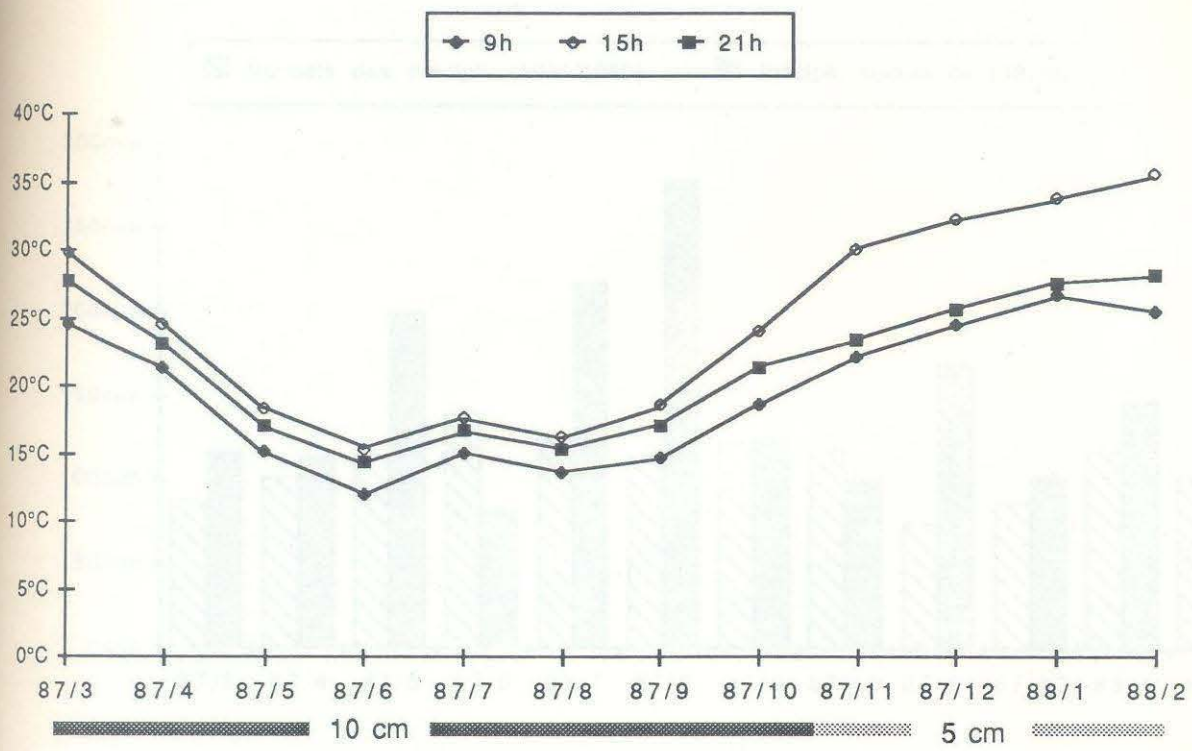


Figura 3: Médias mensais das temperaturas do solo registradas as 9h, 15h e 21h no período do experimento em condições padrões para Porto Alegre.

No período de março a novembro de 1987 as temperaturas do solo foram tomadas a 10cm de profundidade. A partir deste mes, só foi possível obter dados de temperaturas a 5cm de profundidade, por falha do equipamento.

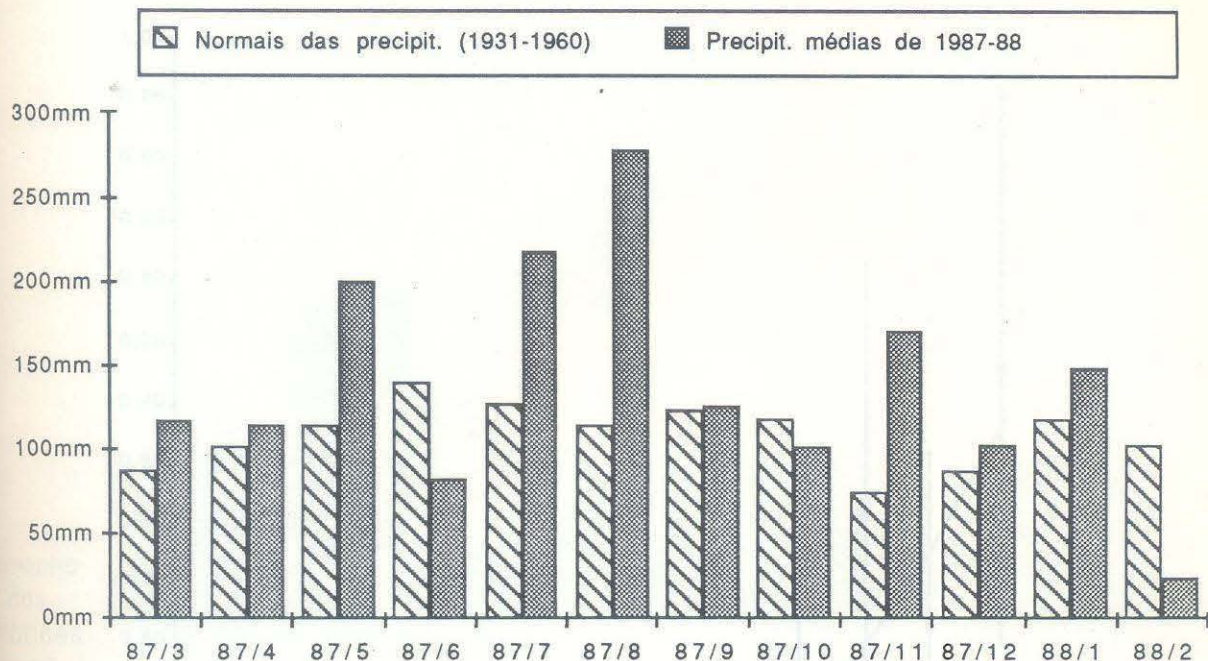


Figura 4: Normais das precipitações mensais de 30 anos (1931—1960) e médias das precipitações mensais no período do experimento. Comparando-se os níveis de precipitação do experimento com as normais de 30 anos, observa-se que meses de baixa precipitação no período do experimento foram precedidos ou antecidos de meses de alta precipitação.

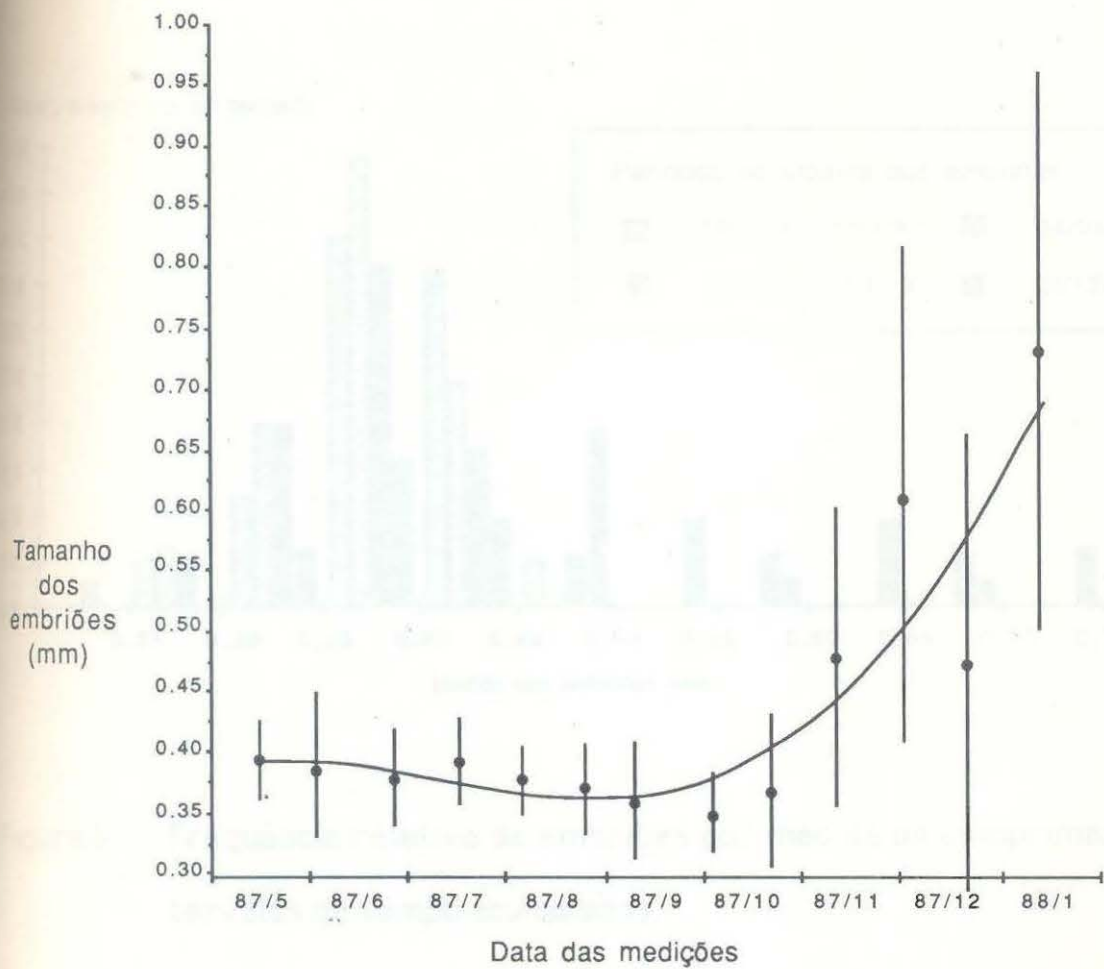


Figura 5: Média e desvio padrão do comprimento dos embriões de cada amostra e curva de regressão.

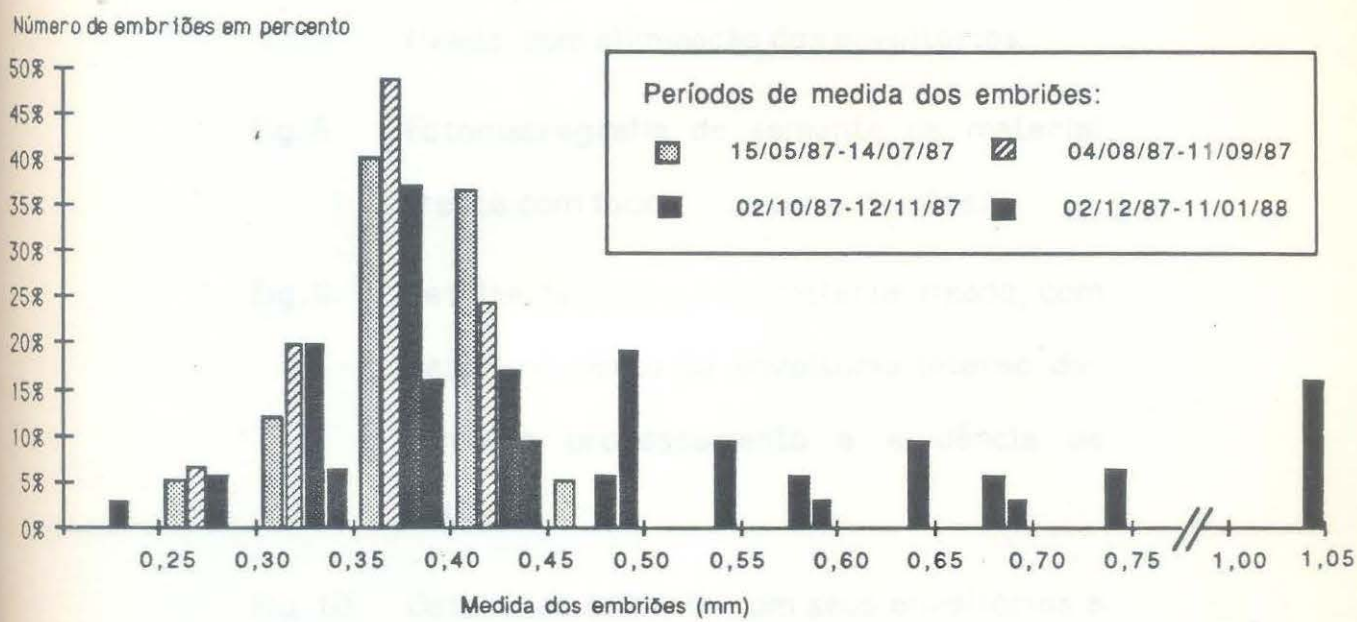


Figura 6: Frequência relativa de embriões por medida de comprimento em intervalos de tempo acumulados.

Morfologia interna das sementes de *Ilex paraguariensis*, em secção longitudinal.

Fig. 7. Fotomicrografia de semente de material fixado, com eliminação dos envoltórios.

Fig. 8. Fotomacrografia de semente de material fresco com todos seus constituintes.

Fig. 9. Detalhe da semente de material fixado, com desprendimento do envoltório interno durante o processamento e evidência da cutícula.

Fig. 10. Detalhe da semente com seus envoltórios e endosperma com material de reserva.

(cavidade de digestão - cd; cutícula - ct; embrião - e; endocarpo, ec; envoltório interno - ei; endosperma - en; envoltórios - ev; envoltório externo - ex; reservas - r; região micropilar - rm)

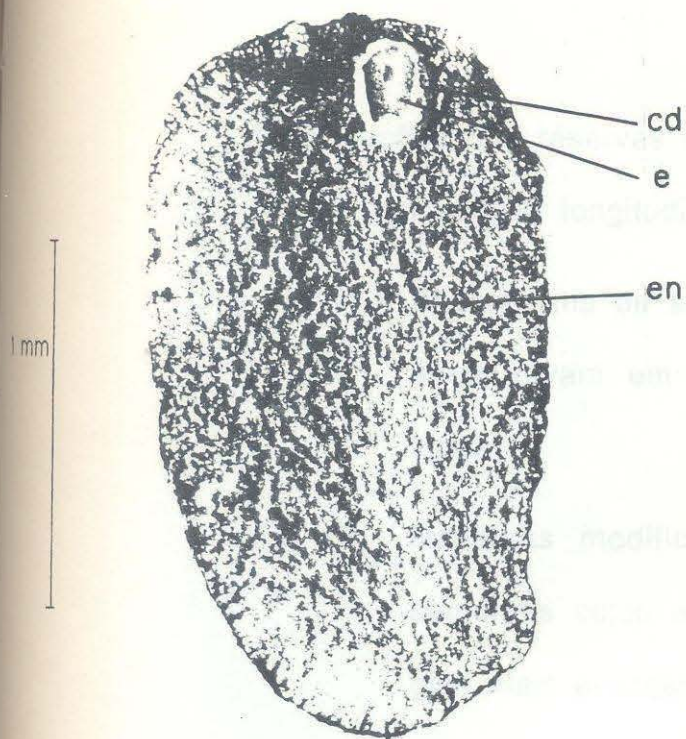


Figura 7

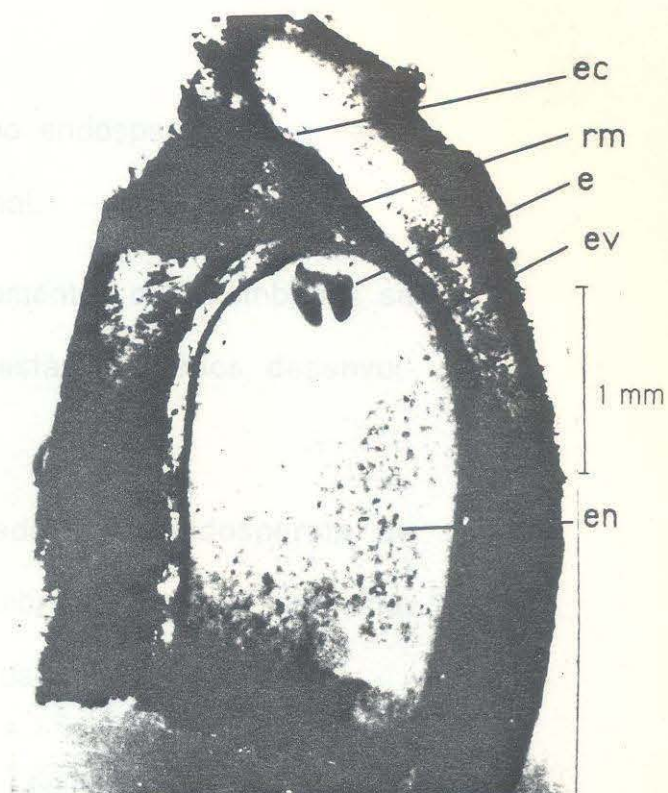


Figura 8

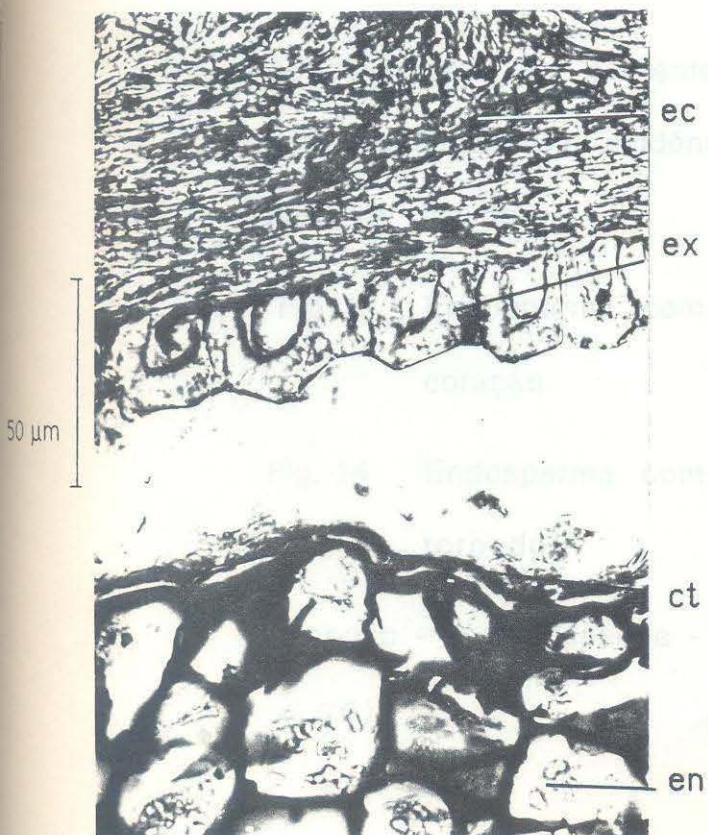


Figura 9

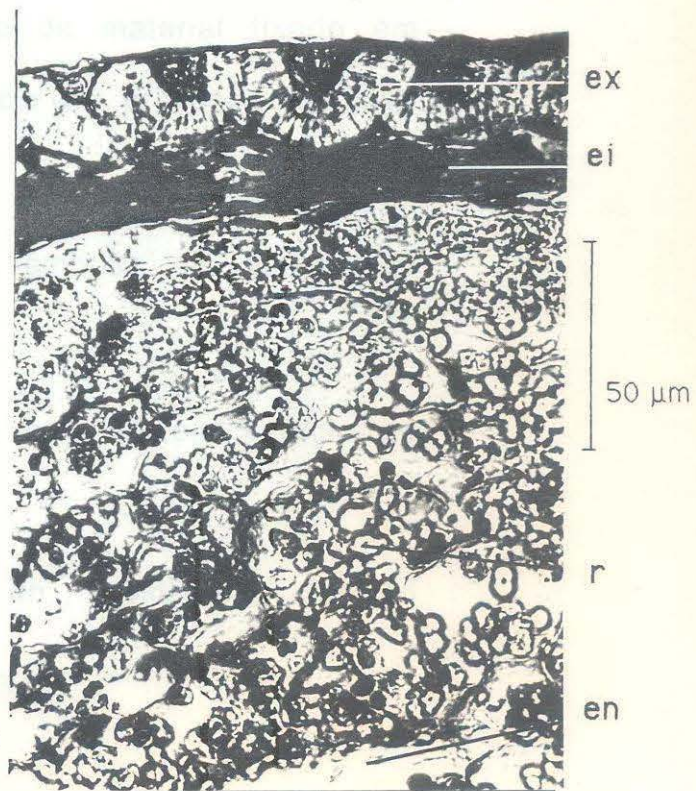


Figura 10

Modificações das reservas no endosperma de material fixado, em secção longitudinal.

Fig. 11 Endosperma de sementes cujos embriões se encontravam em estágios menos desenvolvidos.

Fig. 12 Reservas modificadas em endosperma de sementes cujos embriões estavam em estágios mais avançados da embriogênese

(reservas - r)

Aspecto geral da semente de material fixado em corte longitudinal e evidência de presença da cavidade de digestão.

Fig. 13 Endosperma com embrião em estágio de coração.

Fig. 14 Endosperma com embrião em estágio de torpedo.

(embrião - e; endosperma - en ; cavidade de digestão - cd)

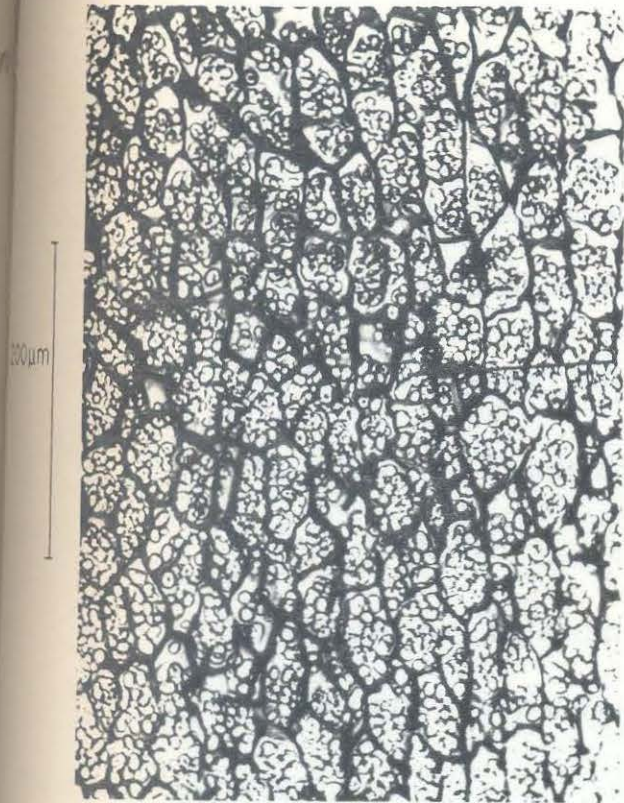


Figura 11

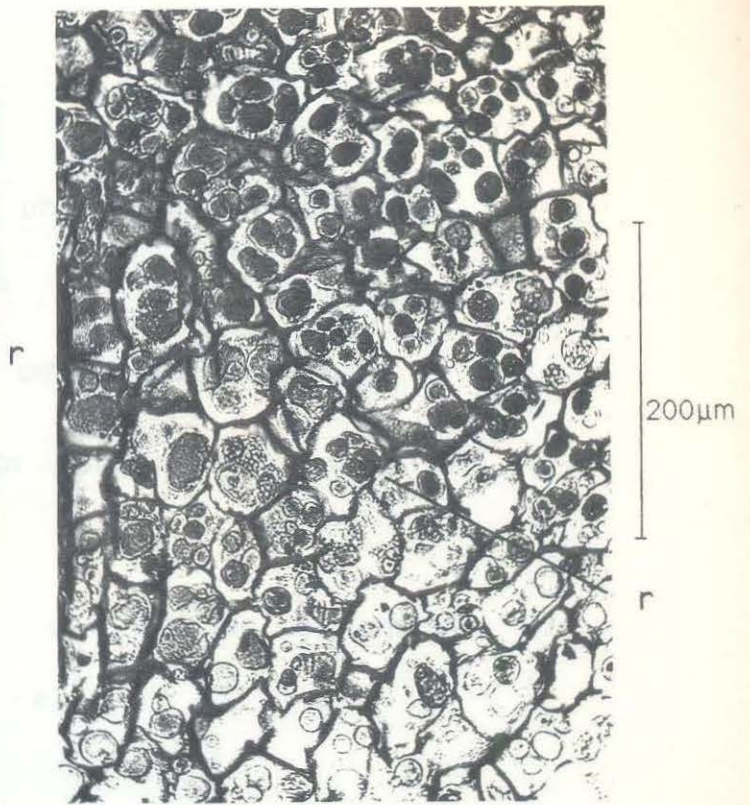


Figura 12

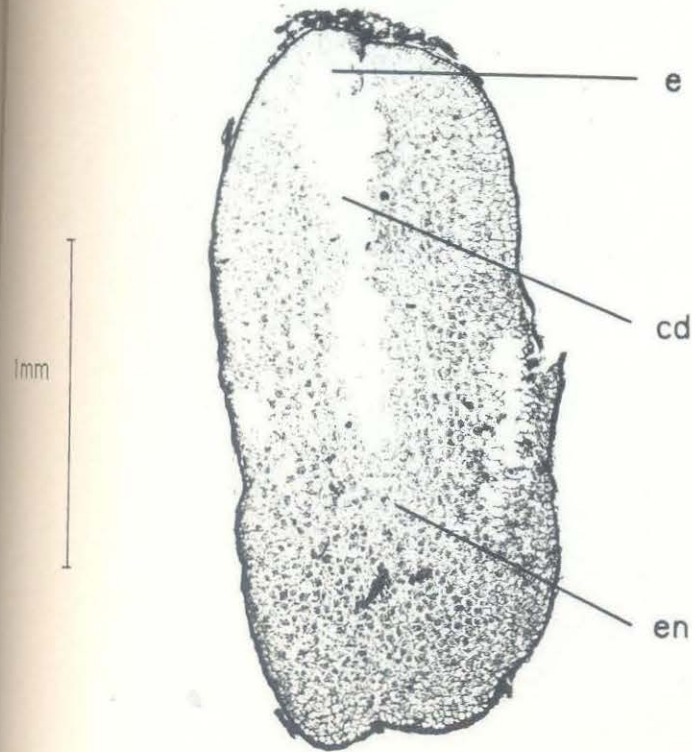


Figura 13

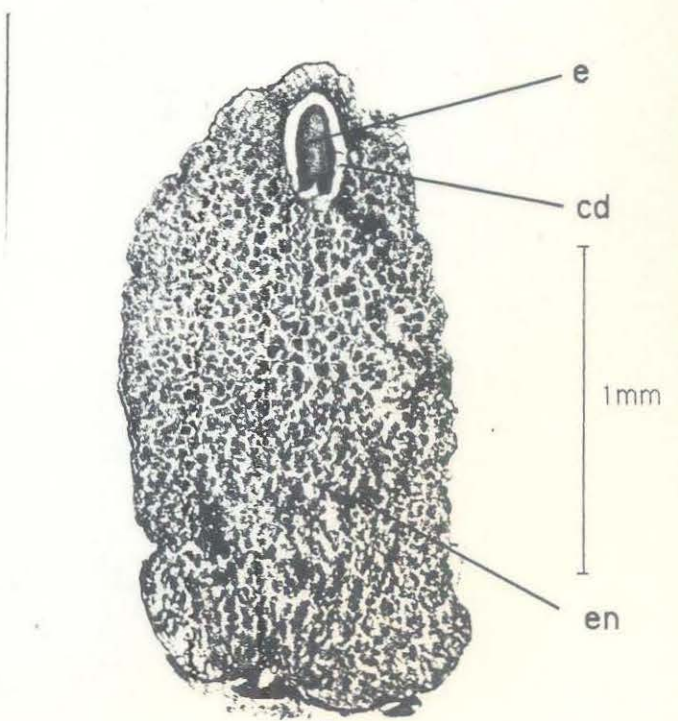


Figura 14

Morfologia do suspensor unisseriado em corte longitudinal de material fixado.

Fig. 15 Suspensor com uma célula identificável.

Fig. 16 e 17 Suspensor com maior número de células.

(cavidade de digestão - cd ; embrião - e; endosperma - en; suspensor - s)



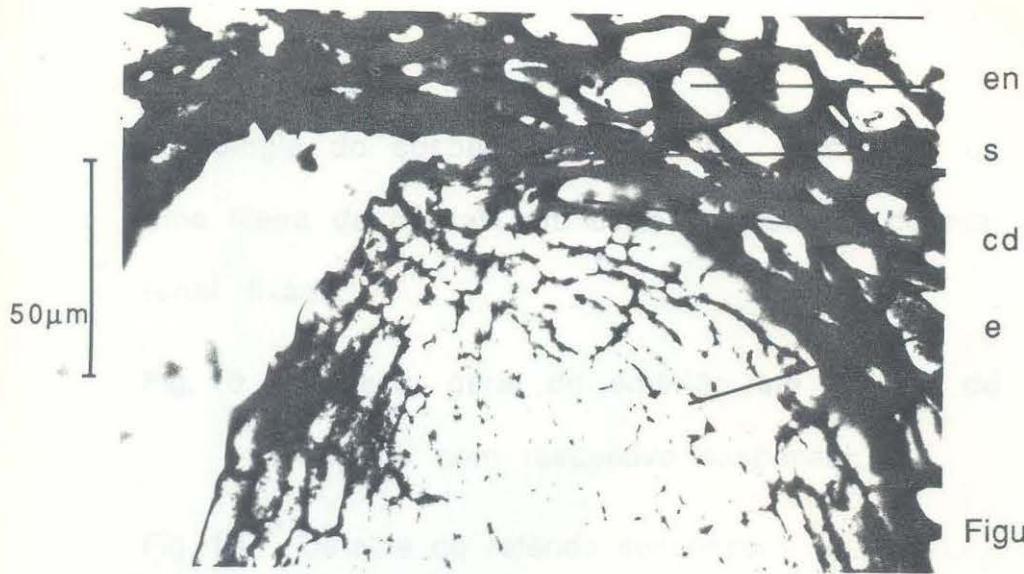


Figura 15

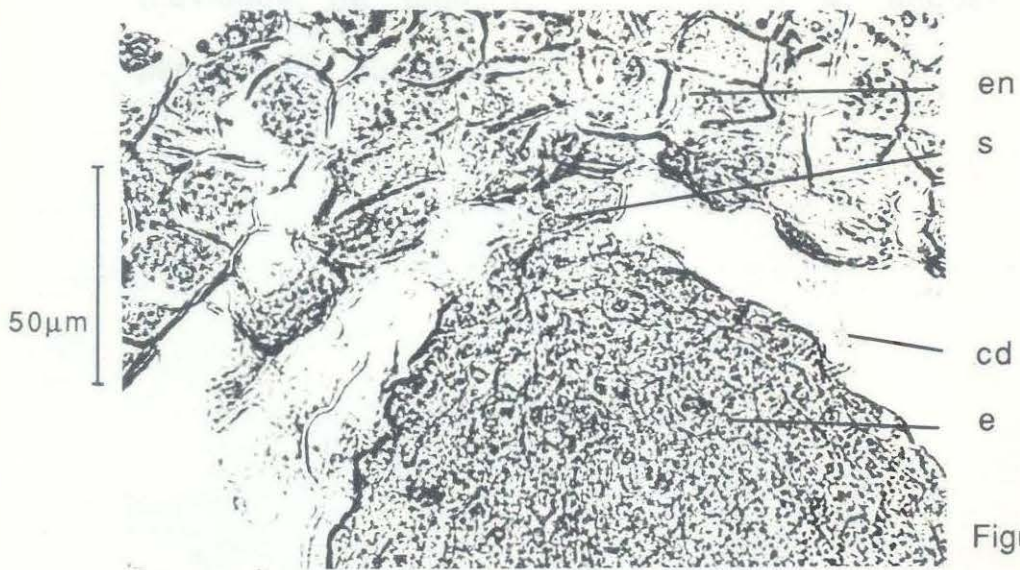


Figura 16



Figura 17

Morfologia do suspensor pluricelular, com mais de uma fileira de células, em corte longitudinal, de material fixado.

Fig. 18 Aspecto geral do embrião em estágio de torpedo com respectivo suspensor.

Fig. 19 Detalhe do referido suspensor.

(cavidade de digestão - cd; embrião - e; endosperma - en; suspensor, s).

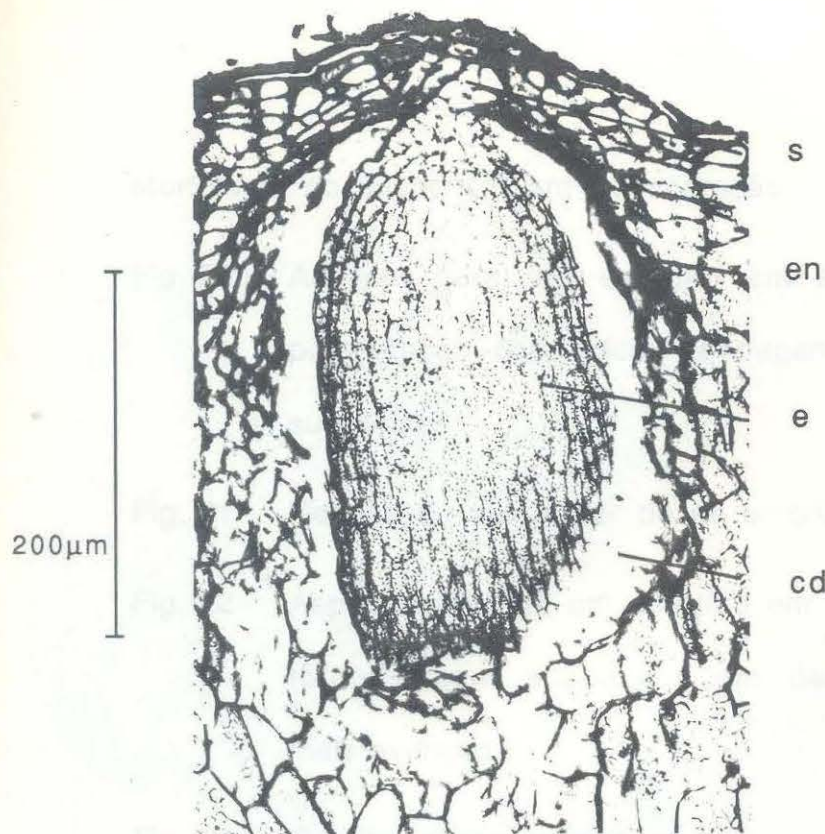


Figura 18

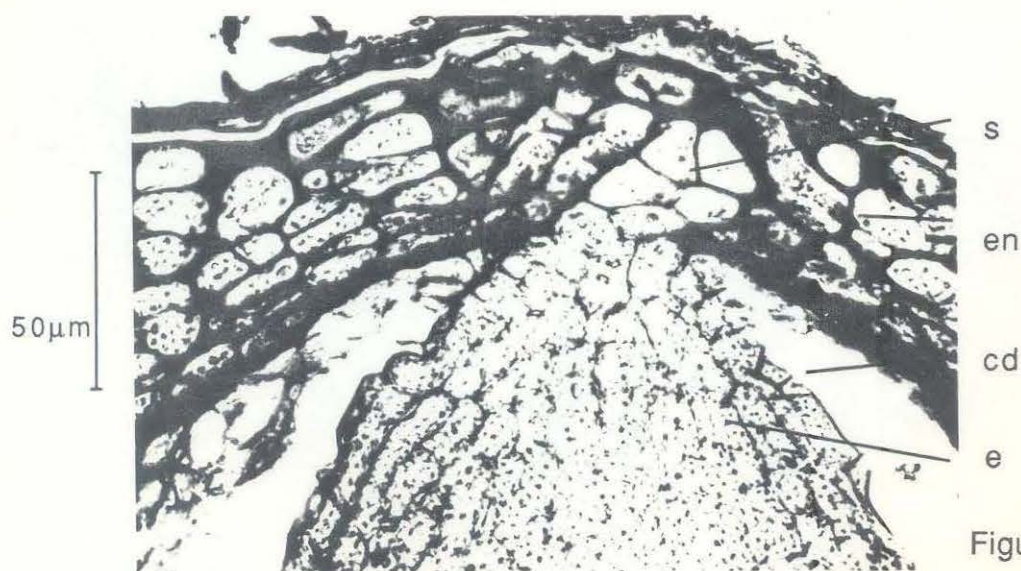


Figura 19

Morfologia do suspensor em degeneração.

Fig. 20 Aspecto geral de embrião em estágio de pós-coração com início de degeneração do suspensor.

Fig. 21 Detalhe do suspensor desse embrião.

Fig. 22 Aspecto geral de um embrião em estágio de torpedo com suspensor em degeneração mais avançada.

Fig. 23 Detalhe desse suspensor.

(cotilédones - c; cavidade de digestão - cd; embrião - e; endosperma - en; suspensor - s).

200µm

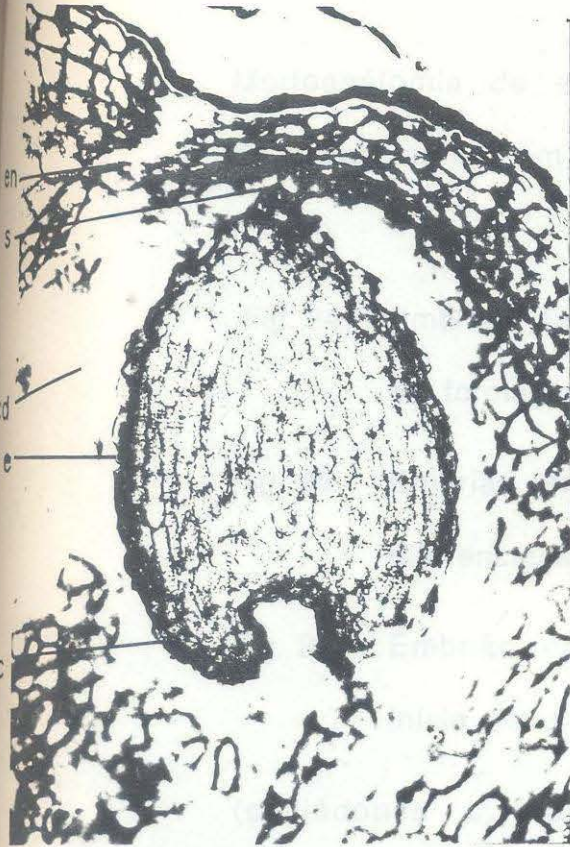


Figura 20

25µm

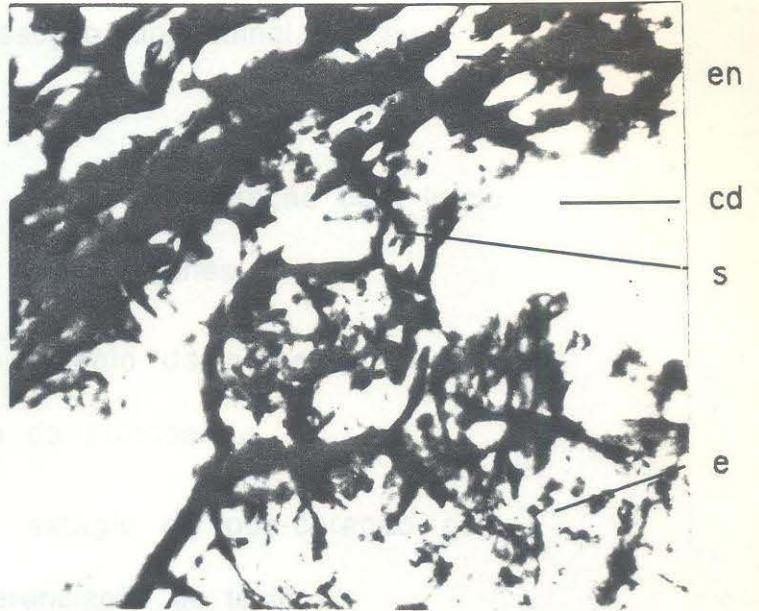


Figura 21

50µm

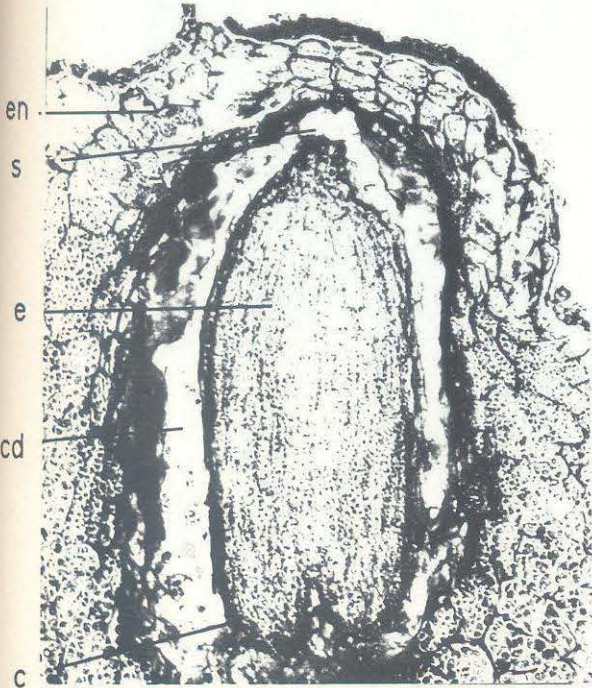


Figura 22

en s cd e

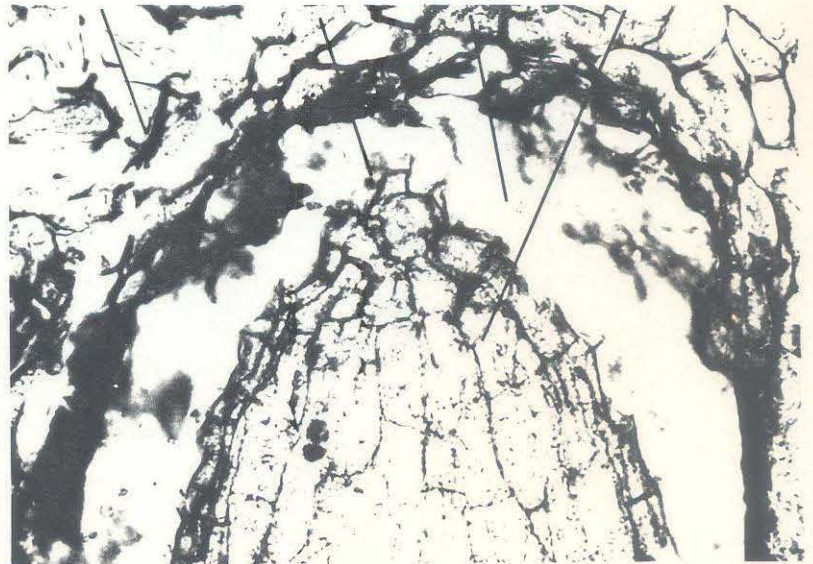


Figura 23

200µm

Morfoanatomia de embriões nas diversas fases de desenvolvimento, em secção longitudinal, de material fixado.

Fig. 24 Embrião em estágio de coração com início de formação de cotilédones.

Fig. 25 Embrião em estágio de pós-coração com diferenciação da protoderme.

Fig. 26 Embrião em estágio de pós-coração com início de diferenciação de tecidos.

(cotilédones - c; cavidade de digestão - cd; embrião - e; endosperma - en; procâmbio - pc; protoderme - p; promeristema - pm)

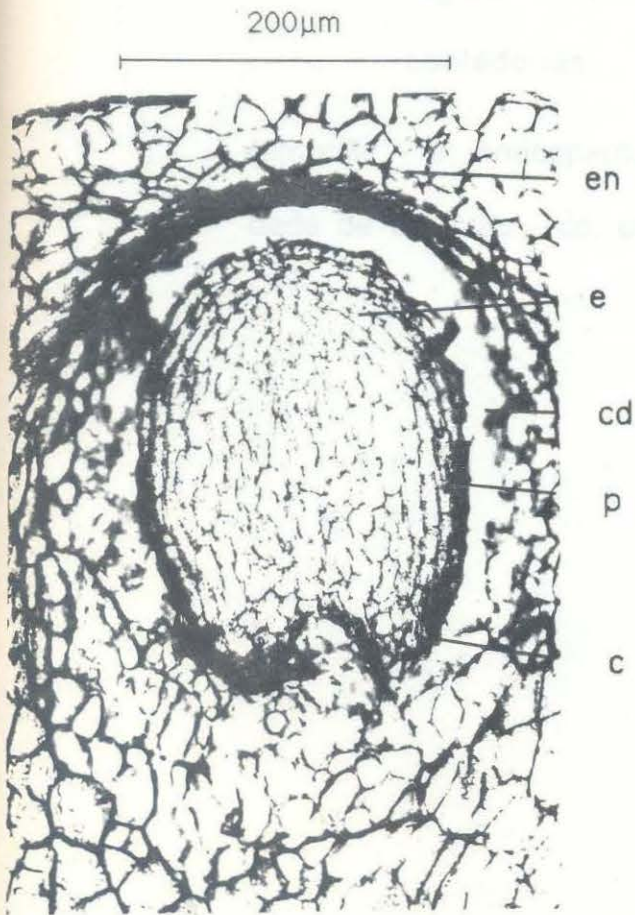
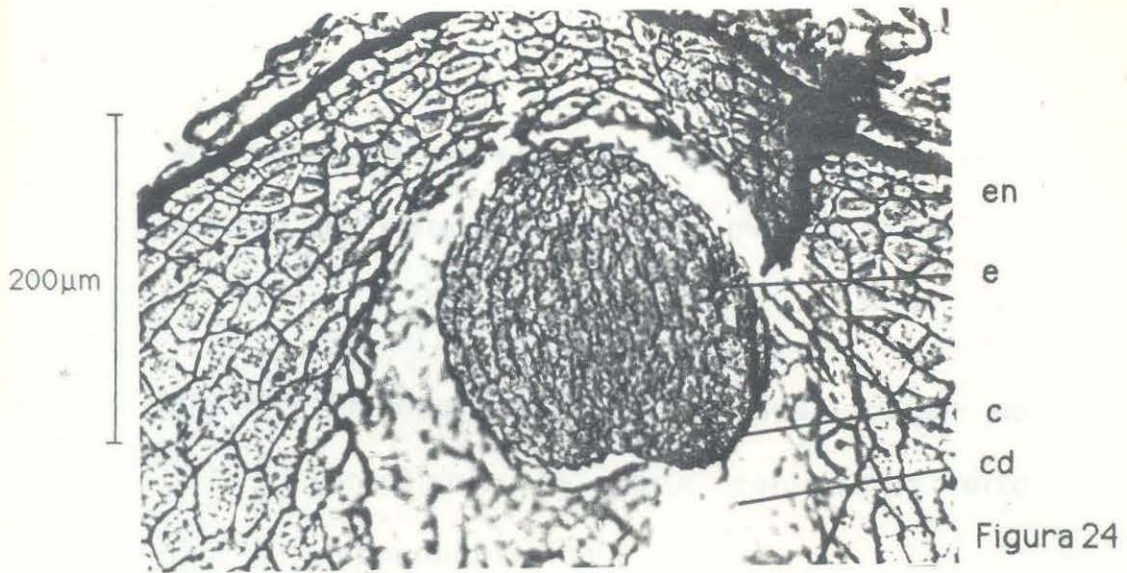


Figura 25

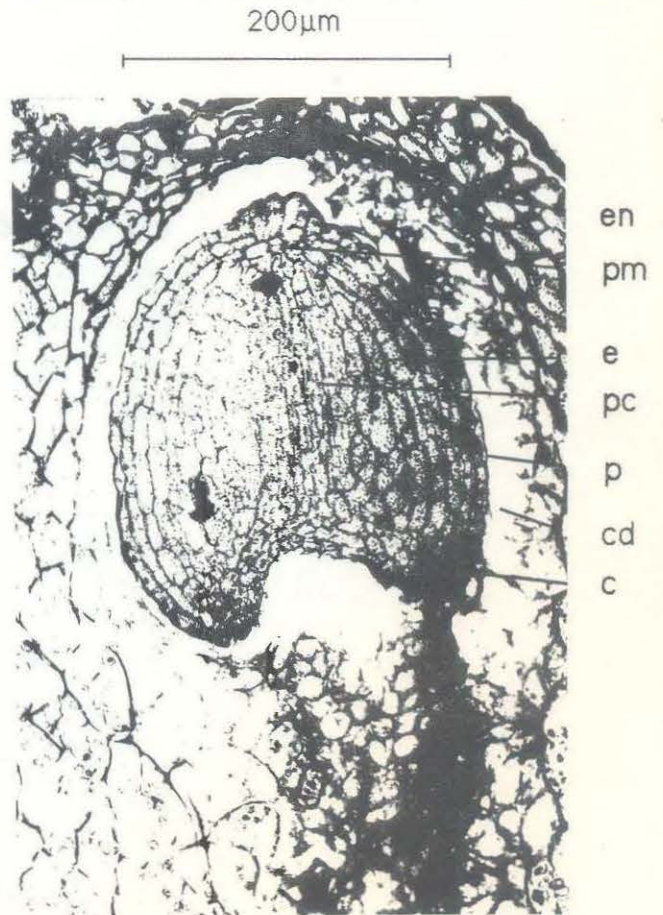


Figura 26

Morfoanatomia de embriões em estágio de pós-coração, em corte longitudinal, de material fixado.

Fig. 27 Embrião com início de diferenciação do procâmbio na parte central do eixo hipocótilo-radícula.

Fig. 28 Embrião com diferenciação do procâmbio na região mediana, estendendo-se até os cotilédones.

(embrião - e; endosperma - en; cotilédones - c; cavidade de digestão - cd; procâmbio - pc)



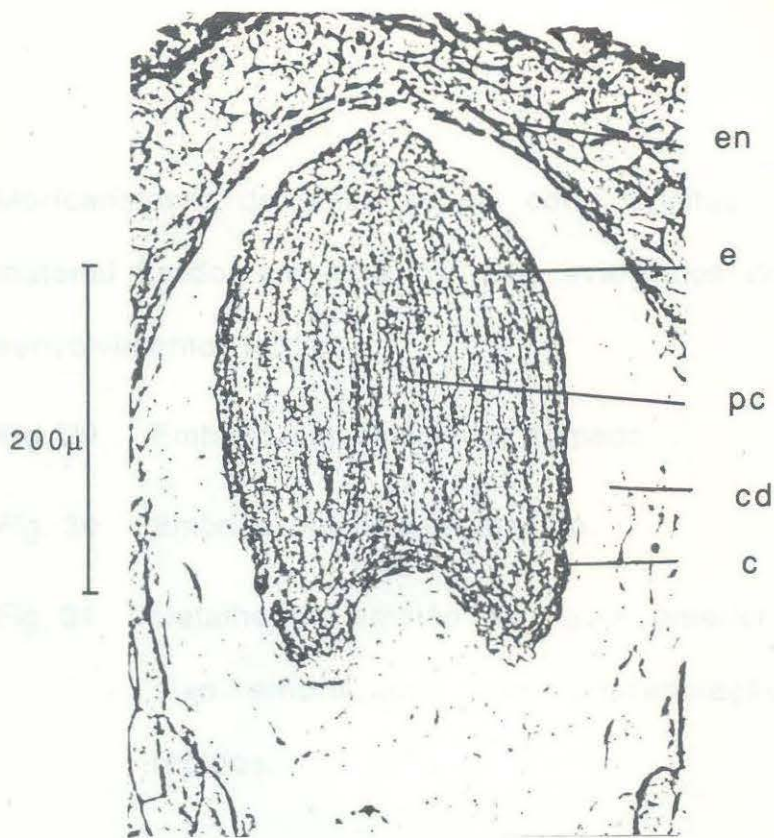


Figura 27

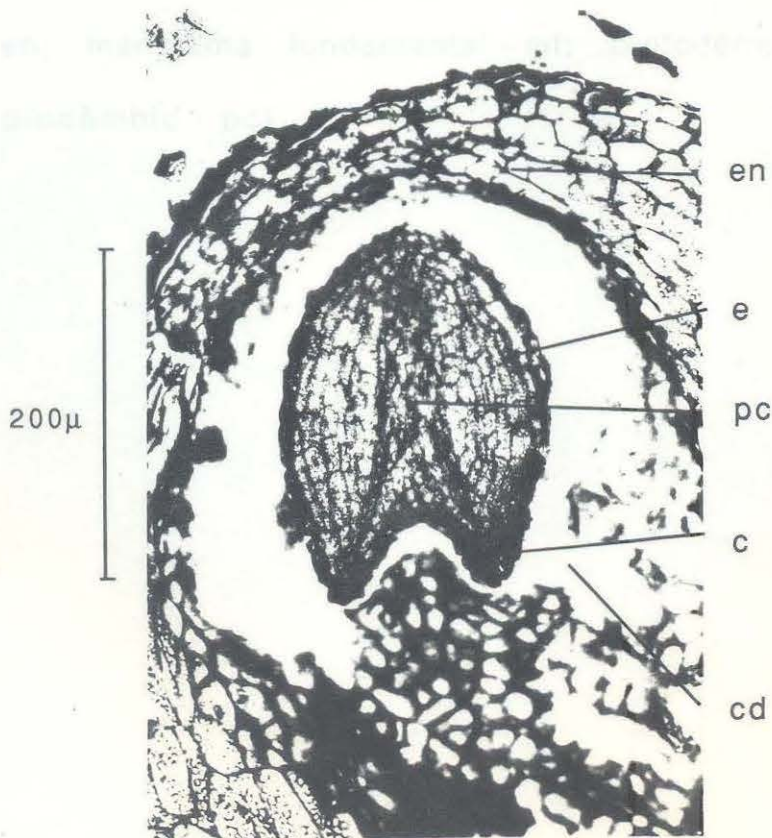


Figura 28

Morfoanatomia de embriões em corte longitudinal de material fixado, em estágios mais avançados do desenvolvimento tardio.

Fig. 29 Embrião em estágio de torpedo.

Fig. 30 Embrião em estágio maduro.

Fig. 31 Detalhe do embrião da figura anterior com eixo embrionário com diferenciação de tecidos.

(cotilédones - c; cavidade de digestão - cd; coifa - cf; células iniciais - ci; embrião - e; endosperma - en; meristema fundamental - mf; protoderme - p; procâmbio - pc)

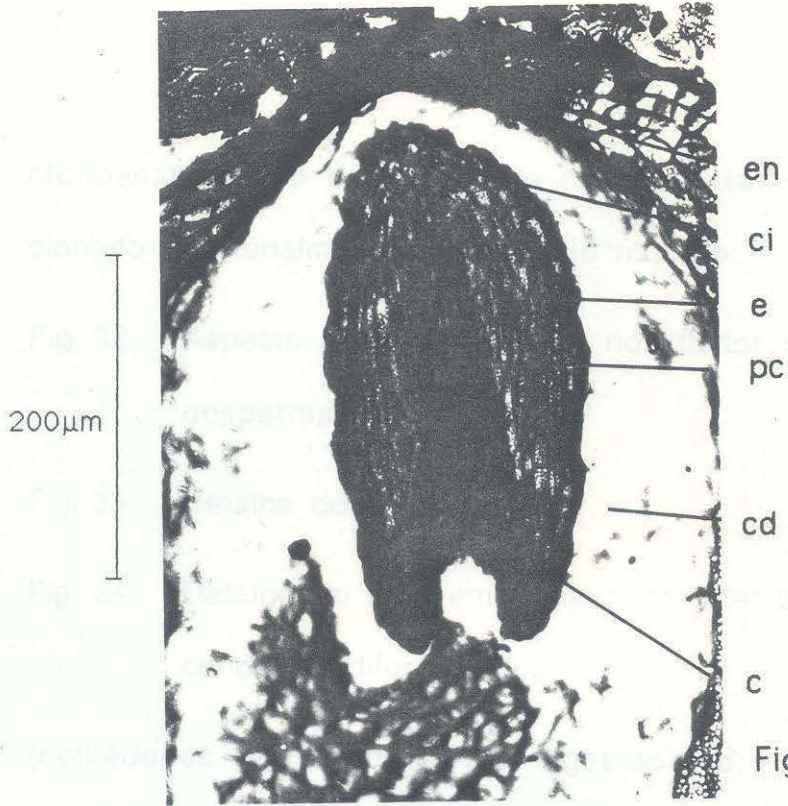


Figura 29

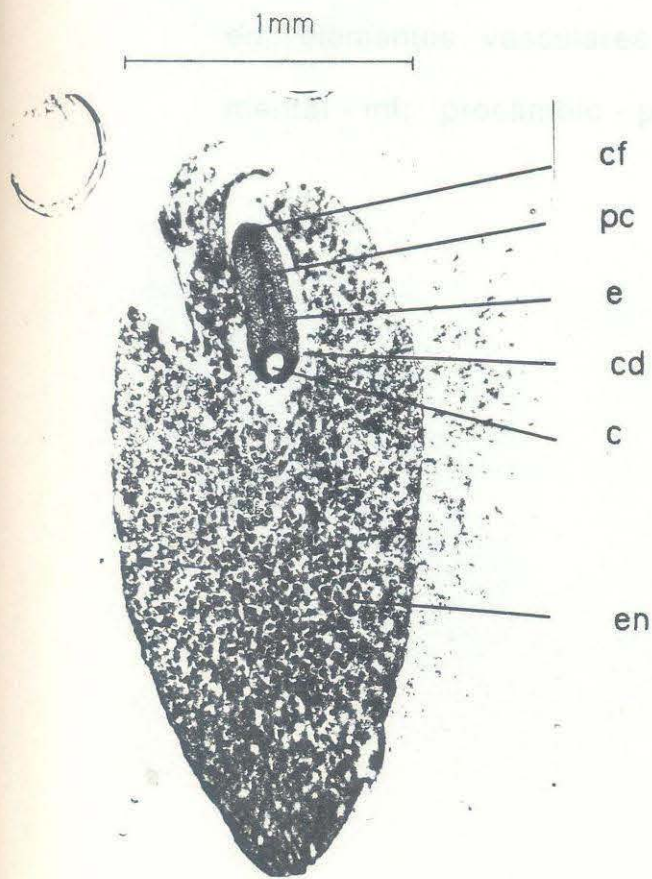


Figura 30

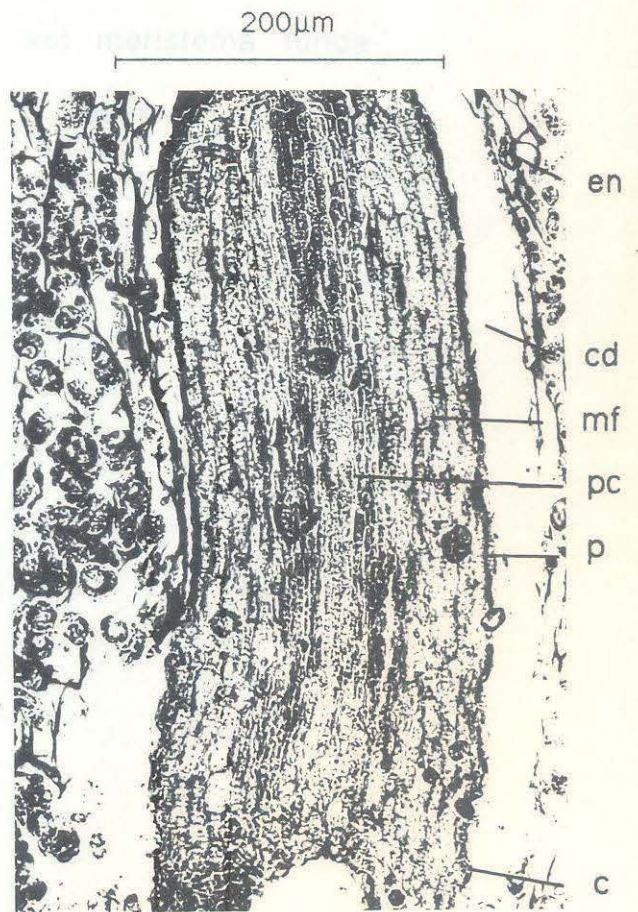


Figura 31

Morfoanatomia de embriões, de material fixado, seccionado longitudinalmente, em estágio maduro.

Fig. 32 Aspecto geral do embrião no interior do endosperma.

Fig. 33 Detalhe do ápice radicular.

Fig. 34 Detalhe do eixo embrionário com tecidos de condução diferenciados.

(cotilédones - c; cavidade de digestão - cd; células iniciais - ci; coifa - cf; embrião - e; endosperma - en; elementos vasculares - e vs; meristema fundamental - mf; procâmbio - pc; reservas - r).

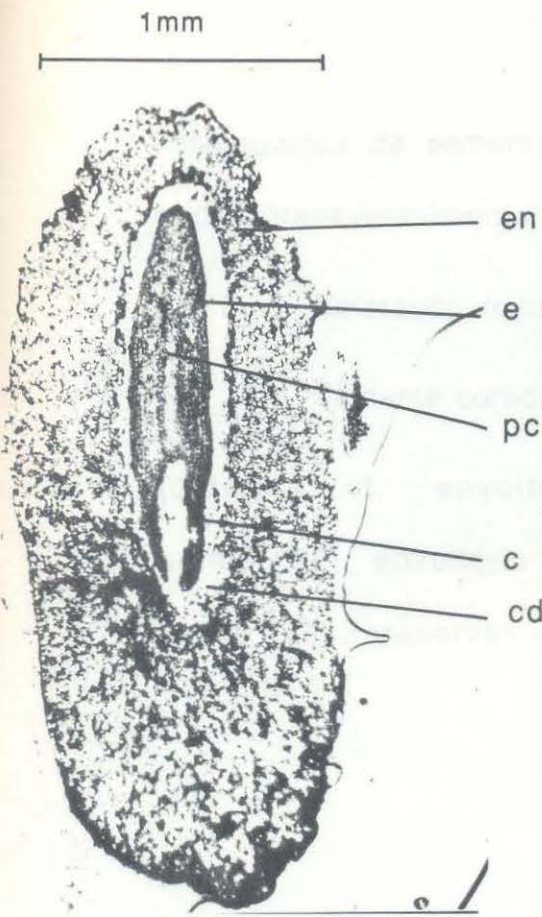


Figura 32

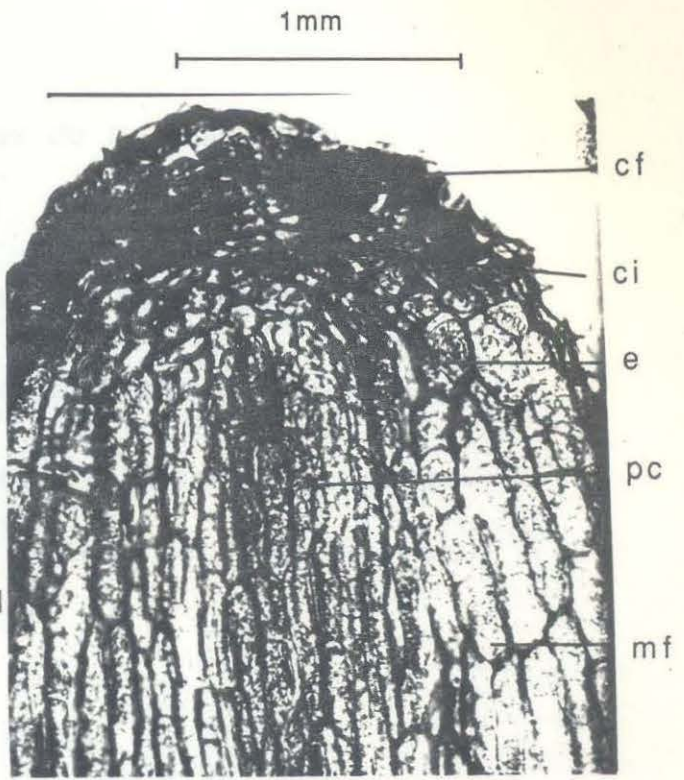


Figura 33

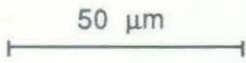


Figura 34

Histoquímica de sementes de material fresco, seccionadas transversalmente.

Fig. 35 Coloração natural da semente (controle).

Fig. 36 Semente corada com Sudan IV (Gerlach).

(cutícula - ct; envoltório interno - ei; endosperma - en; envoltório externo - ex; parede celular - p cel.; reservas - r).

Figura 36



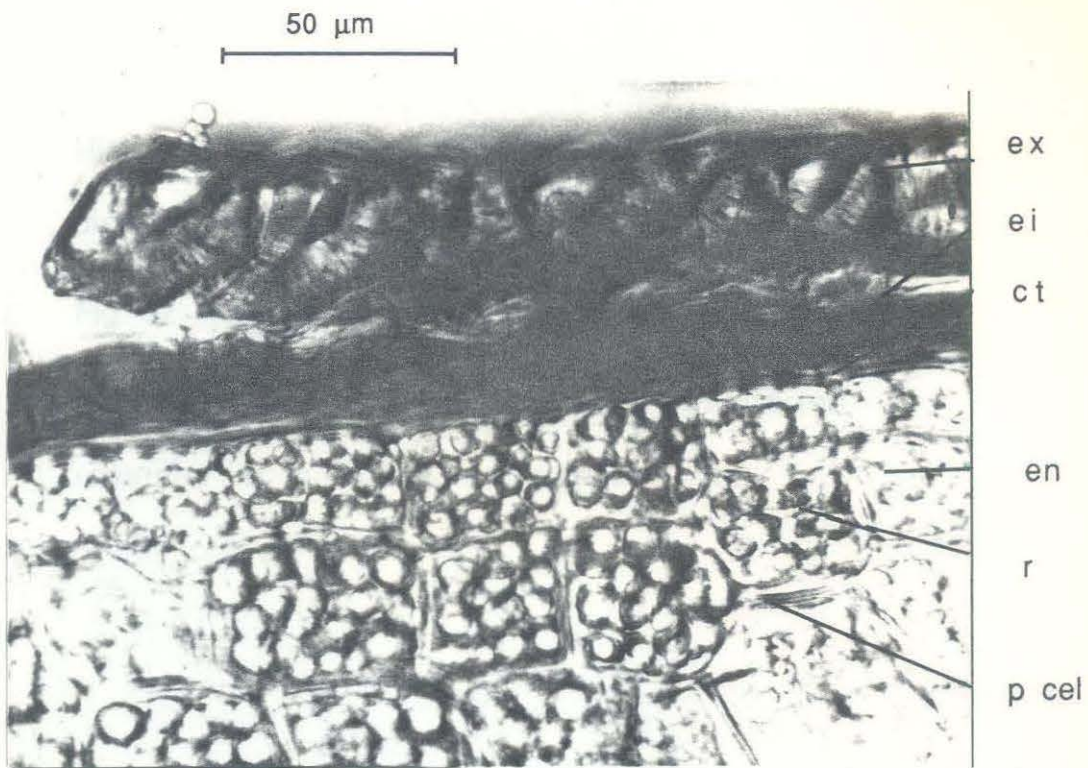


Figura 35

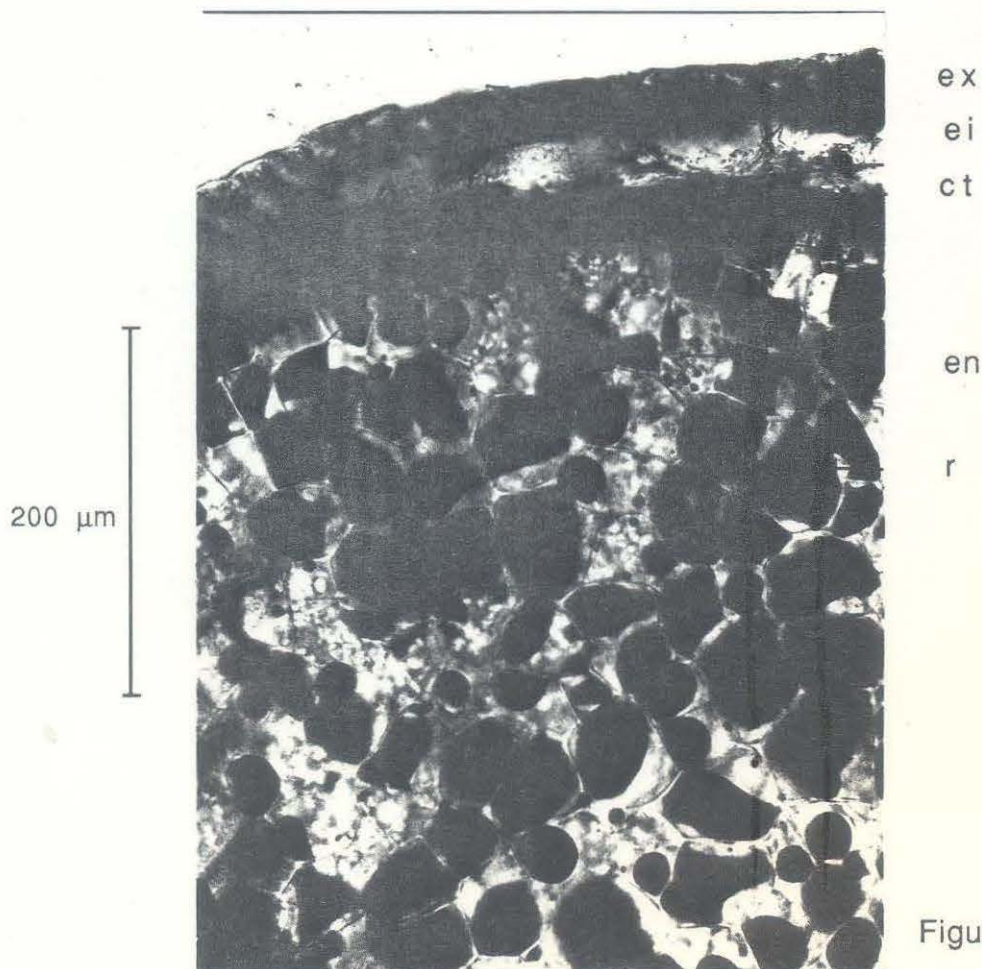


Figura 36

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

Histoquímica da semente e embrião em corte longitudinal de material fresco.

Fig. 37 Reação ao teste para proteínas totais.

(embrião - e; endosperma - en; envoltórios - ev; reservas - r; cavidade de digestão - cd).

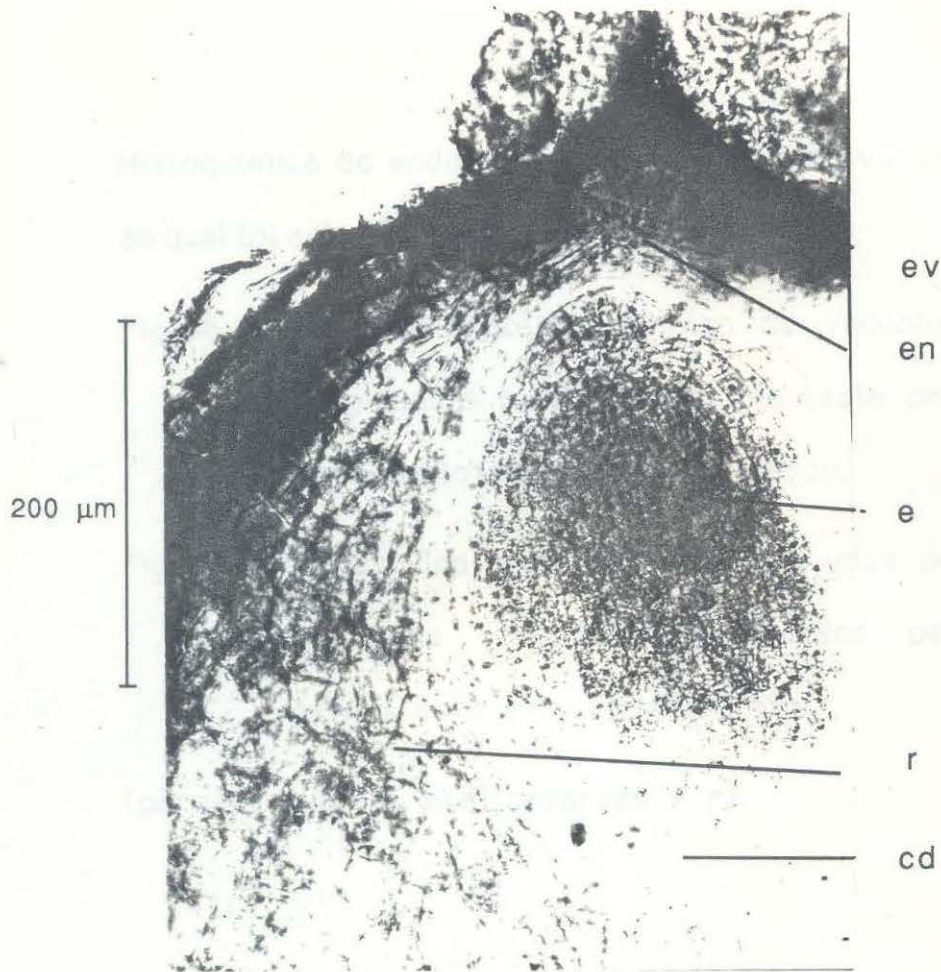


Figura 37

Histoquímica do endosperma, em corte transversal, ao qual foi aplicado teste para proteínas totais.

Fig. 38 Reservas protéicas, dentro de vacúolos, evidenciadas pela cor rosa, no teste para proteínas totais, de material fresco.

Fig. 39 Corpúsculos protéicos não envolvidos por membrana vacuolar, evidenciados pelo mesmo teste, em material fixado.

(paredecelular - pcel;reservas - r)

Figure 38



Figure 39

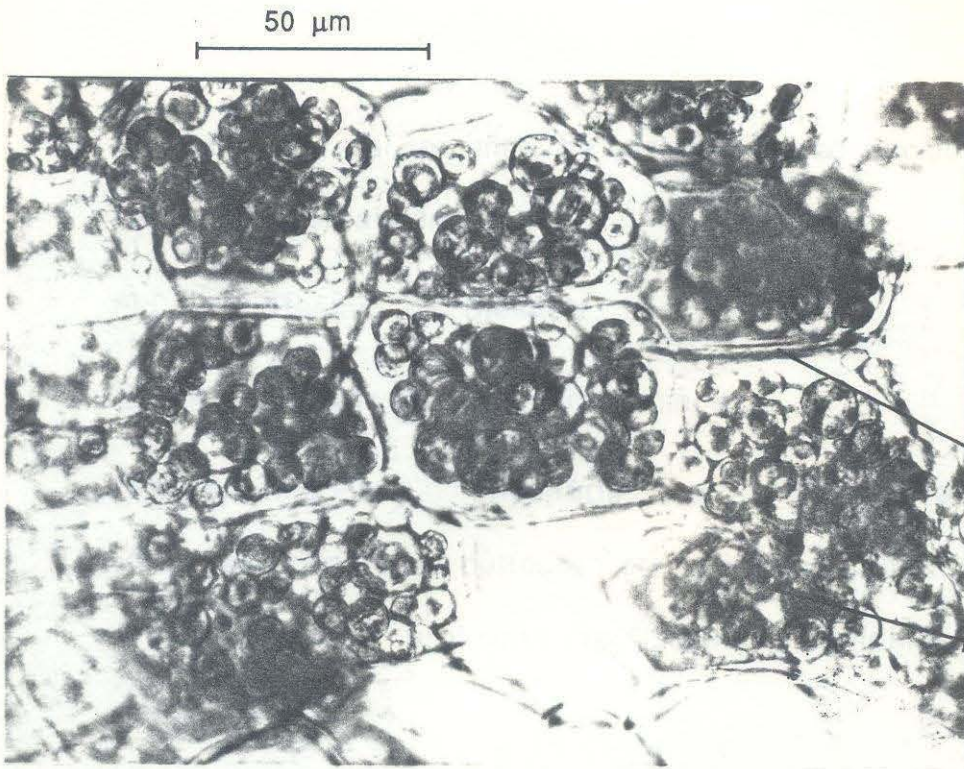


Figura 38

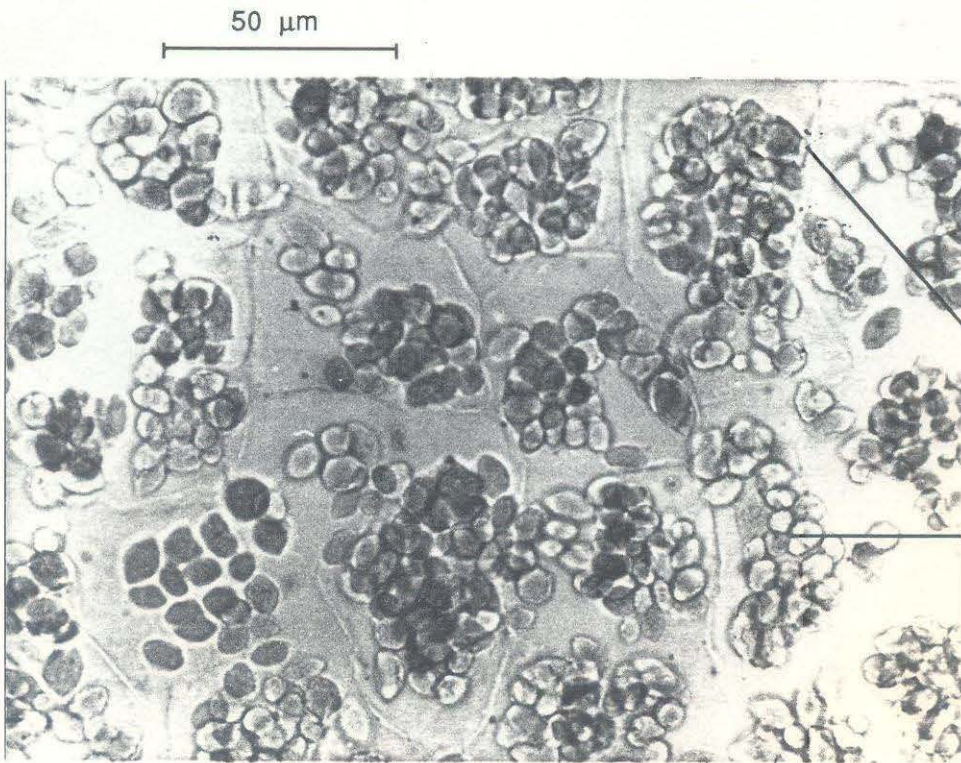


Figura 39

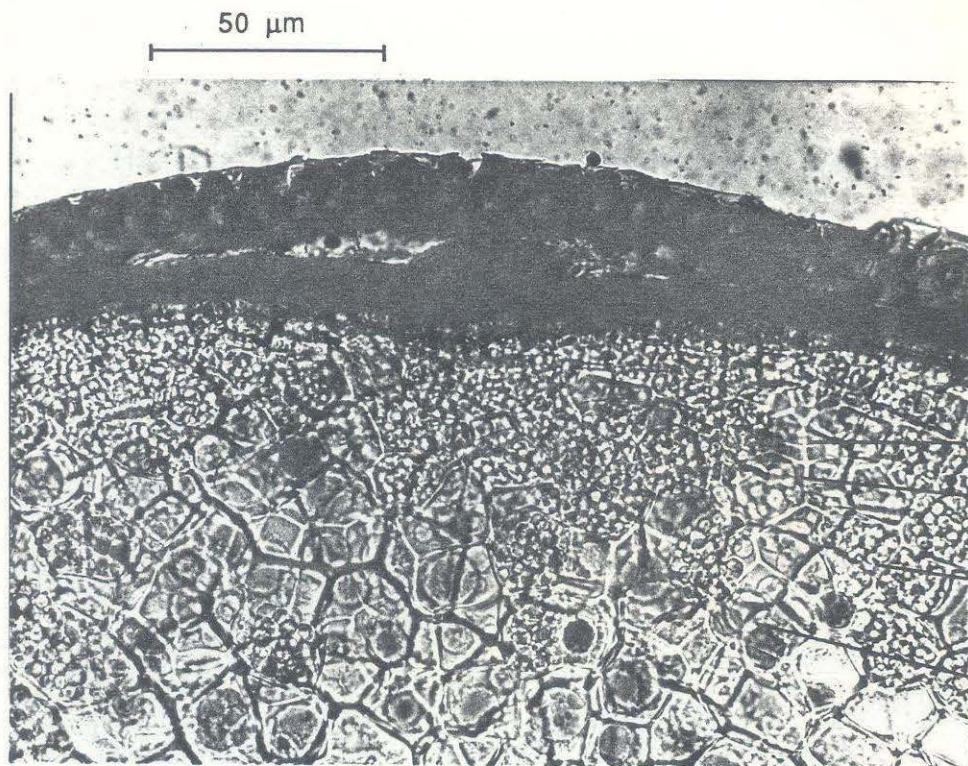
Histoquímica da semente, de material fresco seccionado transversalmente.

Fig. 40 Reativo de Steimetz.

Fig. 41 Reação ao teste para Taninos.

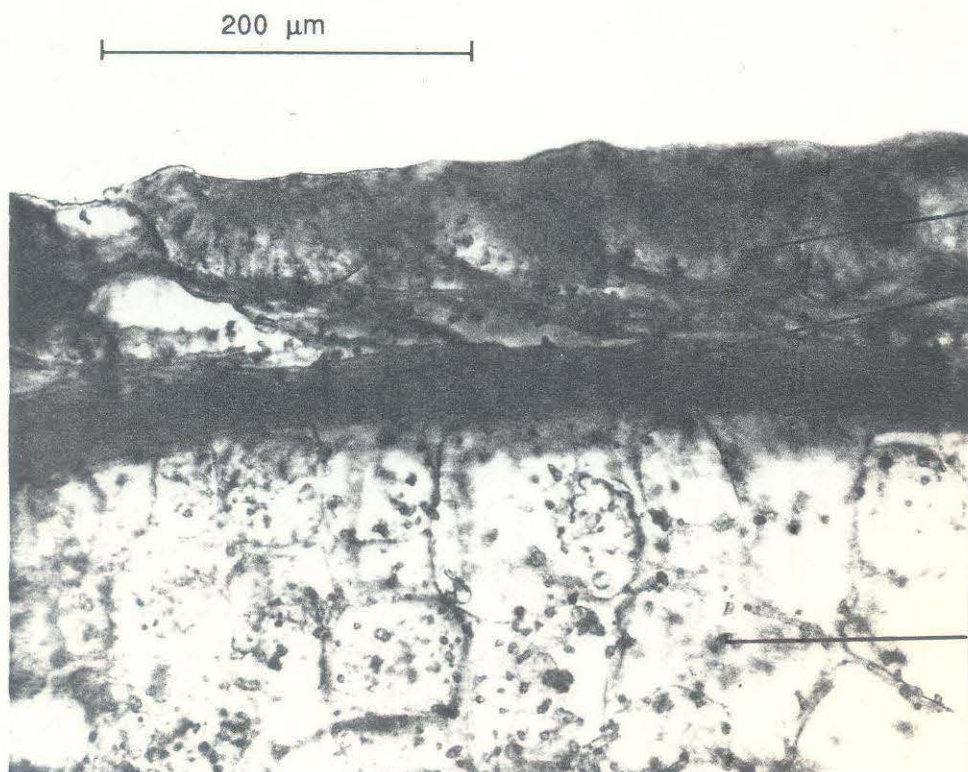
(endosperma - en; envoltório interno - ei; envoltório externo - ex; cutícula - ct; parede celular - p cel; reservas protéicas - rp; reservas lipídicas - rl).





ex
ei
ct
en
p cel
rp
rl

Figura 40



ex
ei
ct

en

Figura 41

Histoquímica do endosperma de material fixado em corte transversal.

Fig. 42 Reação PAS

(endosperma - en; parede celular - p cel; reservas - r; cavidade de digestão - cd).

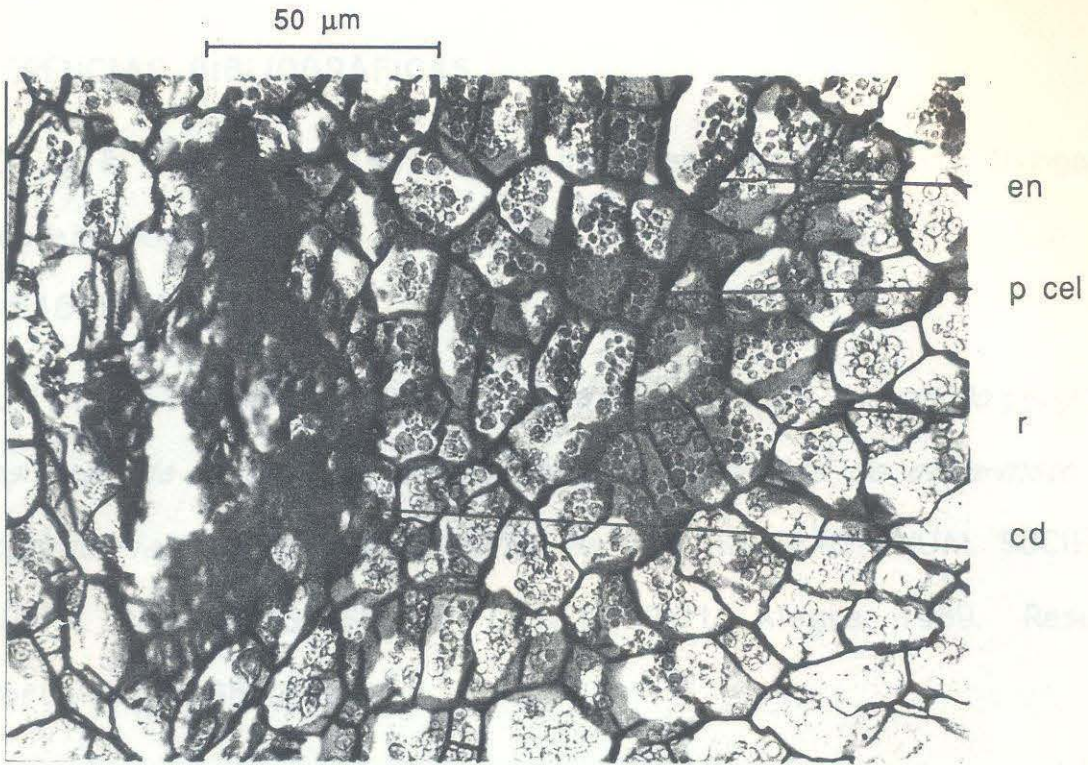


Figura 42

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, J. & GUERRA, H. 1985. Biochemical and morphological changes in protein bodies during germination of Lentil seeds. *J. of Exp. Bot.*, **36**(169):1296-303.
- AMARAL, M. B.; ASSMANN E.M.; COELHO, G.C.; WINGE, H., 1989. *Variação geográfica no grau de maturidade embrionária de sementes de erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil., Aquifoliaceae)*. REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASIL PARA PROGRESSO DA CIÊNCIA, Porto Alegre, 1989. Resumos. Porto Alegre, SBPC. v. 41,7.
- ASHTON, F.M. 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27**:95-117.
- BARRET, R. E. 1962. *Embriogeny of Ilex opaca Ait.* Ph. D. Dissertation, New Brunswick, Rutgers Univ.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1982. *Physiology and biochemistry of seeds*. Berlin, Springer Verlag. v. 2. 375 p.
- BISSING, D. R. 1974. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain technology* **49** (2):116-117.
- BUVAT, R. 1989. *Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants*. Berlin, Springer Verlag.
- CLARK, G. 1981. *Staining procedures*. Baltimore, Williams & Wilkins. 511 p.

- CUNHA, G.G. & HU, C.Y. & FERREIRA, A.G. 1988. A cultura de embriões de *Ilex paraguariensis* St. Hil. "in vitro" - Estádio de maturação do fruto-. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 29. Belém, 1984 *Resumos*. Belém, p. 328.
- DIAPP, C.J. 1984. Espermato-anatomia e período de crescimento do embrião de *Ilex paraguariensis* St.Hil. *Dusenía*, **14**(3):113-121
- EDWIN, G. & REITZ, P. 1967. Aquifoliaceas. *Flora Illustrada Catarinense*. Itajaí (Aqui): 1-47.
- EMBRAPA, 1985. SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10; Curitiba, 28-30 nov. 1983. *Anais...* Curitiba, CNPF, 145 p. (Embrapa-URPFCS. Documentos, 15).
- FENNER, M., 1985. *Seed ecology*. New York, Chapman and Hall. 151 p.
- FERREIRA, A.G. & HU, C.Y. 1984. Influência da luz na embriogênese tardia de *Ilex* - culturas "in-vitro". In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 34. Porto Alegre, 1984. *Anais...*; Comunicações. Porto Alegre, Sociedade Botânica do Brasil. p. 441-449.
- FONT-QUER, 1953. *Dicionário de botânica*. Barcelona, Ed. Labor. 1244p.
- GERLACH, D. V. 1977. *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 311 p.
- GIBERTI, G. C. 1979. Las espécies argentinas del género *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*) *Darwiniana*, **22**(1-3):219

- GILBERTSON, R.L. & RYVARDEN, L. 1986. *Northamerican Polypores*. Oslo. Abortiporus-Lindtneria, Fungiflora. 433 p. v.1
- HASLAM, E., 1966. *Chemistry of vegetable tannins*. New York, Academic Press.
- HU, C. Y. 1975. "in vitro" culture of rudimentary embryos of eleven *Ilex* species. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **100**: 221-25.
- HU, C.Y. 1978. Materials and methods in *Ilex* embryo culture. *Holly Letter of Holly Soc. Amer.*, **61**: 4-7
- HU, C.Y., ROGALSKI, F., WARD, C. 1979. Factors maintaining *Ilex* rudimentary embryos in the quiescent state and the ultrastructural changes during "in vitro" activation. *Bot. Gaz.*, **140**(3):272-79.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA 1969. *Normais climatológicas*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura - Escritório Meteorológico. v. 4.
- IVES, S.A. 1923. Maturation and germination of seeds of *Ilex opaca*. *Bot. Gaz.*, **76**:61-77.
- JENSEN, W.A. 1962. *Botanical histochemistry- principles and practice*. San Francisco. W.H. Freeman. 408 p.
- JOHANSEN, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw Hill. 523p.
- JOHRI, B.M. 1984. *Embryology of angiosperms*. Berlin, Springer Verlag. 830 p.
- KOZLOWSKI, T.T., 1972. *Seed biology*. New York, Academic Press. 447 p.
- KOZLOWSKI, T.T. & KRAMER, P.J. 1979. *Physiology of woody plants*. New York, Academic Press. 811 p.

- KUNIYOSHI, Y. S. 1983. *Morfologia de semente e de germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com Araucária*. Curitiba, Curso de Pós-Graduação em Eng. Florestal UFPr. Diss.
- LENDNER, A. 1818. Les semences de *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Apotheker-Zeitung*, **43**: 565-569.
- LESSING, P.C. 1985. Reflorestamento com erva-mate. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10. Curitiba, 28-30 nov. 1983. *Anais....* Curitiba, CNPF. p. 53-57 (Embrapa-URPFCS. Documentos, 15).
- LIMA, C. 1963. *Elementos de botânica, guia para tratados práticos*. Belo Horizonte UFMG – Fac. Farmácia. (polígrafo)
- LÖFGREN, A. 1917. *Famílias naturaes Phanerogamas*. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional. 611p.
- MARTIN, A.C. 1946. The comparative internal morphology of seeds. *Amer. Midland Natur.*, **36**:513-660.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1975. *The germination of seeds*. Oxford, Pergamon Press. 192 p.
- MELLO, V.D.C. 1980. *Morfologia e germinação da semente de erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.)*. Pelotas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias UFPel. Diss.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA 1976. *Regras para análise de sementes*. Portaria nº 532 de 29.07.76, D.O. 5 ago. 1976. Brasília, Ministério da Agricultura, DISEM-Divisão de Sementes e Mudas. 188p.

- MONNIER, M. 1984. Survival of young immature *Capsella* embryos cultured "in vitro". *J. Plant Physiol.*, **115**:05-113.
- NIKLAS, C.O. 1987. Estudio embriológicos e citológicos en la Yerba Mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *Bonplandia.*, **6**(1):45-56.
- POPINIGIS, F. 1977. *Fisiologia da semente*. Brasília, Ministério da Agricultura - AGIPLAN. 289 p.
- REISSEK, S. 1861. CELASTRINEAE, ILICINEAE ET RHAMNEAE In: *Martius Flora Brasiliensis.* **11**:37-123.
- ROBERTS, E.H. 1972. Dormancy: a factor affecting seed survival in the soil. In: Roberts, E.H. (ed.): *Viability of seeds*. Chapman & Hall, Cap. 12: p.321-359.
- SASS, J.E. 1940. *Elements of botanical microtechnique* New York, McGraw-Hill, 222p.
- SCHNEIDER, C. & PETRY, G. 1985. Aspectos da cultura da erva-mate na região de Erebango - município de Getúlio Vargas - R.S., em propriedades da Empresa Hoppen, Petry & Cia. Ltda. In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10. Curitiba, 28-30 nov. 1983. *Anais...* Curitiba, CNPF. p. 64-70 (Embrapa-URPFCS. Documentos, 15).
- SCHUCH, S.L.C. 1985. *Comportamento germinativo de sementes de erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.)* In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10. Curitiba, 28-30 nov. 1983. *Anais...* Curitiba, CNPF. p. 100-107 (Embrapa-URPFCS. Documentos, 15).
- SIQUEIRA, O.J.F. 1987. *Recomendações de adubação e calagem para o estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina*. Passo Fundo, EMBRAPA / CNPT. 100 p.

- STEEVES, T.A. & SUSSEX, I.M. 1989. *Patterns in plant development*. Cambridge, University Press. 388 p.
- STOKES, P. 1965. Temperature and seed dormancy In: RUHLAND, W. *Handbuch der Pflanzenphysiologie : Differenzierung und entwicklung*. Berlin, Springer Verlag, 1362 p.
- VAN PILSUM, J.F. 1959. *Determination of creatinine and related Guanidium compounds in methods of biochemical analysis*. New York, Interscience v.2
- YASUMA, A. & ICHIKAWA, T. 1953. Ninhidrin-Schiff and Alloxan-Schiff staining. *J. Lab. and Clin. Med.*, **41**:296-99.
- YEUNG, E.C. & SUSSEX, I.M. 1979. Embryogeny of *Phaseolus coccineus*: The suspensor and the growth of the embryo-proper "in vitro" *Z. Pflanzenphysiol.*, **91**:423-33.

ANEXO I

Resultados da análise de solos:

Textura	18% de argila
pH H ₂ O	6,7
pH SMP	6,8
P	300 ppm
K	800 ppm
MO	5,4%
Al	0,1 me/dl
Ca	16,8 me/dl
Mg	6 me/dl
S	125 ppm
Zn	6,9 ppm
Cu	0,4 ppm
B	0,8 ppm
Mn	2 ppm
Fe	0,14%

ADENDO

Em resposta às sugestões e críticas feitas pela banca examinadora que aprovou a dissertação de mestrado "*Ilex paraguariensis* St. Hil. Endosperma e Embrião Durante a Embriogênese Tardia", apresento o seguinte adendo. As correções propostas e aceitas constam nas retificações. As sugestões de cada membro serão respondidas separadamente.

ELIANE D. HEUSER

RETIFICAÇÕES

página IX: Abstract, linha 11, ao invés de collectet, leia-se collected

página 4: última linha, ao invés de /ex, leia-se //ex

página 8: linha 14, ao invés de cutícula, leia-se cutina

página 11: linha 6, ao invés de constiuindo, leia-se constituindo

página 16: linha 12, faltou o acento circunflexo na palavra ocorrência

página 18: linha 15, ao invés de 1983, leia-se 1985

página 21: linha 10, ao invés de sugere, leia-se sugerem

página 22: linha 14, ao invés de 1978, leia-se 1984

página 24: linha 11 separação incorreta sug- ere, ao invés de su-gere

página 30: (figura 2), na abscissa, onde está escrito 87/3 a 88/2, leia-se os meses, de 03 (março) a 02 (fevereiro).

página 66: linha 4, ao invés de 1818, leia-se 1918

página 67: eliminar as linhas 5 e 6

PARECER DO PROF. DR. ALFREDO GUI FERREIRA - ORIENTADOR

ELIANE D. HEUSER - compareceu a meu laboratório nos idos 1980, como possível candidata a um pós-graduação em Botânica, na UFRGS. Após algum tempo de convívio profissional ficou evidente que ela possuía algumas profundas lacunas na sua formação básica. Foi alertada para tal. Sugerido o tema de anatomia da semente imatura de *Ilex paraguariensis*, logo de início obteve alguns resultados entusiasmadores. De meados de 1981 a meados de 1982 ausentei-me em pós-doutoramento nos Estados Unidos e os colegas Paulo Oliveira e Jorge Mariath passaram a orientar Eliane. Já em 1983 era ela que acompanhava o marido que rumava para Alemanha. Foram mais de quatro anos em que os trabalhos foram suspensos. Acreditava eu então, que com todas dificuldades que Eliane tinha devido a sua pouca base, somadas a interrupção e deveres familiares, a fizessem desistir do pós-graduação. Imenso erro de avaliação. Pelo contrário, voltou com mais persistência e entusiasmo às tarefas. Superou inúmeras dificuldades com modéstia, perguntando "a Deus e ao mundo" até que suas dúvidas fossem esclarecidas. Foi de uma persistência que chegou as raias da teimosia, por vezes exasperando o orientador ou a si mesma. Lutou, lutou e com determinação dos que realmente querem vencer, chegou a este cumo de seu trabalho. Sempre caprichosa e detalhista não arrefeceu quando os problemas assomaram. Pelo contrário, os desafios deram forças para continuar. Todas estas conquistas foram em muito auxiliadas pelo colega Prof. Jorge E. Mariath, que a coorientou. Pacientemente sugeriu e discutiu muito os vários procedimentos anatômicos, histoquímicos e de redação da dissertação. Eliane, você chegou ao final desta etapa como vencedora. Parabéns!


Alfredo G. Ferreira

APRECIACÃO DA DISSERTAÇÃO DE

ELIANE DIEFENTHAELER HEUSER

Título: "Ilex paraguariensis St. Hil.: endosperma e embrião durante a embriogênese tardia".

Quero inicialmente cumprimentar a candidata pelo interessante trabalho, que certamente contribui para o conhecimento da biologia desta importante árvore que é a erva-mate. Meus cumprimentos são extensivos aos Professores Orientador e Co-orientador e ao Curso de Pós-graduação em Botânica da UFRGS pela elevada qualidade da dissertação.

Um exame cuidadoso sempre permite fazer algumas críticas relevantes, por melhor que seja o trabalho. Dessa forma, são apresentadas a seguir as observações ou críticas que considero mais importantes.

RESUMO:

No primeiro parágrafo, linhas 6 e 7: "A interrupção ... imaturidade do embrião". - Certamente é o oposto, pois a imaturidade do embrião é que se deve à interrupção da embriogênese; (idem: ABSTRACT).

1. INTRODUÇÃO:

Na página 1, no 5º parágrafo:..."e cultivadas há muitos anos"...
Na realidade, plantas desta espécie vêm sendo cultivadas desde o século XVII. Os jesuítas realizaram os primeiros cultivos em torno das Missões.

Na página 3, no 2º parágrafo: Há classificações mais interessantes de dormências; por exemplo, NIKOLAEVA (1977) divide as dormências, segundo os fatores que as causam, em endógenas e exógenas. Entre as dormências endógenas pode-se citar a imaturidade do embrião, a causada por inibidor(es) etc. e entre as exógenas, a causada pela resistência mecânica dos envoltórios, completa impermeabilidade dos envoltórios impedindo a absorção de água etc.

Na página 4, no 5º parágrafo: Amaral e cols. na realidade, levantaram duas hipóteses para explicar o gradiente na maturidade máxima dos embriões: 1) a principal causa seria ambiental ou 2) a principal causa seria a existência de diferenças genéticas en-

tre as populações. As duas alternativas estão sendo testadas. Cabe, no entanto lembrar que as amostras das quatro populações não diferiram quanto à moda do estágio embrionário, que foi de coração.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

- 2.2. Seleção do material botânico: (página 5, última linha do parágrafo): Temos observações sobre a germinação de sementes, semeadas após serem mantidas secas por cerca de seis meses, que germinaram em quantidade aparentemente normal para a árvore em questão, e no tempo esperado após a semeadura.
- 2.3. Montagem do experimento (página 5, linha 4): faltou um dado importante no caso da semeadura da erva-mate: a espessura da camada de terra acima das sementes.
- 2.5. Dados sobre as temperaturas (página 6, última linha do parágrafo): no material e métodos não é usado citar as figuras que aparecem nos resultados.
- 2.6. Retirada das amostras (página 7, primeiro parágrafo, linhas 4 e 7): ídem observação feita para 2.5, acima.

3. RESULTADOS

- 3.2. Dados meteorológicos (página 10, linha 2 e 3 do parágrafo) e Figura 2 (página 30): A figura não está clara. No texto e legenda é informado que a figura mostra as normais (máxima, média e mínima) da temperatura do ar no período de 1931 a 1960 (30 anos) e na abscissa estão assinalados 12 meses, de 1987 a 1988.
- (Na página 32, Figura 4 - legenda linha 3): a precipitação não é do experimento, mas "no período do experimento". Não é necessário informar que as normais são mensais e não anuais?
- 3.3. Medidas dos embriões (página 10, linha 5 e 6): ... "12 meses após o plantio"; sugiro usar o termo semeadura.
- (Na página 11, linha 2): ... "embriões com mais de 1,00mm (figura 6)". Porque na figura 5 (página 33) não houve a inclusão de nenhum embrião de cerca de 1,00mm ou mais de comprimento? De acordo com a figura 6 (página 34), no período de 87/12 a 88/01, houve 15% ou mais de embriões com cerca de 1,05mm.
- 3.4. Descrição da semente (página 11, último parágrafo, linha 4 e 5): muitos dos autores, inclusive o Dr. Hu, reconhece mais

um estágio, entre globular e coração: o estágio de pré-coração ou coração precoce ("early heart"). Pós-coração é, em geral, denominado de coração tardio ("late heart").

4. DISCUSSÃO

Na página 18, 3º parágrafo: em que dados foi baseada a conclusão de que "as temperaturas de primavera e verão foram favoráveis" à germinação? Como ter certeza de que, após o período necessário para completar a embriogênese, independentemente da época do ano, as sementes germinam?

Nas páginas 20 e 21: "Estes dados, bem como os do presente trabalho, sugerem que os embriões de Ilex paraguariensis entram em dormência neste estágio" (de coração). O texto sugere que, durante o desenvolvimento embrionário, ao atingirem o estágio de coração, os embriões cessam seu crescimento, entrando em dormência. O fato de termos encontrado até embriões maduros, embora em baixa frequência, em frutos tanto maduros como brancos coletados no Paraná, não apoia essa hipótese da dormência depender do estágio atingido pelo embrião. É nossa opinião de que a instalação da dormência está vinculada à maturação do fruto.

Na página 21, 3º parágrafo: Dr. Hu observou embriões além do estágio de coração em outras espécies de Ilex, embora a moda seja sempre o estágio de coração.

Na página 21, final do 4º parágrafo: Em frutos brancos, vermelhos ou pretos sempre encontramos embriões em diferentes estágios de desenvolvimento, com uma distribuição aparentemente normal dos estágios, sendo a moda praticamente sempre o de coração. Assim, mesmo se houvesse perfeita sincronia no desenvolvimento, após a quebra da dormência, ainda haveria variação nos estágios dos embriões. Parece-me, portanto, que os dados obtidos não são suficientes para uma conclusão segura sobre a existências ou não de sincronia.

Na página 22, 2º parágrafo, linhas 1 e 2: embora agradeça a referência da citação, o fato de haver publicações sobre o assunto (Schuch, 1983; Prat Kricun, 1985), exige que estes trabalhos sejam citados prioritariamente.

Nas páginas: 26 (último parágrafo, linha 4) e 28 (parágrafo 4, linha 2 e parágrafo 5, linha 4): sugiro substituir o termo "autotrófico" por autônomo que é o termo adequado para indicar a independência de um órgão/tecido na produção de algum hormônio ou outra molécula.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Porque, em lugar dessa denominação do capítulo, não utilizaste a de CONCLUSÕES?

FIGURAS:

Na figura 3, página 31: Sugestão: interromper os gráficos no ponto onde houve mudança no método de fazer as medidas da temperatura : de 10 cm para 5 cm de profundidade.

Helga Winge
Profa. Dra. Helga Winge
Dep. Genética-UFRGS

RESPOSTAS ÀS APRECIACÕES DOS MEMBROS DA BANCA

Profa. Dra. Helga Winge

RESUMO:

A sugestão é válida pois, realmente, a interrupção da embriogênese se deve a fatores ainda não bem esclarecidos, como cita o trabalho, e a imaturidade do embrião não seria uma causa, mas sim a existência de outros fatores assim como presença ou ausência do suspensor em determinados estágios da embriogênese ou inibidores no endosperma.

INTRODUÇÃO:

página 1, em futuras apresentações será completada esta informação, com respectiva citação (Frankel, 1983), dentre outros.

página 3, após ampla revisão bibliográfica, incluindo a referida autora, este foi o conceito que melhor se ajustou ao trabalho, pois uma descrição mais detalhada sobre os tipos de dormência e classificações segundo diversos autores, tornaria esta parte muito extensa.

página 4, a partir das observações feitas, notou-se a necessidade de acrescentar o termo maturidade "máxima" dos embriões. A hipótese da existência de fatores genéticos que estariam influenciando no gradiente de maturidade máxima dos embriões, está sendo e será citada em trabalhos sobre o assunto.

MATERIAL E MÉTODOS:

página 5, item 2.2. -esta afirmação foi feita com base em sugestões feitas pelo Prof. Hu, em 1987, e de experimentos realizados no Laboratório de

Fisiologia Vegetal, com sementes coletadas há mais de 6 meses, estocadas a seco, cujos embriões, em cultura "in vitro", não desenvolveram. Ítem 2.3. -o conceito de sementeira e estratificação já havia sido discutido, mas colocando as medidas dos sacos de tela plástica onde se encontravam os pirenos e da sementeira, este seria um dado desnecessário.

página 6, ítem 2.5 e 2.6. as sugestões são válidas.

RESULTADOS:

página 30, ítem 3.2. Correção consta nas retificações.

página 32, a informação sobre normais de 30 anos está na mesma legenda, linha 1.

página 34, (figura 6) nesta figura há uma interrupção na abscissa, em medidas de embriões maiores que 1mm, pois o objetivo do trabalho não foi a análise após a germinação; embriões maiores que esta medida são considerados germinados

página 11, ítem 3.4. essa classificação em estágios também é adotada por Niklas (1987) e por Ferreira e Hu (1984), sendo a que melhor se adaptou ao trabalho, considerando os aspectos morfoanatômicos do desenvolvimento. Não houve necessidade de classificação em estágios intermediários.

DISCUSSÃO:

página 18, a partir do gráfico da figura 5, comprimento dos embriões durante o experimento, pode-se observar que há um maior desenvolvimento, a partir do mes de outubro, ou seja, final da primavera. Isto sugere que o aumento de temperatura é favorável ao desenvolvimento, e que baixas temperaturas

tenham atuado na quebra de dormência. Quanto ao segundo item, neste parágrafo foi citado somente o desenvolvimento dos embriões e não germinação. Não foram realizados estudos sobre germinabilidade, apenas a literatura cita que no gênero *Ilex*, os embriões germinam ao longo de vários anos (Hu, comunicação pessoal).

páginas 20 e 21, baseados na análise dos dados obtidos durante o experimento e no que cita a literatura consultada, confirmo o escrito no trabalho, observando que o caso de embriões maduros de frutos brancos é uma exceção, pois a frequência é muito baixa, e a moda nesses casos recai sempre no estágio de coração.

página 21, 4º parágrafo, o fato de, em outras espécies de *Ilex* ocorrer germinação ao longo de vários anos, em pirenos coletados e semeados em uma mesma época, confirma que o desenvolvimento é desuniforme, não havendo sincronia. Schuch (1985), já citado no trabalho, se refere a germinação desta espécie como sendo de forma não uniforme e lenta.

página 22, a observação foi aceita

página 26, serão adotados os termos autônomo ou autosuficiente ao invés de autotrófico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Linhas mais recentes sobre redação de trabalhos científicos, sugerem não colocar mais o termo "conclusão", pois um trabalho científico é sempre aberto, não encerra quando finalizado, e este termo, no caso, não seria o apropriado, pois em se tratando de pesquisa em *Ilex paraguariensis*, os resultados sobre as causas da demora da germinação, ou seja lento

desenvolvimento do embrião e baixa taxa de germinabilidade, não são conclusivos

FIGURAS:

página 31, figura 3, a legenda parece-nos o suficiente esclarecedora

Universidade Federal do Rio de Janeiro
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
Departamento de Botânica
BIBLIOTECA



FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA DO RIO GRANDE DO SUL

Entidade constituída pelo Poder Público - Lei n.º 6.497, de 20-12-72 - CGC: 87.912.929/0001-75

Supervisionada pela Secretaria da Agricultura e Abastecimento

PORTO ALEGRE - RS

PARECER TÉCNICO

DISSERTAÇÃO: *Ilex paraguariensis* St. Hil.: Endosperma e Embrião durante a embriogênese tardia.

AUTORA: Eliane Diefenthaeler Heuser

O tema é importante e atual.

O questionamento foi proposto criteriosamente e solucionado objetiva e didaticamente.

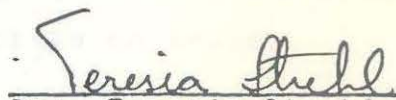
A metodologia e técnicas usadas na elucidação do problema foram adequadas e muito bem conduzidas.

A candidata mostrou ter espírito científico e clareza nos objetivos, no entanto, creio que poderia ser mais positiva na interpretação e afirmação dos resultados.

Algumas observações sobre erros datilográficos e/ou lapsos em citações, estão anotados em folha anexa.

Como sugestão proponho que em fotos usadas para estudos comparativos, as escalas sejam de igual grandeza, para uma melhor visualização das estruturas a serem comparadas.

Porto Alegre, 30 de abril de 1990.


Dra. Teresia Strehl



FUNDAÇÃO ZOOBOTÂNICA DO RIO GRANDE DO SUL

Entidade constituída pelo Poder Público - Lei n.º 6.497, de 20-12-72 - CGC: 87.912.929/0001-75
Supervisionada pela Secretaria da Agricultura e Abastecimento
PORTO ALEGRE - RS

Anexo 1.

Correções a serem feitas:

- página 4 : lex - Ilex
e dos baixos índices
- " 5 : tipo de solo
- " 6 : dados de temperatura do solo e
- " 7 : esteroscópico
- " 11 : constituindo
- " 12 : a maioriaapresentavam
- " 24 : sugere
- " 28 : uma soma ... podem

Fotos:

Fazer as comparações sempre nos mesmos aumentos:

ex.: Figs.: 11 e 12
35 e 36
40 e 41

Bibliografia:

- na página 2 : Lendner, 1818 na citação : 1918?
- " " 22 : Monnier, 1978 na citação : 1984?
- Na citação: Popinigis, 1977, não aparece no texto.

Stuehl

Profa. Dra. Teresia Strehl

As sugestões e correções propostas por este membro, foram aceitas e, quando necessário, constam na retificação



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

PARECER SOBRE A DISSERTAÇÃO DE MESTRADO "Ilex paraguariensis
St.Hil.:Endosperma e Embrião Durante a Embriogênese Tardia"
de autoria de ELIANE DIEFENTHAELER HEUSER

Sintetizando a avaliação feita sobre o trabalho, po-
de-se salientar os pontos que seguem:

- 1.Tornar os objetivos do trabalho mais claros,no que se refe-
re à discriminação dos parâmetros utilizados para acompanhar
a "demora de germinação" que substituo por "desenvolvimento
lento do embrião".
- 2.Rever os conceitos de:estratificação e autotrofia.
- 3.Verificar os tipos de dormencia existentes e rever a carac-
terização de cada um deles.
- 4.Verificar,para a espécie em questão,Ilex paraguariensis,
quantos e quais os tipos de dormencia que podem estar agindo.
- 5.A autora,apesar de ter apresentado os dados pluviométricos
para o período de cultivo,e de ter regado a sementeira duran-
te os períodos mais secos que ocorreram durante o desenvolvi-
mento do experimento,deixou de considerar o fator umidade co-
mo essencial,não só na quebra da dormencia por estratificação,
como não se refere a esse fator na Discussão e Considerações
Finais.
- 6.Deveria ter sido feita uma análise detalhada das reservas
do embrião e a variação destas,comparando os embriões em des-
envolvimento que apresentavam suspensor com aqueles que não
o apresentavam.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

...2 cont.

7.Excesso de "comentários pessoais".

8.No Resumo:faltou colocar os dados sobre a degeneração do sus-
pensor e sobre a influencia da temperatura e umidade sobre o '
desenvolvimento do embrião na embriogênese tardia.

9.Nas Considerações Finais,faltou demonstrar ou citar as cau-
sas encontradas para a "demora de germinação",de forma que um '
dos objetivos propostos não foi preenchido.A caracterização cõ-
mo embrião rudimentar já tinha sido citada na literatura pelo '
trabalho de Ferreira e Hu,1984,como foi mostrado na página 2, '
quarto parágrafo.

Porto Alegre,16 de maio de 1990.

Assinatura manuscrita em tinta preta, com uma linha horizontal decorativa no final.

Profa.Regina Ramos Termignoni

Profa. Dra. Regina R. Termignoni

1. As sugestões foram aceitas e em futuras apresentações, estes itens serão tornados mais claros

2. Após rever os conceitos de estratificação em vários autores, verificou-se que o termo foi empregado corretamente, sendo que quando colocamos sementes a menos de 15 cm de profundidade no solo, trata-se de plantio. Como o termo mesmo diz, estratificação vem do termo estratos=camadas, termo antigamente empregado para sementes que sofriam pré-tratamento a baixas temperaturas, o mesmo ocorrendo com o termo autotrofia - ver no item DISCUSSÃO, página 26, em resposta à profa. Helga Winge.

3. A resposta a este item está dada no item INTRODUÇÃO, página 3, à profa. Helga Winge

4. Os prováveis tipos de dormência que atuam nas sementes de *Ilex paraguariensis* foram pesquisados por diversos autores, sendo que os mais relevantes estão citados no trabalho, como Hu (1978) e Mello (1980). Hu (1979), usando a cultura "in vitro" de embriões deste gênero, aventou a hipótese de que a limitação no desenvolvimento dever-se-ia à presença de inibidores no endosperma, a qual ainda não foi comprovada por caracterização das substâncias.

5. Não foi dada maior ênfase a influência destes fatores, pois, como já foi citado, não foi este o objetivo do trabalho. Mas como estes dados não poderiam ser omitidos pois fazem parte do experimento, foram analisados de maneira menos aprofundada.

6. A sugestão é válida para futuros estudos sobre a embriologia desta espécie.

7. Houve casos em que não foi possível evitar este tipo de redação, pois existem dados muito importantes a respeito desta espécie que ainda não foram publicados.

8. No resumo, realmente seria providencial citar dados sobre degeneração do suspensor. Os dados climáticos ficam implícitos quando foi referido que o experimento foi montado em condições de campo.

9. Sugerindo que, com a presença do suspensor ocorra uma dormência menos pronunciada, a ausência desta explicaria a demora da germinação.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

PARECER sobre a dissertação "Ilex paraguariensis ST. HIL.,
endosperma e embrião durante a embriogênese tardia", de
Eliane D. Heuser, do CPG em Botânica da UFRGS

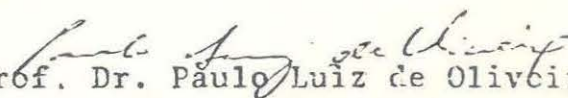
O trabalho traz valiosas contribuições ao conhecimento científico da espécie. No entanto, algumas críticas devem ser destacadas, que poderão ser usadas como referencial para futuras publicações extraídas do mesmo:

- não está definido o número de lotes de pirenos;
- o local do experimento, a campo, não foi divulgado;
- cutina ao invés de cutícula (pág. 8);
- a conclusão a respeito da influência da precipitação sobre o desenvolvimento dos embriões (pág. 10) não é possível tirar, a partir dos dados do diagrama (Fig. 4);
- as observações colocadas abaixo da Fig. 4 devem fazer parte dos resultados.

Por ocasião da defesa foram observadas também algumas incorreções de redação, que, no entanto, não tiram o mérito do trabalho. Quanto à apresentação, deve ser ressaltada a excelente qualidade gráfica do trabalho.

Finalmente, gostaria de registrar minhas congratulações à autora, aos seus orientadores e, por extensão, ao CPG em Botânica da UFRGS.

Porto Alegre, 18 de maio de 1990.


Prof. Dr. Paulo Luiz de Oliveira
Departamento de Botânica - UFRGS

Prof. Dr. Paulo Luíz de Oliveira

A correção do termo cutina ao invés de cutícula, consta nas retificações.

Os dados do diagrama da figura 4, foram analisados por professores da área, que concordaram com as conclusões a respeito da influência da precipitação sobre o desenvolvimento dos embriões. As sugestões sobre a legenda da referida figura foram aceitas.