

**ILEX PARAGUARIENSIS (AQUIFOLIACEAE)  
ENDOSPERMA E EMBRIÃO DURANTE A EMBRIOGÊNESE TARDIA\***

Por E. D. HEUSER<sup>1</sup>, A. G. FERREIRA<sup>2</sup>, J. E. DE A. MARIATH<sup>2</sup>

**Summary** *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) *Endosperm and embryo during late embryogenesis.* The seeds of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (*erva-mate*) have rudimentary embryos when the fruits are ripe. Those seeds take a long time to germinate—6 to 8 months—and a high percentage of them fail to germinate. The reasons for this late embryonic development failure are not quite clear. In order to elucidate this problem, morphoanatomical studies of seeds at different stages of embryonic development were carried out from pyrenes cultivated under field conditions during twelve months. Structural changes could be observed such as the formation of cotyledons, the gradual growth of the embryo axis and tissue differentiation. The suspensor in the embryo was observed from early to late embryogenesis. Histochemical tests disclosed the lipoproteic nature of the cytoplasmic reserves. In advanced stages of embryogeny, these reserves are modified near the embryo, indicating that they are being consumed.

#### INTRODUÇÃO

*Ilex paraguariensis* St. Hil, nome popular erva-mate, pertence a família Aquifoliaceae. Esta família está representada, no Brasil, por cerca de 70 espécies (Löfgren, 1917), 5 delas no estado do Rio Grande do Sul (Mattos, 1965).

É uma espécie dióica, arbórea, que atinge mais de 12 metros de altura, quando adulta. É de suas folhas que se obtém a erva-mate, insumo básico para o preparo do chimarrão, bebida de largo consumo nos estados sulinos do Brasil e em outros países da América do Sul. Os frutos são classificados de diversas maneiras segundo vários autores. A classificação mais apropriada seria de fruto nuculânio (Giberti, 1979), termo empregado para drupa policárpica, com epicarpo e mesocarpo carnosos ou coriáceos e com endocarpo endurecido e geralmente lenhoso. Externamente apresenta-se globoso, superfície lisa e coloração que varia entre o branco, várias tonalidades de rosa, vermelho arroxoado até quase negro, quando atinge a maturidade plena. A frutificação é anual e ocorre entre os meses de janeiro e março. No interior dos frutos de *Ilex paraguariensis* encontramos em regra quatro pirenos, que são as unidades de dispersão

dessa planta, popularmente denominados de sementes. O pireno contém a semente, formada por endosperma, embrião e envoltórios.

A espécie apresenta embriões rudimentares, a maioria em estágio de coração, quando o fruto encontra-se maduro (Ferreira & Hu, 1984 e 1989). Esse tipo de embrião é comum no gênero *Ilex* (Martin, 1946), o que leva a uma dormência das sementes, necessitando essas ainda de um longo período para completar sua fase de embriogênese tardia (Hu & Ferreira, 1989).

Os pirenos de *Ilex paraguariensis*, se colocados em condições consideradas favoráveis para germinação da maioria das espécies, necessitam ainda de 6 a 8 meses para completar a embriogênese e germinar (Lendner, 1918; Schuch, 1985). Seu poder germinativo é baixo, ocorrendo germinação de forma não-uniforme e lenta (Schuch, 1985). Este trabalho objetiva verificar o desenvolvimento embrionário tardio e a estrutura do endosperma através de estudos morfoanatômicos, contribuindo para a elucidação da dormência.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Frutos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. foram coletados de diversas árvores em fevereiro de 1987 em Venâncio Aires, no Rio Grande do Sul, colocados em sacos plásticos e estocados, por um mês, na geladeira, à temperatura de cerca de 4°C. Foi tomada uma amostra de um ramo com frutos, herborizada e depositada no Herbário ICN do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências UFRGS (ICN 95095).

\* Parte da dissertação de mestrado desenvolvida junto ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas—Botânica, Departamento de Botânica UFRGS, Av. Paulo Gama 40, 90046-900 Porto Alegre RS, Brasil, pelo primeiro autor

<sup>1</sup> Mestre em Ciências Biológicas, Botânica UFRGS

<sup>2</sup> Prof. Titular Dep. Botânica UFRGS

Desses frutos foram selecionados os brancos, pois, em cultura "in vitro", os embriões de frutos nesse estágio de coloração são os que melhor germinam (Cunha, 1990). Esses foram macerados sob água corrente para retirada da polpa e obtenção dos pirenos.

Quinze lotes de 50 pirenos foram colocados em sacos de tela plástica e misturados com solo rico em matéria orgânica (comercialmente-terra vegetal). Esses sacos foram colocados em sementeira, contendo o mesmo tipo de solo, ao ar livre, em lugar sombrio.

As temperaturas do ar e do solo ocorridas durante o experimento, foram obtidas através de dados coletados pelo 8º Distrito de Meteorologia de Porto Alegre, a 3 km do experimento.

Em intervalos regulares de, aproximadamente, 20 dias, durante 12 meses, um lote de 50 pirenos foi retirado do solo. Destes, 20 foram usados para verificação anatômica e 30 tiveram seus embriões excisados e medidos segundo o maior eixo (hipocótilo-radícula), em microscópio óptico (marca Zeiss-Jena, modelo Laboval), equipado com ocular de retículo com fio móvel. O grau de diferenciação das estruturas morfoanatômicas correlacionado com o comprimento dos embriões, permitiu estabelecer estágios de desenvolvimento. A partir dos resultados das medições, foi feita uma regressão polinomial quadrática, usando o programa "StatView 512", para computadores tipo Macintosh, para a obtenção da curva de crescimento dos embriões. Os 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 o mesmo tipo de computadores.

Para o estudo morfoanatômico, as sementes foram retiradas dos pirenos com auxílio de lâminas cortantes resistentes, manipuladas sob microscópio estereoscópico. As sementes foram fixadas em FAA 50% por dois dias e a seguir transferidas para etanol 50% como conservante. Essas foram desidratadas

com processador automático de tecidos (Histotécnico Oma) através da série etífica, e incluídas em parafina, segundo os métodos tradicionais (Sass, 1940; Johansen, 1940). Após o emblocamento, o material foi seccionado longitudinalmente em micrótomo rotativo, em cortes de 8 micrômetros de espessura, corado com Safranina e "Fast Green" ou Azul de Toluidina e montadas lâminas permanentes.

As reservas do endosperma, foram caracterizadas histoquimicamente, sendo utilizada a reação de Ninhidrina-Shiff (Yasuma & Ichikawa, 1953), modificada por Jensen (1962) e a reação de Sakaguchi (Van Pilsum, 1959) que identificam as proteínas. Para lipídios foram feitos testes de Sudan IV (Gerlach, 1977) e Sudan IV, segundo Rawlins (apud Clark, 1981). A reação de PAS (Gerlach, 1977), foi realizada para testar a presença de polissacarídeos totais. Para testar a presença de taninos, usou-se Sulfato Ferroso (Reeve, apud Jensen, 1962) e Cloreto Férrico (Haslam, 1966), assim como reagente de Melzer (Gilbertson & Ryvarden, 1986), para amido. O Reativo de Steimetz modificado (Lima, 1963), foi utilizado para testar constiuintes de paredes e secreções em geral.

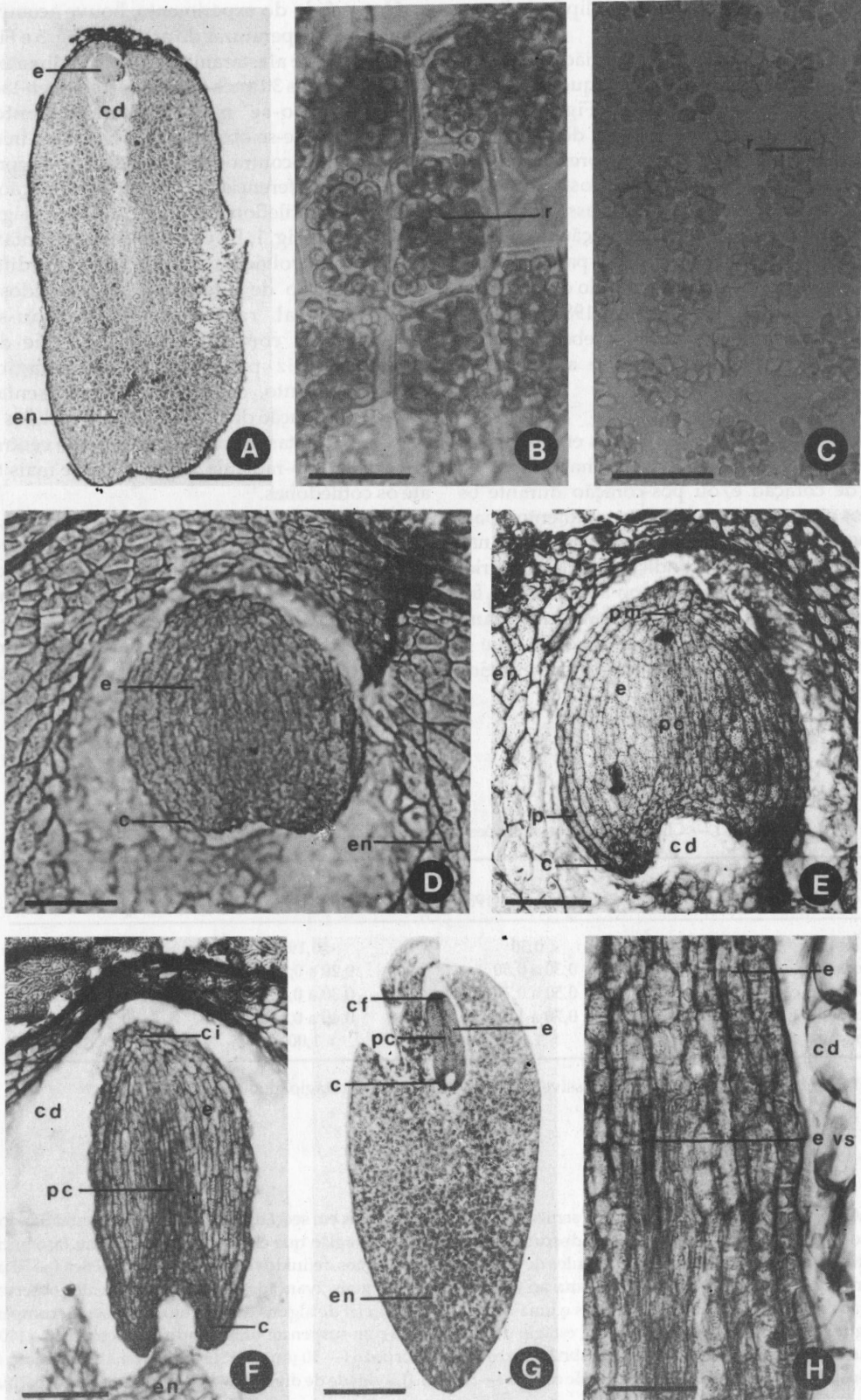
Experimentos paralelos foram montados de maneira semelhante, porém conduzidos à temperatura de laboratório (21 a 27°C), e desses, tomadas amostras ao longo dos doze meses e medidas.

As fotomicrografias foram feitas com aparelhagem fotográfica (marca Leitz, modelo Leica MD2), acoplada ao microscópio óptico (marca Leitz, modelo Dialux 20 EB).

## RESULTADOS

O tecido endospérmico, contendo o embrião, mede, em média 3,06 mm, segundo o comprimento do maior eixo (Fig. 1, A). O mesmo se acha rodeado por tecidos carpelares e ovulares cuja ontogenia está sendo objeto de um trabalho particular, em redação. É um tecido de reserva formado por células de tamanho irregular, com citoplasmático rico

Fig. 1.— Morfologia interna e histoquímica de sementes de *Ilex paraguariensis*, em secção longitudinal de material fresco e fixado. A, Tecido endospérmico contendo embrião (—500 µm) material fixado; B e C, Endosperma de sementes, seccionado transversalmente mostrando reservas protéicas, evidenciadas pela cor cinza escuro, dentro de vacúolos, no teste para proteínas totais, em material fresco B. (—50 µm); mesmo teste que o anterior, em material fixado C. (—50 µm); D, Embrião em estágio de coração, com início de formação de cotilédones (—100 µm) material fixado; E, Embrião em estágio de pós-coloração (—100 µm) material fixado; F, Embrião em estágio de torpedão (—100 µm) material fixado; G, Embrião em estágio maduro (—500 µm) material fixado; H, Detalhe do eixo embrionário de embrião em estágio maduro (—50 µm) material fixado. (Cotilédones - c; coifa-cf; cavidade de digestão - cd; células iniciais - ci; elementos vasculares - e vs; embrião - e; endosperma - en; meristema fundamental - mf; protoderme - p; procâmbio - pc; promeristema - pm).



em proteínas e lipídios, portanto, lipoprotéico e carboidratos nas paredes.

O embrião está localizado na região micropilar do endosperma, ocupando uma pequena área no interior deste tecido nutritivo (Fig. 1, A). O comprimento dos embriões variou de 0,2 mm a mais de 1,0 mm. Dentro destes valores, divididos em intervalos, e observando os embriões morfológicamente, foi feita uma classificação em estágios: globular, coração, pós-coração, torpedo e maduro. Esses intervalos de medidas para embriões de *Ilex paraguariensis*, variam segundo diversos autores (Ferreira & Hu, 1984; Niklas, 1987). No presente trabalho, estes intervalos receberam novos limites pois os anteriores não se ajustaram à classificação (Tabela 1).

O gráfico da Fig. 3 mostra que os embriões das sementes colocadas ao ar livre permaneceram no estágio de coração e/ou pós-coração durante os primeiros oito meses, ocorrendo crescimento a partir do nono mês. Isso também foi observado nas sementes semeadas em condições de laboratório. Tomando-se intervalos de tempo acumulados, foi observado que apenas alguns embriões cresceram, chegando à maturidade (Fig. 4), sendo que a maioria dos embriões apresentava-se nos estágios já mencionados.

No período do experimento, houve acompanhamento das temperaturas do ar e solo (Fig. 5 e Fig. 6), as quais não se afastaram das normais climatológicas dos últimos 30 anos (dados não apresentados).

Analisando-se morfoanatomicamente as sementes, pode-se observar que nas fases iniciais, os embriões encontravam-se em estágio de coração com pouca diferenciação celular e formação dos primórdios cotiledonares (Fig. 1, D). No estágio de pós-coração (Fig. 1, E), os embriões apresentavam-se mais desenvolvidos, os cotilédones bem diferenciados e início de diferenciação de tecidos. Na porção apical radicular, evidenciou-se o promeristema com células iniciais, que darão origem à raiz primária. Nesse estágio de desenvolvimento, os embriões já apresentavam início de formação do procâmbio, com células mais longas e estreitas, inicialmente na parte central do eixo hipocótilo-radícula, estendendo-se mais tarde até os cotilédones.

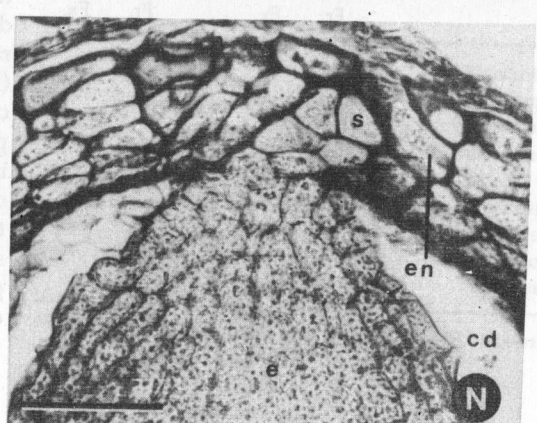
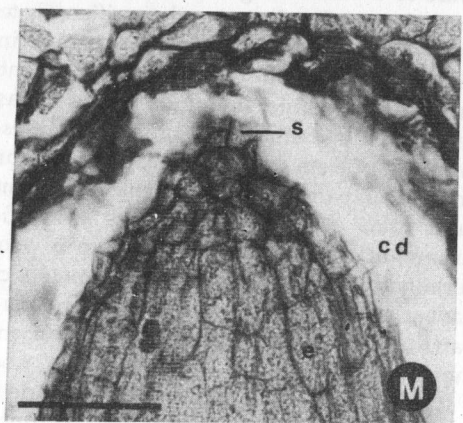
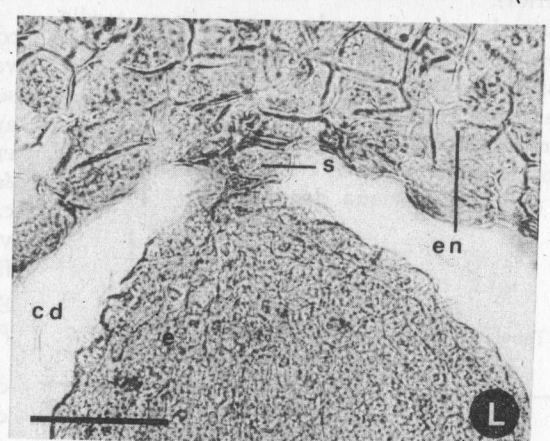
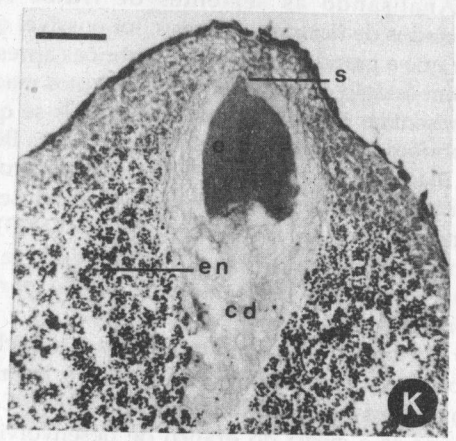
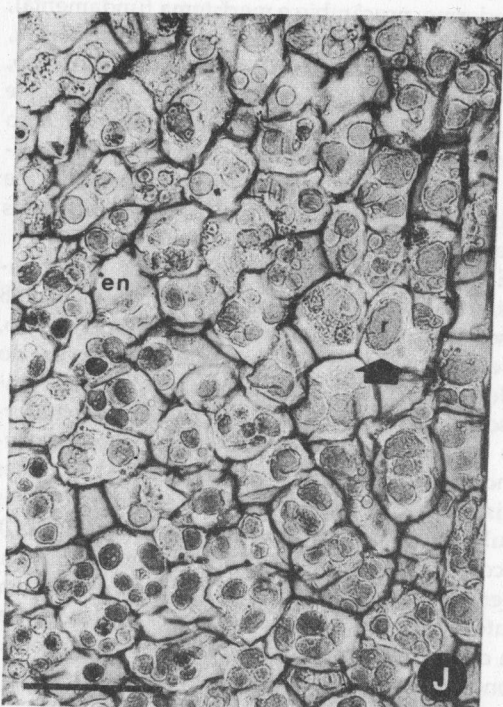
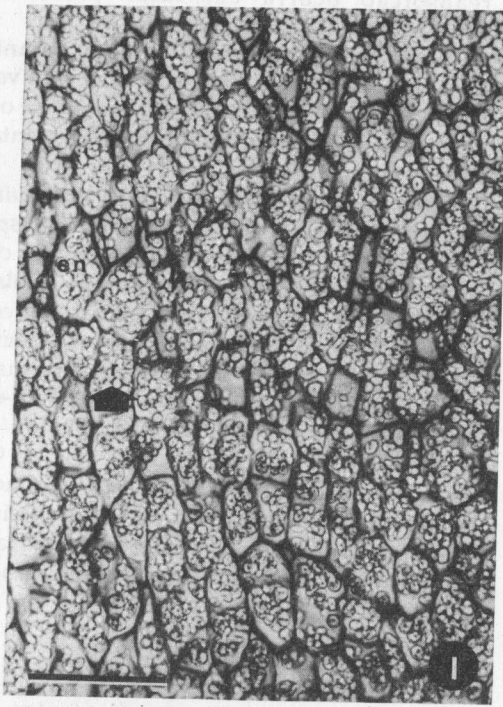
Nos embriões em estágio de torpedo (Fig. 1, F), o eixo embrionário e cotilédones mostravam-se bem desenvolvidos, com evidência mais pronunciada do procâmbio e células iniciais. Já no estágio maduro (Fig. 1, G), os cotilédones apresentavam-se bem mais desenvolvidos que nos estágios anteriores, o eixo hipocótilo-radícula alongado, com zonas meristemáticas bem delimitadas, distinguindo-se

Tabela 1.— Classificação dos embriões segundo medidas de seu maior eixo, em mm

Estágios de desenvolvimento	Ferreira & 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 0,44
pós-coração	0,50 a 0,70	0,30 a 0,40	0,45 a 0,69
torpedo	0,70 a 1,40	0,40 a 0,80	0,70 a 1,00
maduro	> 1,40	> 1,00	> 1,00

\* Durante o experimento não foi possível observar embriões em estágio globular.

Fig. 2.— Aspectos da morfologia interna da semente de *Ilex paraguariensis* em secção longitudinal de material fixado, com detalhes do endosperma e suspensor. I, Endosperma de semente, em região que circunda o embrião, em fase inicial da embriogênese tardia, observa-se os corpúsculos de reserva com contornos definidos e coloração homogênea (— 50 µm); J, Endosperma de semente, em região próxima ao embrião, em fase mais avançada de desenvolvimento, observa-se a diminuição em número, maiores dimensões e uma desagregação parcial de alguns corpúsculos de reserva, comparados com a Figura 2 I (— 50 µm); K, Embrião em estágio de pós-coração com suspensor unisseriado, pluricelular (— 100 µm); L, Detalhe do suspensor unisseriado em embrião em estágio de torpedo (— 50 µm); M, Suspensor em degeneração (— 50 µm); N, Suspensor com mais de uma fileira de células (— 50 µm). (Cavidade de digestão - cd; embrião - e; endosperma - en; reservas - r; suspensor - s).



protoderme, procâmbio e meristema fundamental, tendo sido constatada uma coifa mais desenvolvida, constituída por células de conteúdo mais denso, cobrindo as células do ápice radicular (Fig. 1, G), e presença de elementos vasculares em diferenciação junto ao procâmbio (Fig. 1, H), quando comparados com os embriões da fase anterior. O ápice caulinar não apresenta primórdios diferenciados até esta fase.

Embriões neste estágio, maduro, só foram encontrados em sementes que estavam há mais de 8 meses no solo. Nessa fase de desenvolvimento, observaram-se modificações nas reservas do endosperma, que nas fases anteriores, mostravam-se sob forma de pequenos corpúsculos de contornos bem definidos e coloração homogênea, ocupando por inteiro o lume celular (Fig. 2, I). Em fases mais avançadas, na zona próxima ao embrião, essas células sofreram marcadas modificações (Fig. 2, J), os corpúsculos de material de reserva mostraram-se em menor número e maiores dimensões, com contornos pouco definidos, coloração heterogênea, em certos casos associados a massas de partículas menores, dispersas no citoplasma (Fig. 2, J; ângulo superior).

Nas diversas fases da embriogênese tardia, observou-se a presença do suspensor. Apresenta-se unisseriado com mais de uma célula ou somente uma (Fig. 2, K-L), ou constituído por mais de uma fileira de células (Fig. 2, N). Esta estrutura não foi encontrada em todos os embriões, sugerindo que em alguns casos sua degeneração e posterior

reabsorção ocorra em fases precoces da embriogênese (Fig. 2, M).

O desenvolvimento embrionário durante os doze meses não foi uniforme, sendo possível encontrar embriões em estágio de coração até o final do experimento, quando alguns já se apresentavam em estágio maduro.

Foi possível observar, pelos testes histoquímicos em material fresco, que as reservas do endosperma são formadas por proteínas, constituindo corpos protéicos que ocupam grande parte da célula (Fig. 1, B) e lipídios, ocorrendo ainda polissacarídeos nas paredes celulares, que podem constituir-se em fonte adicional de cadeias carbonadas. Em material fixado, essas mesmas reservas mostravam-se sob forma de corpúsculos protéicos isolados, ovais, distribuídos no interior da célula (Fig. 1, C). Os testes específicos para taninos, assim como para amido, resultaram negativos, mostrando assim, não haver este tipo de substâncias no endosperma dessa espécie. Os testes realizados estão sumarizados na Tabela 2.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Analisando as sementes de frutos recém coletados de *Ilex paraguariensis*, foi possível observar que a grande maioria dos embriões apresentava-se em estágio de coração. Quando frutos maduros apresentam embriões neste estágio, diz-se que os embriões são rudimentares (Martin, 1946; Bewley & Black, 1982). Em embriões deste gênero, este caráter rudimentar, comparado ao desenvolvimento do fruto, foi descrito por Ives (1923), confirmado por Hu (1975) para 11 espécies do referido gênero e por Ferreira & Hu (1984) para *Ilex paraguariensis*.

Vários processos são usados para a quebra de dormência em sementes, entre eles o tratamento com baixas temperaturas (Roberts, 1972). Comparando-se a curva do gráfico de desenvolvimento dos embriões (Fig. 3) com às dos gráficos de temperaturas do ar e do solo no período do experimento (Fig. 5 e Fig. 6), nota-se que o comportamento das curvas é semelhante, sugerindo que as baixas temperaturas ou oscilações térmicas nos meses de inverno podem ter auxiliado na quebra da dormência, para algumas sementes, e as temperaturas mais elevadas, dos meses subsequentes, seriam eficientes para completar o processo germinativo. Observou-se que em sementes colocadas em condições de laboratório, onde houve pouca variação de temperatura, não ocorreu desenvolvimento dos embriões.

O suspensor é normalmente encontrado em fases iniciais da embriogênese. Além das funções de

Tabela 2.— Reações em endosperma de sementes, material fresco (Fr.) e material fixado (Fx.)

	Endosperma (reservas)		Endosperma (par. celular)	
	Fr.	Fx.	Fr.	Fx.
Ninhidrina-Schiff	+	+	-	-
Sakaguchi	-	-	-	-
Sudan IV Gerlach	+++	-	-	-
Sudan IV Rawlins	+	-	-	-
PAS	ñ	-	ñ	++
Sulfato Ferroso	-	-	-	-
Cloroeto Férrico	-	-	-	-
Melzer	-	-	ñ	ñ
Steimetz	+	-	-	-

Intensidade de coloração: forte +++  
 médio ++  
 fraco +  
 sem coloração -  
 teste não - realizado ñ

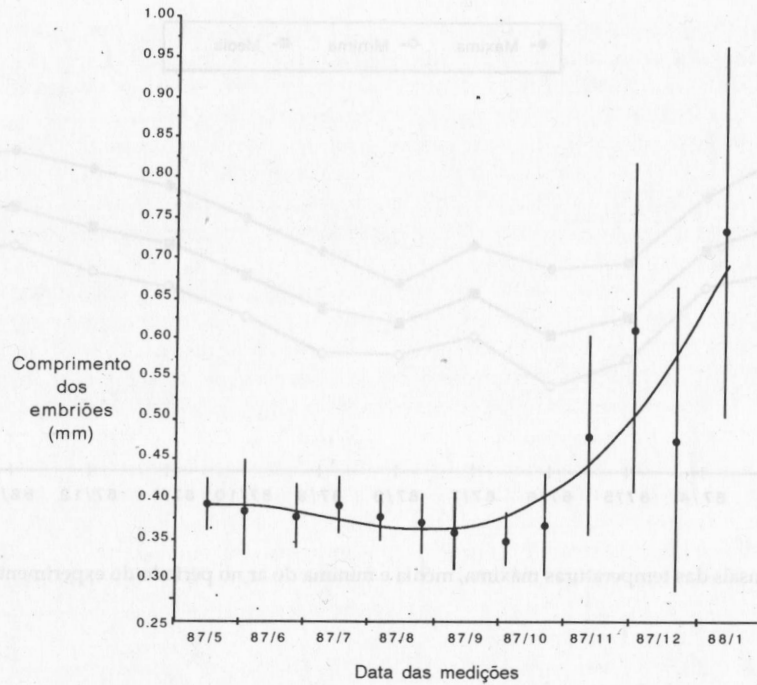


Fig. 3.— Média e desvio padrão do comprimento dos embriões de cada amostra e curva de regressão.

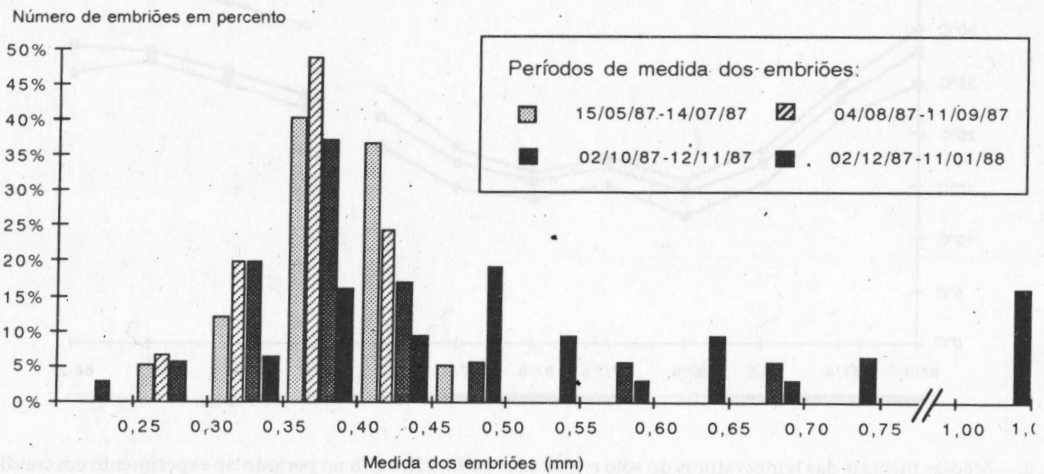


Fig. 4.— Frequência relativa de embriões por medida de comprimento em intervalos de tempo acumulados.

fixação e nutrição que lhe são atribuídas, parece desempenhar papel dinâmico no controle de crescimento dos embriões (Natesh & Rau, 1984; Yeung & Sussex, 1979). A ultraestrutura do

suspensor levou alguns autores a crer que ele esteja ligado a síntese de fitoormônios, pois a abundância de retículo endoplasmático liso observada nas células do suspensor é característica de células ativas na

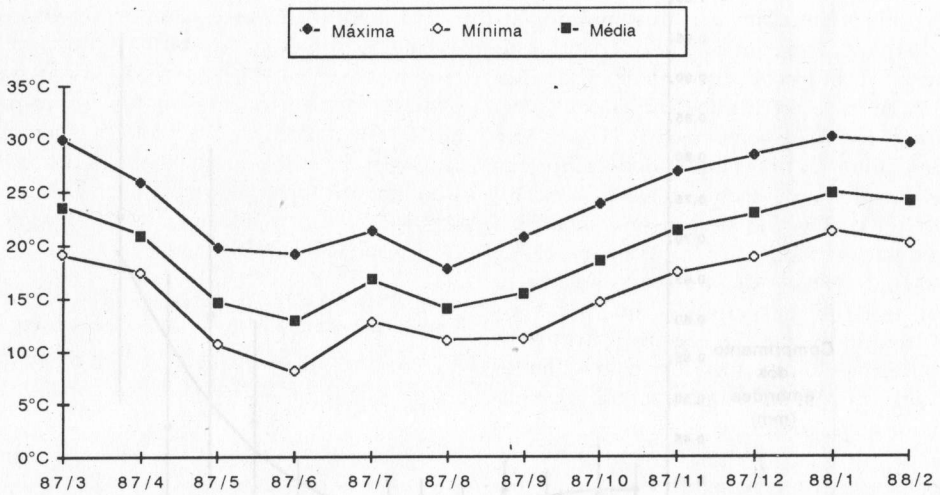


Fig. 5.— Médias mensais das temperaturas máxima, média e mínima do ar no período do experimento, março de 1987 a fevereiro de 1988.

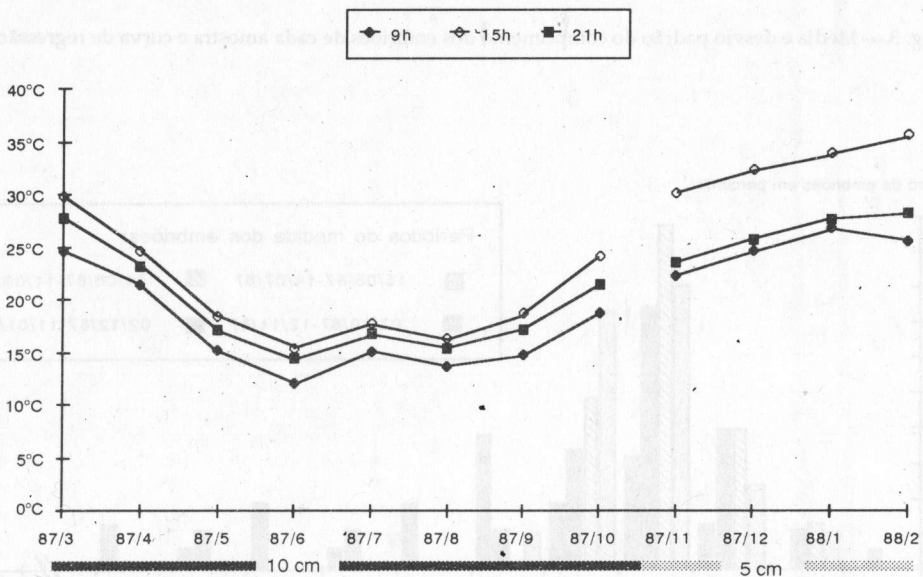


Fig. 6.— Médias mensais das temperaturas do solo registradas às 9h, 15h e 21h no período do experimento em condições-padrões para Porto Alegre. No período de março a novembro de 1987, as temperaturas do solo foram tomadas a 10 cm de profundidade. A partir deste mês, só foi possível obter dados de temperaturas a 5 cm de profundidade, por falha do equipamento.

síntese de terpenoídeos e ácido giberélico (Natesh & Rau, 1984). Em trabalhos realizados com outras famílias, Natesh & Rau (1984) puderam observar cromossomas politênicos presentes no suspensor, o

que indica a alta síntese de proteínas nesta estrutura. Yeung & Sussex (1979) citam que a presença do suspensor diretamente preso ou bem próximo ao embrião, em cultura "in vitro" de *Phaseolus*

*coccineus*, pode estimular seu crescimento, ao contrário do que ocorre com aqueles cultivados na sua ausência. Este fato sugere que o suspensor atua na síntese e/ou secreção de substâncias utilizáveis para o desenvolvimento embrionário. Um maior número de plantas foi obtido quando os embriões cultivados encontravam-se em estágio de coração, mostrando que o efeito do suspensor é específico para determinados estágios (Yeung & Sussex, 1979).

Em sementes viáveis de *Ilex paraguariensis*, o suspensor não foi encontrado em todos os embriões, sugerindo que sua degeneração e eventual desaparecimento possam ocorrer tanto em fases muito precoces da embriogênese, como em fases mais avançadas. Sugere-se que somente aqueles embriões, que conservam o suspensor até mais tarde, seriam capazes de prosseguir mais facilmente seu desenvolvimento, atingindo então um estágio em que se tornam autosuficientes para produção de substâncias, que estimulariam as enzimas hidrolíticas das reservas do endosperma, completando-se assim o desenvolvimento embrionário.

Analisando as reservas do endosperma nas diversas fases do desenvolvimento embrionário tardio, notou-se modificações acentuadas destas na região próxima ao embrião, quando esse se encontrava em estágios mais avançados.

Segundo Bewley & Black (1982), a utilização das reservas do endosperma é controlada pelo embrião que secreta fatores controladores como giberelinas, que são sintetizadas pelo próprio embrião antes da mobilização das reservas. Ashton (1976) cita que, o que mais comumente ocorre com os corpúsculos protéicos, durante a germinação, é um intumescimento, seguido por uma degradação interna das proteínas, fusão dos vacúolos e aparecimento de massas de proteínas parcialmente degradadas. Em leguminosas, no início do processo germinativo, a semente absorve água, os corpúsculos protéicos incham e as proteínas são subsequentemente degradadas a aminoácidos (Alvarez & Guerra, 1985). Parece haver uma soma de fatores, que podem estar influenciando no lento desenvolvimento e na baixa percentagem de germinação de *Ilex paraguariensis*.

Aparentemente há necessidade de um período de baixas temperaturas, e/ou oscilações térmicas, para auxiliar na quebra de dormência e subsequentemente 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 autosuficientes quanto a regulação de seu crescimento, ocorrendo então uma dormência menos pronunciada nessas sementes.

Há modificações nas reservas do endosperma, na região próxima ao embrião, quando este se encontra em estágios mais avançados de desenvolvimento. Os testes histoquímicos mostraram a natureza lipoprotéica das reservas do endosperma, carboidratos nas paredes, não tendo sido identificada a presença de taninos e amido.

#### AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Helga Winge e ao Prof. Dr. Alfredo E. Cocucci pela leitura crítica e sugestões no manuscrito original; à CAPES, órgão financiador desta pesquisa.

#### BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ, J. & GUERRA, H. 1985. Biochemical and morphological changes in protein bodies during germination of Lentil seeds. *J. Exp. Bot.*, 36(169): 1296-1303.
- ASHTON, F.M. 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 95-117.
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1982. *Physiology and biochemistry of seeds*. Berlin, Springer Verlag, v. 2. 375 p.
- CLARK, G. 1981. *Staining procedures*. Baltimore, Williams & Wilkins. 511 p.
- CUNHA, G. G. 1990. *Cultura de embriões de erva-mate (Ilex paraguariensis) "in vitro"* Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas — área de concentração Botânica-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- 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.
- FERREIRA, A. G. & HU, C.Y. 1989. Light-mediated inhibition of "in vitro" late embryogeny of *Ilex*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114 (5): 819-823.
- GERLACH, D. V. 1977. *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag. 311 p.
- GIBERTI, G. C. 1979. Las especies argentinas del género *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*) *Darwiniana*, 22(1-3):219.
- GILBERTSON, R. L. & RYVARDEN, L. 1986. *Northamerican Polypores*. Oslo. Abortiporus-Lindtneria, Fungiflora. v.1. 433 p.
- 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: 221-225.
- HU, C. Y. & FERREIRA, A. G. 1989. "In vitro" embryology of *Ilex*. In: PARÉ, J. & BUGNICOURT, M. *Some aspects and actual orientations in Plant Embryology*. Moullet. Amiens. p. 76-91.
- 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. 523 p.
- JOHRI, B. M. 1984. *Embryology of angiosperms*. Berlin, Springer Verlag. 830 p.
- LENDNER, A. 1918. Les semences de *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Apotheker-Zeitung*, 43: 565-569.
- LIMA, C. 1963. *Elementos de botânica, guia para trabalhos práticos*. Belo Horizonte UFMG - Fac. Farmácia. (polígrafo).
- LÖFGREN, A., 1917. *Manual das Famílias Naturaes Phanerogama*. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional. 611 p.
- MARTIN, A. C. 1946. The comparative internal morphology of seeds. *Amer. Midland Natur.*, 36: 513-660.
- MATTOS, J. R. 1965. *Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul*. São Paulo, Inst. de Botânica de S. P. 110 p.
- NATESH, S. & RAU, M. A. 1984. The Embryo. In: JOHRI, B. M. 1984. *Embryology of angiosperms*. Berlin, Springer Verlag. 830 p.
- NIKLAS, C. O. 1987. Estudios embriológicos y citológicos en la Yerba Mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *Bonplandia*, 6(1): 45-56.
- ROBERTS, E. H. 1972. Dormancy: a factor affecting seed survival in the soil. In: Roberts, E. H. (ed.). *Viability of seeds*. Chapman & Hall. p. 321-359.
- SASS, J. E. 1940. *Elements of botanical microtechnique*. New York, McGraw-Hill, 222 p.
- 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).
- VAN PILSUM, J. F. 1959. *Determination of creatinine and related Guanidium compounds in methods of biochemical analysis*. New York, Interscience Pub. v. 7.
- YASUMA, A. & ICHIKAWA, T. 1953. Ninhidrin-Schiff and Alloxan-Schiff staining. *J. Lab. and Clin. Med.*, 41: 296-299.
- 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: 423-433.