

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

Jordano Dorval Tavares de Carvalho

**A ESTRUTURA DA SEMENTE EM BROMELIACEAE JUSS.:  
DIVERSIDADE MORFOANATÔMICA, ONTOGENIA E EVOLUÇÃO DE  
CARACTERES**

Porto Alegre

2023

Jordano Dorval Tavares de Carvalho

**A ESTRUTURA DA SEMENTE EM BROMELIACEAE JUSS.:  
DIVERSIDADE MORFOANATÔMICA, ONTOGENIA E EVOLUÇÃO DE  
CARACTERES**

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Porto Alegre

### CIP - Catalogação na Publicação

Carvalho, Jordano Dorval Tavares de  
A estrutura da semente em Bromeliaceae Juss.:  
diversidade morfoanatômica, ontogenia e evolução de  
caracteres / Jordano Dorval Tavares de Carvalho. --  
2023.  
286 f.  
Orientador: Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de  
Pós-Graduação em Botânica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Semente. 2. Embrião. 3. Anatomia. 4. Morfologia.  
5. Bromeliaceae. I. Mariath, Dr. Jorge Ernesto de  
Araujo, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Programa de Pós-Graduação em Botânica - PPGBOT  
Av. Bento Gonçalves, 9500 - Bairro Agronomia - CEP 91501970 - Porto Alegre - RS - www.ufrgs.br  
Prédio 43433 s 214

### ATA DE DEFESA DE TESE Nº 05/2023

Aluno: **Jordano Dorval Tavares de Carvalho**, com ingresso em 29/03/2019  
Título: "A estrutura da semente em Bromeliaceae: diversidade morfoanatômica, ontogenia e evolução de caracteres".  
Orientador: Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Data: 29 de maio de 2023  
Horário: 14:00  
Local: Anfiteatro da Botânica; videoconferência

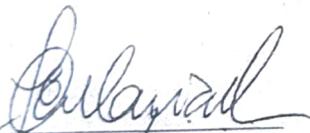
#### Banca Examinadora:

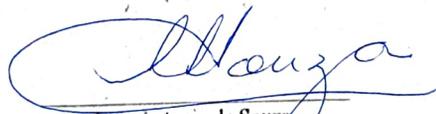
Prof. Dr. Luiz Antonio de Souza (UEM)  
Prof. Dr. João Marcelo Santos de Oliveira (UFSM)  
Pesq. Dra. Tamara Pastori (UFRGS)

Avaliação Geral da Banca:  Aprovado ( ) Reprovado  
Correções solicitadas:  Sim ( ) Não  
Indicação de Voto de Louvor:  Sim ( ) Não

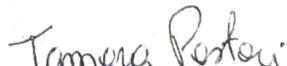
**Observação:** Esta Ata não pode ser considerada como instrumento final do processo de concessão de título ao aluno.

Porto Alegre, 29 de maio de 2023.

  
Jorge Ernesto de Araujo Mariath

  
Luiz Antonio de Souza

  
João Marcelo Santos de Oliveira

  
Tamara Pastori

*Dedico esta tese aos amigos e família, em especial a minha mãe, que sempre me apoiou na jornada da Botânica.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath, pelos ensinamentos e companheirismo ao longo dos anos do doutorado, em especial pela motivação e entusiasmo pela Botânica, que foi essencial para a concretização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório nesse tempo de doutorado, José Fernando Richit, Patrícia Gentz, Rhanuel Nicholas Lisowski Gonçalves Roberta Maidana e Tainá Schürer, pela amizade e companhia no dia-a-dia ao longo desses anos. Um agradecimento especial ao Pedro Schwambach de Almeida e ao Henrique Mallmann Büneker, não só pela amizade, mas também por todo o apoio e ideias durante realização deste trabalho.

À equipe LAVeg, em especial à coordenadora do laboratório, Prof. Dr.<sup>a</sup> Alexandra Antunes Mastroberti e a técnica do laboratório, Dr.<sup>a</sup> Juciana Clarice Cazarolli, por propiciarem as condições para a realização do trabalho no laboratório.

Aos professores do LAVeg e do PPG Botânica da UFRGS pelos ensinamentos e apoio durante os anos do doutorado.

À Universidade Federal do Rio grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS, que possibilitaram a idealização e execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos, incluindo a taxa bancada, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Botânica Estrutural (Labote) da Universidade Federal de Santa Maria e seu coordenador, Prof. Dr. João Marcelo Santos de Oliveira por me iniciar no mundo da Anatomia Vegetal, como também pelas primeiras amostras coletadas de Bromeliaceae e uso do espaço do laboratório.

Ao Jardim Botânico de Porto Alegre, em especial a Natividade Ferreira Fagundes, pela acesso à coleção viva de Bromeliaceae e permissão de coleta de material.

Ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro, em especial para a Dr.<sup>a</sup> Rafaela Campostrini Forzza, pelo acesso a amostras provindas das valiosas exsicatas do Herbário RB.

A Ivón Mercedes Ramírez Morillo do Centro de Investigación Científica de Yucatán, pelas amostras de inúmeras amostras de Bromeliaceae do México, em especial de Hechtioideae, que de outra forma, não seriam analisadas neste trabalho.

Ao amigo Jones Caldas da Silva pelo acesso à sua bela coleção viva particular e entusiasmo e conhecimento pela diversidade de Bromeliaceae compartilhados comigo.

Ao grande taxonomista e amigo Des. Elton Martinez Carvalho Leme, não só pelo acesso à maior coleção de bromélias do mundo (Refúgio dos Gravatás), mas por todo o conhecimento e amor por Bromeliaceae, compartilhados comigo de forma tão especial ao longo desses anos.

Aos amigos da Botânica e da vida, em especial Anderson Santos de Mello e Marina Fülber, que estiveram comigo em diversas e lindas paisagens ao longo do doutorado. Um agradecimento especial à Marina, por todo o apoio e amor depositados em mim na época do doutorado.

Agradeço a minha família, Sandra Lucia Tavares, Gabrieli Tavares Soares e Eleandro Serafim, por todo amor e apoio ao longo da vida e do doutorado. Um agradecimento especial a minha avó, Minda Kasper Tavares, que me ensinou muito sobre as plantas e sobre a vida.

Agradeço especialmente a minha amada Vitória Estivalet Machado, não só pelo amor infinito compartilhado comigo diariamente, mas também por ser meu porto seguro durante a etapa mais decisiva do doutorado. Agradeço muito pelo carinho e apoio que sempre me inspiram, e que foram essenciais para a realização deste trabalho.

## PREFÁCIO

A tese a seguir está organizada em capítulos, em sua maioria consistindo em artigos científicos, já publicados ou não. Quando já publicados, no caso dos capítulos II, IV e VI, os artigos ou excertos foram traduzidos para o português na composição dos capítulos, exceto os textos nas figuras. As referências foram formatadas segundo normas da revista a qual os trabalhos foram submetidos.

O Capítulo I traz uma breve introdução geral sobre os temas desta tese, incluindo as motivações e justificativas para o tema, além de informações gerais sobre o grupo e a estrutura estudados.

O Capítulo II trata da diversidade morfoanatômica e ontogenia do envoltório da semente em Bromelioideae, além de dados histoquímicos e da forma da semente, publicado integralmente na forma de um artigo científico na *Botanical Journal of the Linnean Society*.

O Capítulo III apresenta a análise do envoltório da semente de maneira abrangente em Bromeliaceae, incluindo sua diversidade morfoanatômica e evolução de caracteres. O anexo desse capítulo traz uma prévia dos estudos ontogenéticos do envoltório para representantes de Bromeliaceae.

O Capítulo IV contém um estudo do desenvolvimento do embrião e do endosperma em *Billbergia nutans* e as implicações dessa análise na embrionomia de Bromeliaceae. Capítulo publicado integralmente, na forma de um artigo científico na revista *Flora*.

O Capítulo V traz uma análise da morfologia do embrião em Bromeliaceae, com aspectos da anatomia e evolução de caracteres para a família.

O Capítulo VI apresenta excertos de trabalhos já publicados ou em processo de publicação, com a aplicação da morfoanatomia da semente na taxonomia de espécies e gêneros de Bromelioideae.

Finalmente, o Capítulo VII encerra a tese com uma revisão geral das principais conclusões e abordagens futuras a partir dos resultados obtidos.

## RESUMO

A estrutura e a ontogenia dos órgãos reprodutivos têm sido estudados sob diferentes aspectos em Bromeliaceae. Apesar disso, a semente permanecia praticamente desconhecida do ponto de vista estrutural na família. Dada sua importância na dispersão de espécies e aparente diversidade estrutural em Bromeliaceae, o presente estudo pretende analisar a morfoanatomia e ontogenia de seus constituintes na tentativa de descrever e comparar essa diversidade, além de propor hipóteses evolutivas para os principais caracteres. As análises foram realizadas sobretudo a partir de Microscopia de Luz para mais de 100 espécies e 50 gêneros das oito subfamílias atualmente aceitas de Bromeliaceae. A análise do envoltório revelou dados em sua maioria inéditos para a família, em mais de 50 caracteres descritos e comparados ao longo das oito subfamílias. Entre os resultados mais importantes, nossa análise indica que sementes alongadas e biapiculadas são ancestrais em Bromeliaceae, sendo a testa a principal camada mecânica, em diferentes variações. Sementes obovóides ou discóides são derivadas na família, assim como a perda da função mecânica da testa, que tem sua máxima expressão em Bromelioideae. Nessa subfamília trouxemos ainda alguns dados histoquímicos, sobretudo sobre a presença de mucilagem e sarcotesta na semente. A ontogenia do envoltório foi essencial na proposição de caracteres homólogos, seja dentro de uma estrutura em diferenciação, ou entre grupos estudados. Os diversos caracteres do envoltório da semente são comparados ao longo das subfamílias e gêneros, destacando as principais implicações na sistemática e diversificação da família. Quanto ao desenvolvimento do embrião e endosperma, o estudo de *Billbergia nutans* trouxe discussões relevantes para a família como um todo, incluindo a proposição de uma nova Variação embrionômica para

Bromeliaceae. A diversidade morfológica do embrião e alguns aspectos da sua anatomia geraram mais uma dezena de caracteres inéditos, dos quais o tamanho do embrião e morfologia do cotilédone foram os mais relevantes. Nossa análise indica que embriões pequenos com cotilédone curto ou vestigial são ancestrais em Bromeliaceae. Este estudo também traz alguns exemplos de aplicações diretas da estrutura da semente na sistemática da família.

**Palavras-chave:** Bromeliaceae - embrião - embriologia - endosperma - envoltório - ontogenia - otimização de caráter ancestral - Poales - semente

## ABSTRACT

The structure and ontogeny of the reproductive organs have been studied under different aspects in Bromeliaceae. Despite this, the seed remains practically unknown from a structural point of view in the family. Given its importance in species dispersion and apparent structural diversity in Bromeliaceae, the present study intends to analyze the morphoanatomy and ontogeny of its constituents to describe and compare this diversity, in addition to proposing evolutionary hypotheses for the main characters. The analyzes were carried out mainly from Light Microscopy for more than 100 species and 50 genera of the eight currently accepted subfamilies of Bromeliaceae. The seed coat analysis revealed data mostly unprecedented for the family, in more than 50 characters described and compared along the eight subfamilies. Among the most important results, our analysis indicates that elongated and biappendiculate seeds are ancestral in Bromeliaceae, with the testa being the main mechanical layer, in several variations. Obovoid or discoid seeds are derived in the family, as well as the loss of mechanical function of the testa, which has its maximum expression in Bromelioideae. In this subfamily, we also brought some histochemical data, especially on the presence of mucilage and sarcotesta in the seed. The ontogeny of the seed coat was essential in the proposition of homologous characters, either within a structure in differentiation or between the studied groups. Different seed coat characters are compared across subfamilies and genera, highlighting the main implications for family systematics and diversification. As for the development of the embryo and endosperm, the study of *Billbergia nutans* brought relevant discussions to the family, including the proposition of a new embryonomic variation for Bromeliaceae. The morphological diversity of the embryo and some aspects of its

anatomy generated over a dozen new characters, of which the size of the embryo and the morphology of the cotyledon were the most relevant. Our analysis indicates that small embryos with short or vestigial cotyledon are ancestral in Bromeliaceae. This study also brings some examples of direct applications of seed structure in family systematics.

**Keywords:** Bromeliaceae - character optimization - embryo - embryology - endosperm - ontogeny - Poales - seed - seed coat

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	14
Introdução geral.....	14
Referências.....	20
<b>CAPÍTULO II</b> .....	22
<b>O envoltório da semente no contexto evolutivo de Bromelioideae (Bromeliaceae): diversidade morfoanatômica e ontogenia nas linhagens núcleo e sem tanque</b> .....	22
Introdução.....	24
Material e Métodos.....	28
Resultados.....	33
Discussão.....	57
Conclusões.....	69
Referências.....	71
<b>Capítulo III</b> .....	76
<b>Plumas, alas e outras coisas: diversidade morfoanatômica e evolução de caracteres do envoltório da semente em Bromeliaceae Juss. (Poales)</b> .....	76
Introdução.....	77
Material e Métodos.....	81
Resultados.....	88
Discussão.....	132
Conclusões.....	148
Referências.....	151
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	159
<b>Desenvolvimento do embrião e do endosperma em <i>Billbergia nutans</i> H. Wendl. ex Regel (Bromelioideae - Bromeliaceae) e suas implicações para a embrionomia de Bromeliaceae</b> .....	159
Introdução.....	161
Material e Métodos.....	165
Resultados.....	168
Discussão.....	178
Conclusões.....	188
Referências.....	190

<b>CAPÍTULO V</b> .....	194
<b>Desvendando a diversidade estrutural do embrião em Bromeliaceae Juss.</b>	
<b>(Poales): diversidade morfológica, anatomia e evolução de caracteres</b> .....	194
Introdução.....	195
Material e Métodos.....	198
Resultados.....	205
Discussão.....	225
Conclusões.....	233
Referências.....	235
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	239
<b>Contribuições da morfoanatomia da semente na circunscrição de espécies e gêneros em Bromelioideae - Excertos</b> .....	239
Excerto I - <i>Hylaeaicum</i> , um novo status para um subgênero amazônico de <i>Neoregelia</i> .....	240
Excerto II - A morfoanatomia da semente nos Cryptanthoides: novos status e um novo gênero.....	245
Excerto III - Morfoanatomia do envoltório da semente em uma peculiar nova espécie de <i>Krenakanthus</i> .....	259
Excerto IV - A morfoanatomia da semente na circunscrição de <i>Canistrum</i> e novo status para <i>Cucullatanthus</i> .....	265
<b>CAPÍTULO VII</b> .....	280
<b>Considerações finais</b> .....	280

## CAPÍTULO I

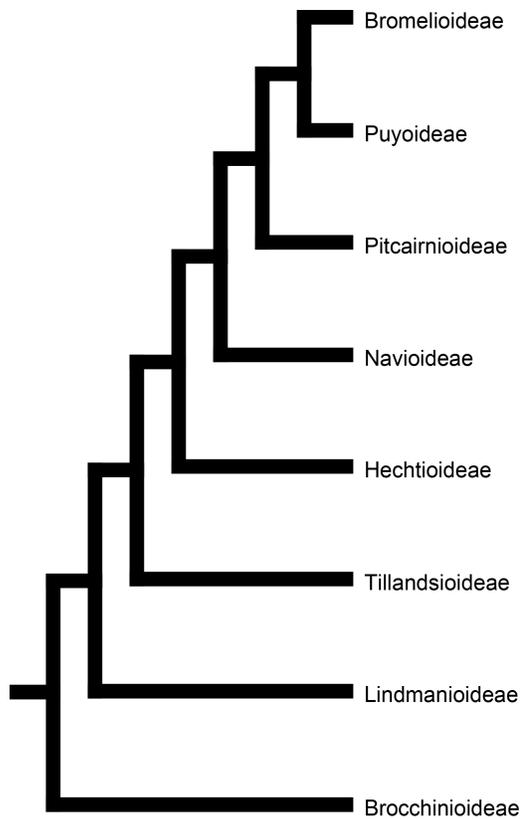
### **Introdução geral**

A semente das Angiospermas é uma estrutura complexa, onde tipicamente três gerações se encontram após a fecundação. A diferenciação do envoltório da semente representa as últimas transformações no corpo do esporófito após a fecundação, acompanhadas de modificações no gineceu que serão fundamentais para a dispersão da nova planta. O embrião representa essa nova geração, a descendência esporofítica na qual se encontram as primeiras características morfológicas de um esporófito, como resultado do desenvolvimento do zigoto. O endosperma é uma geração acessória, nas palavras de Cocucci (2004) que, principalmente nas monocotiledôneas, tem uma importante função de armazenamento de substâncias de reserva para a nutrição do embrião e da plântula. Esse encontro de gerações, sua complexidade e a beleza que emerge delas, talvez tenha sido minha principal motivação para idealizar esta Tese, na medida em que elas se desenvolvem em uma única estrutura, ao mesmo tempo que individualmente apresentam características estruturais e ontogenéticas únicas.

O foco deste trabalho é, assim, a semente em suas variações estruturais e ontogenéticas e como tais variações podem ter evoluído em determinado grupo. Dessa forma, não pretendo que a anatomia e a embriologia sejam apenas ferramentas no estudo da Sistemática. Pelo contrário, as relações teorizadas para um grupo em estudos filogenéticos foram uma das ferramentas que utilizei para compreender a evolução estrutural e propor hipóteses de homologia através de análises comparativas. Por outro lado, a escolha consciente de um grupo de estudo é fundamental nesse tipo

de análise, especialmente quando se pretende que ela seja abrangente e gere respostas plausíveis no cenário evolutivo desse grupo.

Minha escolha por Bromeliaceae como foco se construiu em anos de contato com a literatura sobre a família, seja de morfologia, embriologia ou sistemática, e na prática do estudo anatômico, que me dediquei desde os primeiros meses da graduação, em 2012. Para além disso, Bromeliaceae é uma família de Poales bastante diversa e importantíssima na flora neotropical, com espécies epifíticas, rupícolas, saxícolas, terrícolas, reófitas ou até mesmo habitando áreas urbanas em diferentes substratos (Benzing, 2000), sendo um dos exemplos mais bem estudados de irradiação adaptativa em monocotiledôneas (Givnish *et al.*, 2011). Bromeliaceae também é conhecida pelas espécies ornamentais e de importância econômica, como o mundialmente famoso abacaxi. Além disso, diversas espécies de Bromeliaceae, ao acumular água em seus tanques, acabando criando um ecossistema próprio. No momento que escrevo essa introdução foram contabilizadas 3742 espécies de 82 gêneros em Bromeliaceae (Gouda *et al.*, 2023, continuamente atualizado), distribuídos atualmente em oito subfamílias monofiléticas (Givnish *et al.*, 2011) (Fig. 1), que são a base para a classificação atual dos gêneros conhecidos. Nesse contexto, um trabalho que pretenda analisar a diversidade estrutural da família deve levar em consideração essa classificação, buscando amostrar ao máximo a diversidade filogenética, ao menos em termos infrafamiliares. Porém isso representa um grande desafio em Bromeliaceae. Dada a distribuição específica de determinados gêneros e até mesmo subfamílias, como as cedo-divergentes Brocchinioideae e Lindmanioideae, trabalhar com plantas *in habitat* significa um alto investimento na exploração de locais inacessíveis, como os tepuis amazônicos, em busca de espécies pouco estudadas desde a sua descrição (Smith & Downs 1974).



**Figura 1.** Árvore filogenética simplificada das relações infrafamiliares em Bromeliaceae, baseada na árvore de Givnish *et al.* (2011)

A utilização de amostras herborizadas foi uma alternativa que se mostrou muito eficiente na análise anatômica das sementes, especialmente nesses casos em que a coleta e fixação do material vivo não foi possível. Além disso, a utilização de espécimes de coleções vivas foi igualmente ou até mais importante, e aqui devo mencionar a maior delas e provavelmente a maior do mundo, o Refúgio dos Gravatás, coleção particular do grande taxonomista Elton M. C. Leme, na qual conheci a maioria dos gêneros de Bromeliaceae. As plantas *typus* de espécies e gêneros de diversas localidades, além de novidades em primeira mão de seu maior descritor, me inspiraram muito ao longo do doutorado, sendo que eu procurei utilizar o máximo de material vegetal advindo dessa coleção para minha análise.

Um outro fator foi muito importante para a escolha desse grupo: as variações morfológicas e porque não dizer ecológicas que as sementes de Bromeliaceae evoluíram em diferentes subfamílias. Em sua classificação clássica em três subfamílias, popularizada na monografia da Flora Neotropica de Smith & Downs (1974), a semente e o fruto são protagonistas nas características estruturais de cada subfamília. Por exemplo, Tillandsioideae e Pitcairnioideae se caracterizavam pelos frutos capsulares e sementes plumosas na primeira e aladas ou exapendiculadas na segunda subfamília, tipicamente anemocóricas. Em contraste, os frutos bacoides de ovário ínfero e sementes mucilaginosas eram característicos de Bromelioideae, em claras adaptações à zoocoria (Smith & Downs 1974; Benzing, 2000).

Dada essa importância, uma das principais fontes de dados morfológicos de sementes em Bromeliaceae é encontrada na introdução do primeiro volume da monografia de Smith & Downs (1974). Os dados descritos ali são um compilado importante, inclusive com dados anatômicos do envoltório para algumas espécies, porém está longe de ser um estudo morfológico comparativo, visto que esse não era o objetivo dos autores, que abordaram espécies e gêneros pontuais. Uma década mais tarde, Varadarajan & Gilmartin (1988) publicam um dos primeiros estudos morfológicos comparativos para a semente em Bromeliaceae, analisando diversas espécies de Pitcairnioideae, na então atual circunscrição da subfamília, obtendo resultados surpreendentes. Uma diversidade morfológica sem precedentes estava sendo revelada, que serviu de base para o mesmo autor sugerir que essa subfamília não era monofilética, hipótese que se confirmou em estudos filogenéticos posteriores, dividindo Pitcairnioideae em diferentes subfamílias (Givnish *et al.*, 2007; Givnish *et al.*, 2011). Desde a atual circunscrição da família, contudo, não houve um trabalho abrangente em termos de morfologia comparativa da semente em Bromeliaceae,

exceto pontualmente em comparações de grupos aparentados, por exemplo em Bromelioideae (Leme *et al.*, 2017) e Pitcairnioideae *s. s.* (Schütz *et al.*, 2016).

Quanto à anatomia do envoltório e do embrião, da mesma forma, havia poucos trabalhos desde da compilação de Smith & Downs (1974), e aqui merece nota um importante estudo comparativo da semente de monocotiledôneas de Nemirovich-Danchenko (1985), onde encontrei as informações mais detalhadas sobre a anatomia da semente em representantes de Bromeliaceae, ainda que para poucas espécies e gêneros. Nesse trabalho a anatomia do envoltório da semente em espécies de Bromelioideae confirmou a presença de sementes tégmicas com uma tenra sarcotesta em alguns de seus representantes, assim como a presença de sementes testais em outras subfamílias, como Tillandsioideae. Em *Tillandsia* e *Vriesea*, destaca-se as fibras na testa que se separam entre si, formando o apêndice plumoso nesses gêneros, sendo este um dos poucos trabalhos a trazer alguns aspectos ontogenéticos do envoltório da semente.

A escassez de dados na literatura, dessa forma, acabou contribuindo para a escolha do tema, mas foram as contradições encontradas no estudo do embrião (Billings, 1904; Birge, 1911; Johansen 1950, Rao & Wee, 1979; Mendes *et al.*, 2010; Mendes *et al.* 2018) que me fizeram, pela primeira vez, questionar o estado da arte da semente e da embriologia em Bromeliaceae. Isso porque as informações contidas nesses trabalhos, apesar de relativamente detalhadas e consistentes, além de muito semelhantes entre si, continham um erro conceitual que tornava impossível aceitar a classificação embrionômica proposta para a família. Essa contradição me levou a idealizar o Capítulo IV, que culminou com uma nova classificação embrionômica, além de dados do desenvolvimento do endosperma, para Bromeliaceae como um todo. Apesar de ter analisado uma única espécie, esse trabalho consolidou o início dos

meus estudos sobre a semente em Bromeliaceae, permitindo compreender as estruturas do embrião maduro, que descrevi e comparei no Capítulo V.

O presente trabalho utilizou-se, assim, da ontogenia como base para a classificação e proposição de homologias, tão necessárias em estudos comparativos e de evolução de caracteres. Quanto ao desenvolvimento do embrião e do endosperma, devido ao grande empenho e tempo gasto nesse tipo de análise, o capítulo citado consiste no único avanço que obtive nessa área, sobretudo conceitual. A ontogenia do envoltório, por outro lado, teve uma grande importância prática para os inúmeros caracteres descritos. Uma vez que essa estrutura passa por transformações por vezes profundas após a fecundação, a sua análise comparativa é dependente da análise ontogenética.

Aqui devo me justificar, pois apesar de ter analisado a ontogenia do envoltório em representantes de cinco das oito subfamílias atualmente aceitas, trago essas informações completas apenas no Capítulo II, para Bromelioideae. Devido ao grande número de espécies analisadas e volume final do Capítulo III, sobre o envoltório em Bromeliaceae no geral, fui obrigado a omitir os dados ontogenéticos desse capítulo e por fim, da tese. O atraso imposto pela pandemia infelizmente impactou o resultado final da Tese escrita, mas apenas no sentido documental, uma vez que o conhecimento foi adquirido e aplicado durante o seu desenvolvimento. Assim, no Anexo do capítulo III trarei apenas uma prévia desses estudos, que foram completos no sentido metodológico, porém não foram consolidados na apresentação.

Por fim, no capítulo VI trarei as minhas contribuições em estudos taxonômicos e da sistemática de Bromelioideae, especialmente na delimitação de espécies e gêneros novos ou novos status, nos quais sou coautor. Optei por trazer apenas as contribuições que são tema dessa tese, para ser sucinto e direto com as

aplicações do conhecimento que explorei aqui, embora tenhamos contribuído eu e o professor Mariath, também integralmente como autores.

Devo comentar que essa introdução não merece a alcunha de revisão teórica, uma vez que há outros trabalhos publicados sobre a semente em Bromeliaceae que não foram citados aqui. Ela é, antes de tudo, um relato pessoal, apesar de formal, sobre o contexto que motivou meus estudos do Doutorado e que culminou nesta Tese. Revisões teóricas completas estão presentes em cada capítulo, incluindo citações de artigos publicados da própria tese, com exceção do Capítulo III - Anexo e Capítulo VI, apenas com excertos e figuras.

Por fim, devo dizer que nas próximas páginas apresento não só o conhecimento construído ao longo desses quatro anos, mas também a minha satisfação e dedicação em olhar e mostrar a beleza estrutural desse grupo de plantas, pelo qual tenho um carinho especial.

## Referências

- Benzing DH. 2000.** *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Billings FH. 1904.** A study of *Tillandsia usneoides*. *Botanical Gazette* **38**: 99-121.
- Birge WI. 1911.** The Anatomy and some biological aspects of the "ball moss": *Tillandsia Recurvata* L. *Bulletin of The University of Texas* **194**: 5-22.
- Cocucci AE. 2005.** Morphogenetic seed types of Spermatophyta. *Plant Systematics and Evolution* **250**: 1-6.
- Givnish TJ, Millam K, Berry PE, Sytsma, KJ. 2007.** Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae Inferred from ndhF sequence data. *Aliso* **23**: 3–26.

- Givnish TJ, Barfuss MH, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JA, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2011.** Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* **98**: 872–895.
- Gouda EJ, Butcher D, Dijkgraaf L. 2023. (Continuously updated)** Encyclopaedia of Bromeliads, Version 5. Utrecht University Botanic Gardens, online <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>(accessed: [04-05-2023]).
- Johansen DA. 1950.** *Plant embryology: Embryogeny of the Spermatophyta*. Chronica Botanica Company, Waltham, Massachusetts.
- Leme EMC, Heller S, Zizka G, Halbritter H. 2017.** New circumscription of *Cryptanthus* and new Cryptanthoid genera and subgenera (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on neglected morphological traits and molecular phylogeny. *Phytotaxa* **318**: 1–88.
- Mendes SP, Costa CG, De Toni KLG. 2010.** Embryo development of *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an endangered Brazilian species. *Australian Journal of Botany* **58**: 485–492.
- Mendes SP, Vieira RC, De Toni KLG. 2018.** Embryo and endosperm development in *Pitcairnia encholirioides* (Pitcairnioideae–Bromeliaceae): an endangered species of the Atlantic Forest. *Flora* **246-247**: 10–18.
- Nemirovich-Danchenko EN. 1985.** Bromeliaceae. In: Takhtajan AL, ed. *Anatomia seminum comparativa. Tom. 1: Liliopsida seu Monocotyledones*. Leningrad: Nauka, 151–156.
- Schütz N, Krapp F, Wagner N, Weising K. 2016.** Phylogenetics of Pitcairnioideae s.s. (Bromeliaceae): evidence from nuclear and plastid DNA sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181(3)**: 323–342.
- Smith LB, Downs RJ. 1974.** *Pitcairnioideae (Bromeliaceae)*. In: *Flora Neotropica* **14**: 1–658.
- Varadarajan GS, Gilmartin AJ. 1988.** Seed morphology of the subfamily Pitcairnioideae (Bromeliaceae) and its systematic implications. *American Journal of Botany* **75**: 808–818.

## CAPÍTULO II

### O envoltório da semente no contexto evolutivo de Bromelioideae (Bromeliaceae): diversidade morfoanatômica e ontogenia nas linhagens núcleo e sem tanque

*Botanical Journal of the Linnean Society*, 2023, **XX**, 1–29. With 11 figures.

#### The seed coat in the evolutionary context of Bromelioideae (Bromeliaceae): morphoanatomical diversity and ontogeny in the core and tankless lineages

JORDANO D. TAVARES DE CARVALHO<sup>1,\*</sup>, ELTON M. C. LEME<sup>2,3</sup> and  
JORGE E. DE ARAUJO MARIATH<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Anatomia Vegetal, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP 91609-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup>Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rua Pacheco Leão, 915, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup>Research Associate, Marie Selby Botanical Gardens, FL, Sarasota, USA

Received 13 April 2022; revised 29 September 2022; accepted for publication 19 November 2022

Seed morphology could provide significant characters for understanding the diversification of some clades in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae, but little is known about the anatomical diversity and ontogeny of the seed coat in this diverse subfamily. We analysed the morphoanatomy of the seed coat for 48 species from 25 genera of the major lineages of Bromelioideae, from which we selected four species for ontogenetic analysis. Standard techniques for light microscopy were adapted for the anatomical study of seeds. Thirty-three variable characters were described and compared. Flattened or angular usually exappendiculate, tegmic-endotestal seeds, with secondarily thickened endotesta and undulate or costate tegmen, are common characteristics of the tankless lineages. Long oblongoid–obovoid, appendaged or exappendiculate, exclusively tegmic and mucilaginous seeds are common to core Bromelioideae. Anatomical features of the exotegmen and testa and the number of parenchyma layers in the raphe were more variable and especially useful in delimiting genera and some species. The ontogenetic analysis was essential to propose the primary morphological homology hypotheses for the seed coat characters. Seed coat morphoanatomical features offer a promising source of phylogenetically informative characters for integrative and character evolution approaches for Bromelioideae and possibly other subfamilies of Bromeliaceae.

ADDITIONAL KEYWORDS: *Ananas* – bromeliads – chalazal appendage – monocots – mucilage – seed morphology.

## RESUMO

A morfologia da semente pode fornecer caracteres significativos para a compreensão da diversificação de alguns clados em Bromeliaceae subfamília Bromelioideae, mas pouco se conhece sobre a diversidade anatômica e a ontogenia do envoltório da semente nessa diversa subfamília. Nós analisamos a morfoanatomia do envoltório da semente para 48 espécies de 25 gêneros das principais linhagens de Bromelioideae, das quais nós selecionamos quatro espécies para análises ontogenéticas. Técnicas padrão para microscopia de luz foram adaptadas para o estudo anatômico de sementes. 33 caracteres variáveis foram descritos e comparados. Sementes achatadas ou angulares normalmente exapendiculadas, tégmicas-endotestais, com endotesta espeçada secundariamente e tégmen ondulado ou costado, são características comuns das linhagens sem tanque. Sementes oblongoide-obovoides, apendiculada ou exapendiculadas, exclusivamente tégmicas e mucilaginosas são comuns às Bromelioideae núcleo. Características anatômicas do exotégmen e da testa e número de camadas de parênquima na rafe foram mais variáveis e especialmente úteis na delimitação de gênero e algumas espécies. A análise ontogenética foi essencial para a proposição de hipóteses primárias de homologias morfológicas para as características do envoltório da semente. As características morfoanatômicas do envoltório da semente proporcionam uma fonte promissora de caracteres filogeneticamente informativos para abordagens integrativas e de evolução de caracteres em Bromelioideae e possivelmente outras subfamílias de Bromeliaceae.

**Palavras-chave:** Ananas - bromélias - apêndice calazal - Monocotiledôneas - mucilagem - morfologia da semente.

## Introdução

Bromeliaceae (monocotiledôneas) compreende 83 gêneros e cerca de 3726 espécies (Gouda *et al.*, 2022) de ervas epifíticas, rupícolas, saxícolas, e mesmo reófitas. Elas exibem uma alta diversidade morfológica, ecológica e de habitat, habitando florestas tropicais, savanas, campos rupestres e regiões semiáridas, quase exclusivamente nos Neotrópicos (Smith & Downs, 1974; Givnish *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm focado na morfoanatomia floral e fornecido insights sobre a diversificação morfológica de Bromeliaceae, além de serem úteis no refinamento de interpretações filogenéticas e na delimitação de gêneros e espécies (Nogueira *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2016; Kuhn *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2017; Kuhn *et al.*, 2020). Contudo, apesar da morfologia do fruto e da semente terem sido utilizadas no reconhecimento das subfamílias clássicas (Smith & Downs, 1974), as características anatômicas e ontogenéticas do fruto (Fagundes & Mariath, 2014), e especialmente do embrião e do envoltório da semente, são amplamente negligenciadas na família (Nemirovich-Danchenko, 1985; Magalhães & Mariath, 2012; Silva *et al.*, 2020; Leme *et al.*, 2021; Carvalho & Mariath, 2021a).

Para a maioria das subfamílias atualmente aceitas (Givnish *et al.*, 2007; Givnish *et al.*, 2011), o fruto é uma cápsula septicida/loculicida, com ovário súpero, semi-ínfero ou, menos frequentemente, ínfero, o qual produz sementes plumosas ou aladas que são frequentemente pequenas e adaptadas à dispersão pelo vento (Palací *et al.*, 2004). Bromelioideae é uma exceção, com claras adaptações à zoocoria, sendo caracterizada pelos frutos antocárpicos carnosos (*sensu* Spjut, 1994) de uma flor epígina (Smith & Down, 1974; Silva *et al.*, 2020; Leme *et al.*, 2021). A semente em Bromelioideae difere de outras bromeliáceas por ter uma testa mucilagínosa e efêmera e, quando presente, um

apêndice calazal (raramente micropilar) mucilaginoso (Smith & Down, 1974; Silva *et al.*, 2020; Leme *et al.*, 2021). Além das recentes monografias e outras observações (Smith & Down, 1974; Silva *et al.*, 2020) pouco é sabido sobre a diversidade anatômica da semente em Bromelioideae comparado à diversidade morfoanatômica da flor e inflorescência encontradas na subfamília. Apesar disso, é uma abordagem promissora para esse grupo, uma vez que os caracteres do embrião e da semente são essenciais na compreensão do processo reprodutivo e diversificação de Bromeliaceae, além de fornecer outros dados informativos e frequentemente estáveis filogeneticamente em Bromelioideae (Leme *et al.*, 2021, Leme *et al.*, 2022).

Bromelioideae é a segunda subfamília mais rica em número de espécies em Bromeliaceae, e a mais diversa em termos de gênero, com cerca de 1000 espécies em 41 gêneros (Gouda *et al.*, 2022) de plantas epifíticas, saxícolas ou terrícolas. Sua alta taxa de diversificação é expressa na rica diversidade morfológica que justifica o número de gêneros nessa subfamília (Schulte *et al.*, 2009; Silvestro *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2015; Paule *et al.*, 2020). As relações e delimitação de certos gêneros permanece desafiadora. Dada as recorrentes árvores filogenéticas pouco resolvidas e o alto nível de homoplasia morfológica dos caracteres da flor e da inflorescência (Schulte *et al.*, 2009; Silvestro *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 2015; Paule *et al.*, 2020; Leme *et al.*, 2021), acessadas como base dos métodos taxonômicos tradicionais. Isso tem levado a um uso histórico de conceitos artificiais na delimitação genérica e subgenérica, falhando em explorar o grande potencial morfoanatômico da subfamília. Um exemplo clássico é *Aechmea* Ruiz & Pav., um gênero com 7 subgêneros e mais de 240 espécies, recuperadas como altamente polifilético em análises filogenéticas moleculares, em mais de 12 linhagens independentes (Evans *et al.*, 2015).

Apesar disso, o monofiletismo de Bromelioideae e a existência de dois principais grupos internos são suportados por evidências moleculares e morfológicas (e.g. Schulte *et al.*, 2009; Paule *et al.*, 2020). Bromelioideae núcleo, compreendendo uma linhagem em sua maioria formando tanque (com rosetas que acumulam água), incluem os gêneros da aliança *Aechmea* (*Aechmea*, *Canistrum* É.Morren, *Quesnelia* Gaudich., *Portea* Brongn. ex K.Koch) (Heller *et al.*, 2015), a aliança *Ronnbergia* (*Ronnbergia* É.Morren & André, *Hohenbergia* Schult.f, *Wittmackia* Mez) (Aguirre-Santoro, 2017), o “complexo nidularioide” (*Canistropsis* (Mez) Leme, *Edmundoa* Leme, *Neoregelia* L.B.Sm., *Nidularium* Lem., *Wittrockia* Lindm.) (Leme *et al.*, 2021) e outros gêneros como *Billbergia* Thumb. O segundo maior grupo em Bromelioideae compreende algumas linhagens irmãs, informalmente conhecidas como “sem tanque” (sem rosetas que acumulam água), “cedo-divergentes” ou então “linhagens basais”, inclui os gêneros irmãos de todas as Bromelioideae núcleo, como *Bromelia* L., *Greigia* Regel, *Fascicularia* Mez etc., e outros clados mais inclusivos, incluindo *Ananas* Mill., *Neoglaziovia* Mez e os gêneros do “complexo Cryptanthoide” (e.g. *Cryptanthus* Otto & Dietrich, *Lapanthus* Louzada & Versieux, *Orthophytum* Beer e *Sincoraea* Ule.).

Desde a revisão do “complexo nidularioide” por Leme (1997, 1998, 2000), uma abordagem taxonômica integrativa com a combinação de múltiplos atributos e acesso crítico a caracteres diagnósticos obtidos de espécimes vivos, tem provado ser útil no reconhecimento de grupos monofiléticos e no refinamento da delimitação de gêneros em Bromelioideae (Leme *et al.*, 2017; Leme *et al.*, 2021; Leme *et al.*, 2022). É importante mencionar alguns gêneros propostos recentemente no “complexo cryptanthoide” (i.e. *Forzzaea* Leme, S.Heller & Zizka, *Hoplocryptanthus* (Mez) Leme, S.Heller & Zizka e *Rokautskyia* Leme, S.Heller & Zizka) emergidos de *Cryptanthus* e o amazônico *Hylaeaicum* (Ule ex Mez) Leme, Forzza, Zizka & Aguirre-Santoro, segregado de

*Neoregelia*. Além de vários aspectos morfológicos, se destacam a diversidade morfológica da semente e o potencial uso de seus caracteres na delimitação desses gêneros de Bromelioideae (Leme *et al.*, 2021; Leme *et al.*, 2022).

A anatomia da semente, principalmente do envoltório, em Bromelioideae tem sido relatado para poucas espécies (Smith & Downs, 1974; Rao & Wee, 1979; Silva *et al.*, 2020), e a constituição péctica de testa (de fato uma sarcotesta) foi recentemente confirmado (Silva *et al.*, 2020; Carvalho & Mariath, 2021b; Leme *et al.*, 2021). A fina e delicada sarcotesta forma o apêndice calazal (Leme *et al.*, 2021), a qual é facilmente destruída quando a semente é removida do fruto. O tégmen, assim, constitui a principal camada mecânica e a mais informativa em termos de caracteres, principalmente devido aos padrões de espessamento secundário do exotégmen (Smith & Downs, 1974; Silva *et al.*, 2020; Leme *et al.*, 2021; Carvalho & Mariath, 2021b). No entanto, a hipótese de sementes exclusivamente tégmicas em Bromelioideae (Silva *et al.*, 2020) é refutada pela presença de uma endotesta possivelmente lignificada em algumas espécies de *Ananas* e *Bromelia* (Nemirovich-Danchenko, 1985; Carvalho & Mariath, 2021b), indicando uma diversidade anatômica da semente maior que previamente relatado. Carvalho & Mariath (2021b) avaliaram alguns representantes das principais espécies de Bromelioideae, indicando a presença de sementes tégmico-testais na subfamília. Contudo, a diferenciação do envoltório da semente permanece desconhecida na subfamília, embora certas correlações são reconhecidas quando as camadas da semente maduras são comparadas com aquelas do rudimento seminal (Nogueira *et al.*, 2015, Silva *et al.*, 2020).

Sendo a semente uma estrutura chave para reprodução e diversificação, ela pode fornecer caracteres significativos para o entendimento da evolução morfológica de Bromelioideae. Os principais objetivos desse trabalho são explorar os potenciais caracteres filogeneticamente/taxonomicamente informativos e alguns aspectos

histoquímicos do envoltório da semente em Bromelioideae e avaliar a homologia morfológica entre os tegumentos do rudimento seminal e as camadas do envoltório da semente, através de uma análise ontogenética e anatômica. Para esse propósito, amostrou-se 48 espécies de 25 gêneros de Bromelioideae, representando as linhagens núcleo e sem tanque, e acompanhou-se a diferenciação do envoltório da semente em quatro espécies. Este trabalho é nossa primeira contribuição aos dados morfoanatômicos da semente em Bromeliaceae; combinados com outras abordagens, esta melhorará nossa compreensão da história evolutiva da família.

## **Material e Métodos**

### *Amostragem*

As espécies analisadas e números de acesso ou voucher de herbário estão listados em Tabela 1. As espécies foram coletadas nas maiores coleções vivas de Bromeliaceae no Brasil, e determinadas pelos especialistas responsáveis por cada coleção, além de coletas em populações naturais, determinadas pelo primeiro autor. Utilizou-se amostras frescas das coleções privadas de Elton M. C. Leme (Refúgio dos Gravatás, Teresópolis, Rio de Janeiro) e Jones Caldas da Silva (Planeta Bromélia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul), a coleção de Bromeliaceae do Jardim Botânico de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, e a coleção de Bromeliaceae do Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As descrições morfológicas foram baseadas em amostras frescas exceto para *Fernseea itatiaiae* (Wawra) Baker e *Neoglaziovia variegata* (Arruda) Mez, das quais as sementes foram obtidas de material herborizado do Herbário RB.

**Tabela 1.** Espécies amostradas, números de acesso e voucher de herbário

Espécies	Número de acesso ou voucher de herbário
<i>Acanthostachys strobilacea</i> (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto	HAS 19778
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Rudge) Baker	HAS 3962
<i>Aechmea castelnavii</i> Baker	Leme 9137 (HB)
<i>Aechmea distichantha</i> Lemaire	HAS 31718; HAS 66115
<i>Aechmea gamosepala</i> Wittmack	BROM 00503; BROM 00543
<i>Aechmea recurvata</i> (Klotzsch) L.B. Sm.	BROM 00149; BROM 00150
<i>Aechmea strobilina</i> (Beurl.) L.B. Sm. & Read	Leme 9498 (HB)
<i>Aechmea tocantina</i> Baker	Leme 143 (HB)
<i>Ananas ananassoides</i> (Baker) L.B. Sm.	HB 75293
<i>Ananas nanus</i> (L.B. Sm.) L.B. Sm.	BROM 00420
<i>Ananas paraguayensis</i> Camargo & L.B.Sm.	Leme 9479 (HB)
<i>Araeococcus micranthus</i> Brongniart	Leme 2582 (HB)
<i>Araeococcus goeldianus</i> L.B. Sm.	Leme 9507 (HB)
<i>Billbergia nutans</i> H. Wendl. ex Regel	ICN 190645; ICN 190646
<i>Billbergia zebrina</i> (Herb.) Lindley	ICN 155293
<i>Bromelia antiacantha</i> Bertoloni	ICN 185360
<i>Bromelia balansae</i> Mez	BROM 00350
<i>Bromelia karatas</i> Linnaeus	Gutierrez 8762
<i>Canistropsis billbergioides</i> (Schult. f.) Leme	ICN 177180
<i>Canistrum aurantiacum</i> E. Morren	BROM 00677
<i>Canistrum montanum</i> Leme	Leme 9855 (HB)
<i>Cryptanthus colnagoi</i> Rauh & Leme	Leme 9154 (HB)
<i>Cryptanthus pickelii</i> L.B. Sm.	Leme 9665 (HB)
<i>Edmundoa ambigua</i> (Wand. & Leme) Leme	HAS 33934
<i>Edmundoa lindenii</i> (Regel) Leme	ICN 185361
<i>Fernseea itatiaiae</i> (Wawra) Baker	RB 330827
<i>Greigia sphacelata</i> (Ruiz & Pav.) Regel	Montero 7993
<i>Hohenbergia augusta</i> (Vell.) E. Morren	HAS 36040
<i>Hohenbergia stellata</i> Schult. f.	Leme 6308 (HB)
<i>Hoplocrypanthus glaziovii</i> (Mez) Leme, S. Heller & Zizka	Leme 4348/1545 (HB)
<i>Hylaeicum levianum</i> (L.B. Sm.) Leme & Forzza	Leme 5639-A (HB)
<i>Karawata gustavoii</i> (J.A.Siqueira & Leme) J.R. Maciel & G.M. Sousa	Leme 4652 (HB)
<i>Neoglaziovia variegata</i> (Arruda) Mez	RB 391489; RB 542666
<i>Neoregelia compacta</i> (Mez) L.B. Sm.	Leme 5744 (HB)

<i>Neoregelia johannis</i> (Carrière) L.B. Sm.	ICN 190905
<i>Neoregelia retrorsa</i> Leme & L. Kollmann	Leme 7371 (HB)
<i>Nidularium amazonicum</i> (Baker) Lindm. & E. Morren	BROM 00282; BROM 00787
<i>Nidularium innocentii</i> Lemaire	ICN 190908
<i>Orthophytum leprosum</i> (Mez) Mez	Leme 9539 (HB)
<i>Orthophytum pseudovagans</i> Leme & L. Kollmann	Leme 7028 (HB)
<i>Orthophytum saxicola</i> (Üle) L.B. Sm.	BROM 00661
<i>Portea petropolitana</i> (Wawra) Mez	BROM 00693
<i>Quesnelia liboniana</i> (De Jonghe) Mez	HAS 36084
<i>Quesnelia quesneliana</i> (Brongn.) L.B. Sm.	BROM 00882
<i>Rokautskyia pseudoglazioui</i> (Leme) Leme, S. Heller & Zizka	Leme 1556 (HB)
<i>Rokautskyia whitmanii</i> (Leme) Leme, S. Heller & Zizka	Leme 5208 (HB)
<i>Ursulaea tuitensis</i> (Magana & E.J. Lott) Read & Baensch	ICN 203090
<i>Wittrockia superba</i> Lindman	ICN 190904

### *Preparação para microscopia de luz*

Todas as análises anatômicas foram realizadas no LAVeg (UFRGS). Frutos e sementes frescas foram fixadas em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965), modificada por McDowell & Trump (1976) (glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, em pH 7,2) com uma gota de detergente Tween20 (cerca de 10%) diluído em água e mantido sob baixo vácuo por 24 horas. Após, o material foi lavado no mesmo tampão, desidratado em uma série crescente de etanol (10-100%) (v/v), sob um baixo vácuo novamente quando em etanol 70 e 100% (1 hora). Finalmente, o material foi incluído em resina 2-hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid, 1983), depois de uma fase intermediária de pré-inclusão em etanol absoluto resina (1:1). Devido à dificuldade em incluir as sementes, antes da polimerização, o material foi mantido em resina pura por 7 dias, após sendo mantido em freezer (24 horas) com catalisador (Paiva *et al.*, 2011). As sementes não passaram por qualquer procedimento de amolecimento e foram

delicadamente agitadas durante o processamento para preservar as características celulares da sarcotesta. O material herborizado foi reidratado com uma solução de água destilada: etanol 96°GL: glicerina (5:4:1) com 5 gotas de detergente Tween20, submetidas a baixo vácuo por 1 hora e mantidas em uma estufa a 60°C por 48-72 horas. Depois deste período, o material foi desidratado em etanol (40-100%) e incluído em resina acrílica, como o material fresco. Seções transversais e algumas longitudinais (4-6 µm) das sementes foram realizadas usando micrótomo de rotação Zeiss Microm HM 340 E e Leica 2265. Seções transversais foram priorizadas por fornecer as principais características anatômicas. As seções foram depositadas em lâminas histológicas e secadas em uma chapa aquecedora a 50°C. Para a observação sob microscopia de luz, as seções de sementes maduras foram coradas com Azul de Toluidina O (0,05%), modificada por O'Brien *et al.* (1964) (pH 7,2 em tampão fosfato de sódio). Água ou óleo de imersão foram utilizados como meios de montagem temporários para manter as propriedades metacromáticas (O'Brien *et al.*, 1964), e as lâminas não foram aquecidas após este período. Para detecção de mucilagem, as seções foram coradas com Vermelho de Rutênio (Johansen, 1940), e para proteínas Xylidine Ponceau (Vidal, 1970). Seções a mão livre, material fresco ou fixado foram utilizados para detecção de lipídeos totais com Sudan III (Johansen, 1940) e lignina com floroglucinol/HCl modificada de Johansen (1940) (floroglucinol 1% em etanol 95% (v/v) + algumas gotas de HCl 30%).

A análise e registro das imagens foram realizadas utilizando microscópio Leica DMR, com câmera digital AxioCam HRC Zeiss, utilizando o programa de captura de imagem Axiovision SE 64 v.4.9.1. As figuras foram tratadas utilizando Photoshop™ v.14.0x64 apenas na limpeza e homogeneização do fundo sem mudanças no parâmetro de cor das imagens.

### *Ontogenia do envoltório da semente*

Quatro espécies de Bromelioideae com morfologias da semente distintas foram escolhidas para análise ontogenética do envoltório da semente: três representantes de Bromelioideae núcleo (*Acanthostachys strobilacea* (Schult.f.) Link, Klotzsch & Otto, *Billbergia nutans* H.Wendl. ex Regel e *Edmundoa lindenii* (Regel) Leme) e uma representante das linhagens sem tanque (*Bromelia antiacantha* Bertoloni). As espécies analisadas foram polinizadas manualmente para garantir a produção de sementes e monitoradas durante o desenvolvimento do fruto. O material em diferentes fases de desenvolvimento foi processado seguindo os mesmos passos da semente madura. As fases ilustradas foram obtidas a partir da observação da endospermogênese, seguindo as etapas propostas por Carvalho & Mariath (2021a) como marcas ontogenéticas da diferenciação dos tegumentos do rudimento seminal nas camadas do envoltório da semente. As fases utilizadas como marcadores da diferenciação foram: (1) semente imatura logo após a fecundação; (2) diferenciação do envoltório da semente na antirrafe; (3) o envoltório da semente nas fases nucleares da endospermogênese; (4) envoltório da semente nas fases celulares da endospermogênese; (5) envoltório da semente na diferenciação final e espessamento (endosperma maduro); e (6) envoltório da semente na semente madura.

### *Terminologia*

A terminologia e conceitos adotados na descrição anatômica segue Corner (1976) com algumas adaptações para as variações encontradas neste estudo. Os seguintes conceitos relativos ao envoltório da semente foram utilizados para evitar más interpretações terminológicas: (1) testa: o tegumento externo desenvolvido, formado por

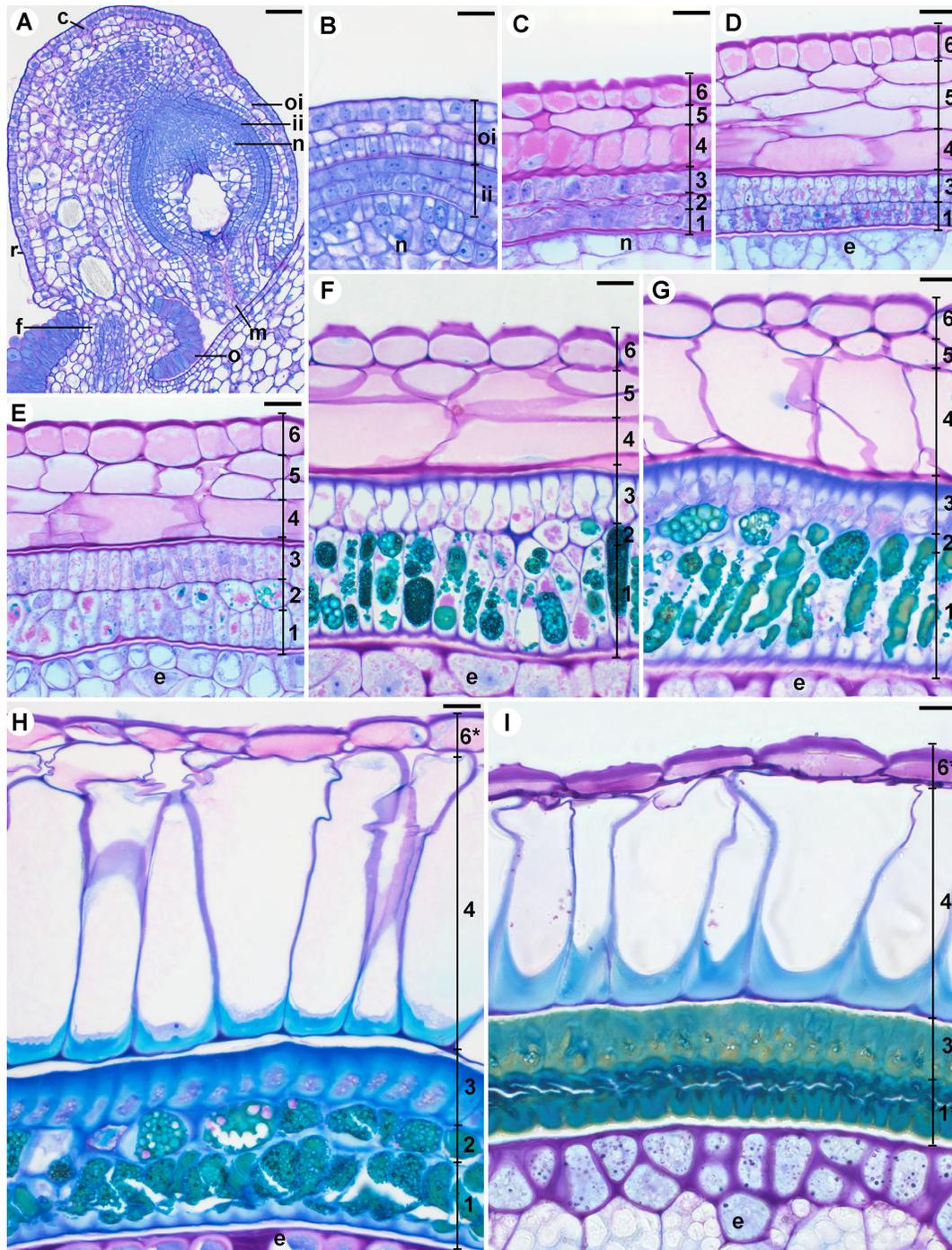
endotesta, mesotesta e exotesta (camadas interna, intermediária e externa); (2) tégmen: o tegumento interno desenvolvido, formado por endotégmen, mesotégmen e exotégmen (camadas interna, intermediária e externa); (3) rafe: a região formada pelo funículo e envoltório fusionados em sementes anátropas; e (4) antirrafe: a região oposta à rafe.

## **Resultados**

### *Ontogenia do envoltório da semente*

As sementes das espécies analisadas se desenvolvem a partir de um rudimento seminal bitégmico, anátropo e crassinucelado (Fig. 1A). As células epidérmicas do curto funículo e da placenta constituem o obturador (Fig. 1A).

Em *Bromelia antiacantha*, o tegumento interno na antirrafe possui duas camadas contínuas e uma camada mediana descontínua, aumentando o número de camadas na região micropilar (Fig. 1A-B). No endotégmen, após as fases iniciais de diferenciação (Fig. 1B-D) as paredes anticlinais se alongam cerca de três vezes mais que no exotégmen, quando a epiderme do endosperma já está diferenciada (Fig. 1E-G). Nesse ponto, a espessura do endosperma excede a da testa. Nessa fase, as células do endotégmen começam a acumular compostos fenólicos em vacúolos (Fig. 1E-G). Ao mesmo tempo, as células do endotégmen desenvolvem espessamentos secundários nas paredes periclinais internas e na base das paredes anticlinais, em forma de U basal (Fig. 1F-I). O mesotégmen é descontínuo e desenvolve células isodiamétricas irregularmente espessadas que começam a acumular compostos fenólicos com o endotégmen (Fig. 1E-H). Durante a diferenciação final, o endotégmen e mesotégmen são gradualmente comprimidos, até que o conteúdo celular não seja mais reconhecido (Fig. 1H-I).



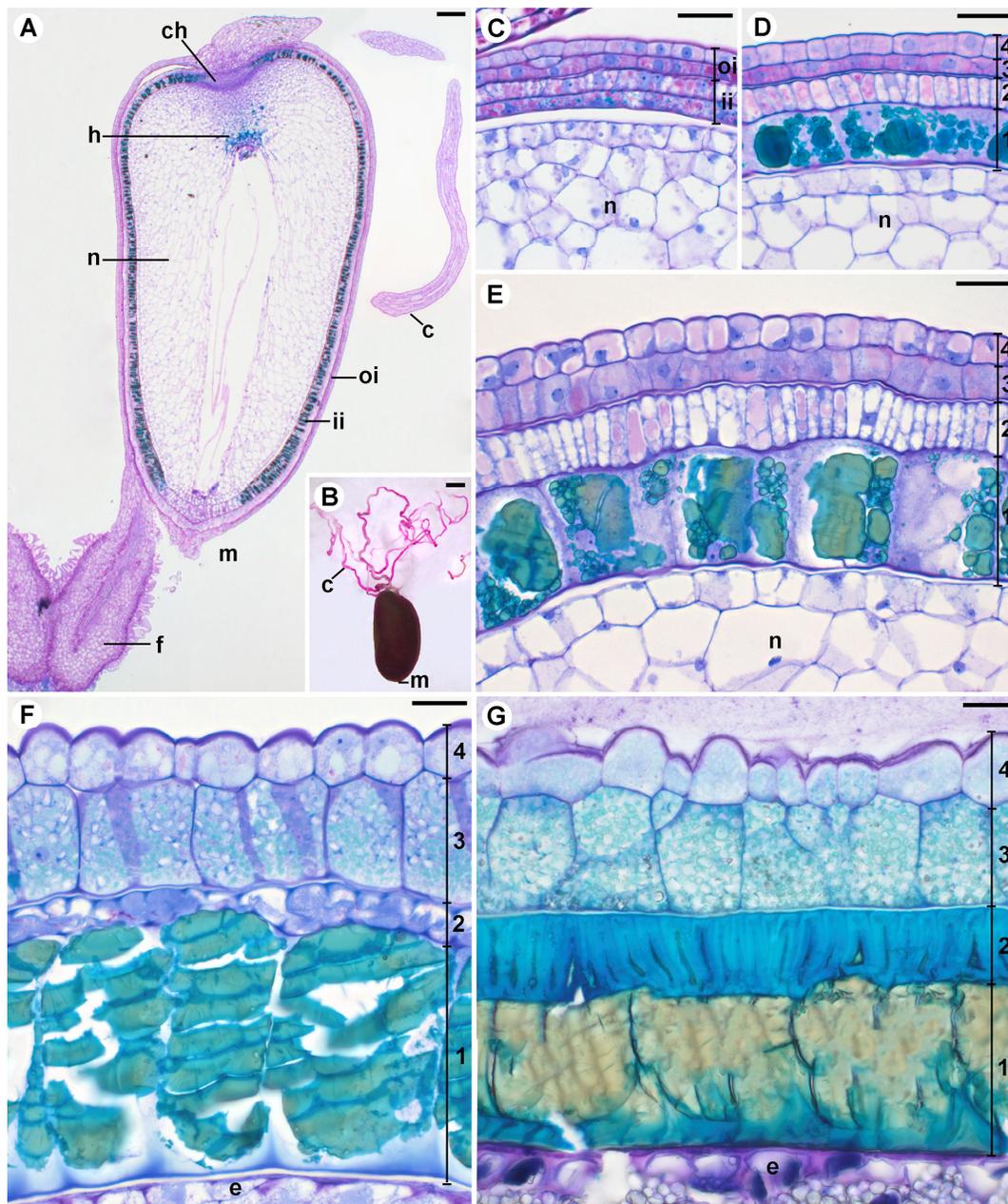
**Figura 1.** Ontogenia do envoltório da semente em *Bromelia antiacantha*. A: semente imatura, logo após a fecundação, em seção longitudinal. B-I: diferenciação do envoltório na antirrafe. B-C: envoltório em fases nucleares da endospermogênese. D-E: envoltório em fases celulares da endospermogênese. G-H: envoltório em diferenciação final e espessamento. I: envoltório na semente madura. c: calaza; e: endosperma; f: funículo; ii: tegumento interno; m: micrópila; n: nucelo; o: obturador; oi: tegumento externo; r: rafe. Os números indicam as camadas do envoltório em diferenciação. 1: endotégmen; 2: mesotégmen; 3: exotégmen; 4: endotesta; 5: mesotesta; 6: exotesta; 1\*: endotégmen + mesotégmen comprimidos; 6\*: exotesta + mesotesta colapsada. Barras: A: 50 µm; B-I: 20 µm.

O exotégmen inicia a deposição de parede celular secundária nas paredes periclinais externas e no ápice das paredes anticlinais (Fig. 1F-G, camada 3), na mesma fase que o endotégmen. Subsequentemente, as paredes periclinais internas e anticlinais são também espessadas, resultando em um padrão de espessamento assimétrico, porém contínuo (Fig. 1H-I). Compostos fenólicos são percebidos no interior dessas células quando elas já estão espessadas. Durante essas fases, forma-se uma espessa cutícula externamente às paredes periclinais externas do exotégmen e nas paredes periclinais internas das células no endotégmen.

O tegumento externo tem 3 a 4 camadas de células, aumentando o número de camadas na região micropilar (Fig. 1A-B). Após a fecundação, as células do tegumento externo passam a acumular substâncias pécticas e aumentam de volume, diferenciando a exotesta precocemente pelas paredes periclinais externas espessadas em fases iniciais de desenvolvimento (Fig. 1C, camada 6). A exotesta mantém-se acumulando pectinas e o espessamento primário até as fases finais de diferenciação do envoltório (Fig. 1H-I). As células na mesotesta inicialmente aumentam de volume (Fig. 1B-G, camada 5) mas são progressivamente comprimidas até as fases finais de diferenciação, quando elas não são mais notadas (Fig. 1I). A camada interna diferencia na endotesta, cujas células continuam a aumentar de volume até fases finais da diferenciação (Fig. 9C-G, camada 4), quando elas desenvolvem espessamento secundário nas paredes periclinais internas e na base das paredes anticlinais, em um padrão em formato de U (Fig. 1H-I, camada 4).

A semente de *Acanthostachys strobilacea* se alonga no eixo da rafe logo após a fecundação. O funículo é curto e produz mucilagem pelo obturador (Fig. 2A). Um longo apêndice calazal (Fig. 2A-B) ocorre desde fases iniciais do desenvolvimento da semente, aparentemente sendo produzido por um meristema intercalar na calaza (Fig. 2A). Na

semente madura, o apêndice tem vários milímetros de comprimento (Fig. 2B) e é elástico (pode ser esticado em vários centímetros).



**Figura 2.** Ontogenia do envoltório da semente em *Acanthostachys strobilacea*. A: semente imatura em seção longitudinal, endosperma nuclear inicial. B: semente madura sob estereomicroscopia, mostrando o longo apêndice calazal (corado com Vermelho de Rutênio). C-G: diferenciação do envoltório na antirrafe. D-E: envoltório nas fases nucleares da endospermogênese. F: envoltório na fase nuclear da endospermogênese. G: envoltório em diferenciação final em espessamento. H: envoltório na semente madura. c: calaza (com tecido meristemático); ca: apêndice calazal; e: endosperma; f: funículo; h: hipóstase; ii: tegumento interno; m: micrópila; mu: mucilagem; n: nucelo; o: obturador; oi: tegumento externo; r: rafe. Os números indicam as camadas do envoltório em desenvolvimento. 1: endotégmen; 2: exotégmen; 3: endotesta; 4: exotesta. Barras: A: 200  $\mu$ m; B: 1 mm; C-G, 25  $\mu$ m

O tegumento interno possui duas camadas de células, exceto na região micropilar onde há mais camadas. Elas se diferenciam precocemente no tégmen, principalmente pelo endotégmen, que acumula compostos fenólicos em vacúolos logo após a fecundação, exceto na região micropilar (Fig. 2A). As células do endotégmen aumentam de volume cerca de três vezes mais que o exotégmen ao longo do desenvolvimento, até elas desenvolverem espessamentos secundários em um padrão U basal, quando começam a ser comprimidas (Fig. 2C-E). O exotégmen inicialmente desenvolve espessamentos secundários nas paredes periclinais externas, desenvolvendo, mais tarde, espessamentos nas outras paredes (Fig. 2E-F). As células do exotégmen maduro têm lúmen reduzido a fendas anticlinais, que acumulam compostos fenólicos (Fig. 2F). Durante o desenvolvimento do tégmen, uma cutícula está presente nas paredes periclinais externas do exotégmen e internamente às paredes periclinais internas das células do endotégmen (Fig. 2F).

O tegumento externo tem duas camadas de células e inicialmente acumula substâncias pécticas (Fig. 2A-D). Nas primeiras fases de diferenciação, há muitas divisões celulares, principalmente anticlinais, tanto na camada interna quanto na externa da testa em diferenciação (Fig. 2C-E). A testa em diferenciação permanece mais delgada que o tégmen, até as fases finais de diferenciação. Apenas as paredes periclinais externas da exotesta são espessadas, porém primariamente. A endotesta aumenta em volume apenas nas fases finais de diferenciação, mas não desenvolve espessamento (Fig. 2C-F). Uma granulação intensa pode ser percebida no citoplasma da endo e exotesta na diferenciação final (Fig. 2E-F), devido ao abundante acúmulo de lipídeos em ambas as camadas (Fig. 8G). Mucilagem se acumula nas paredes externas da exotesta e nos lóculos do ovário (Fig. 2A, G).

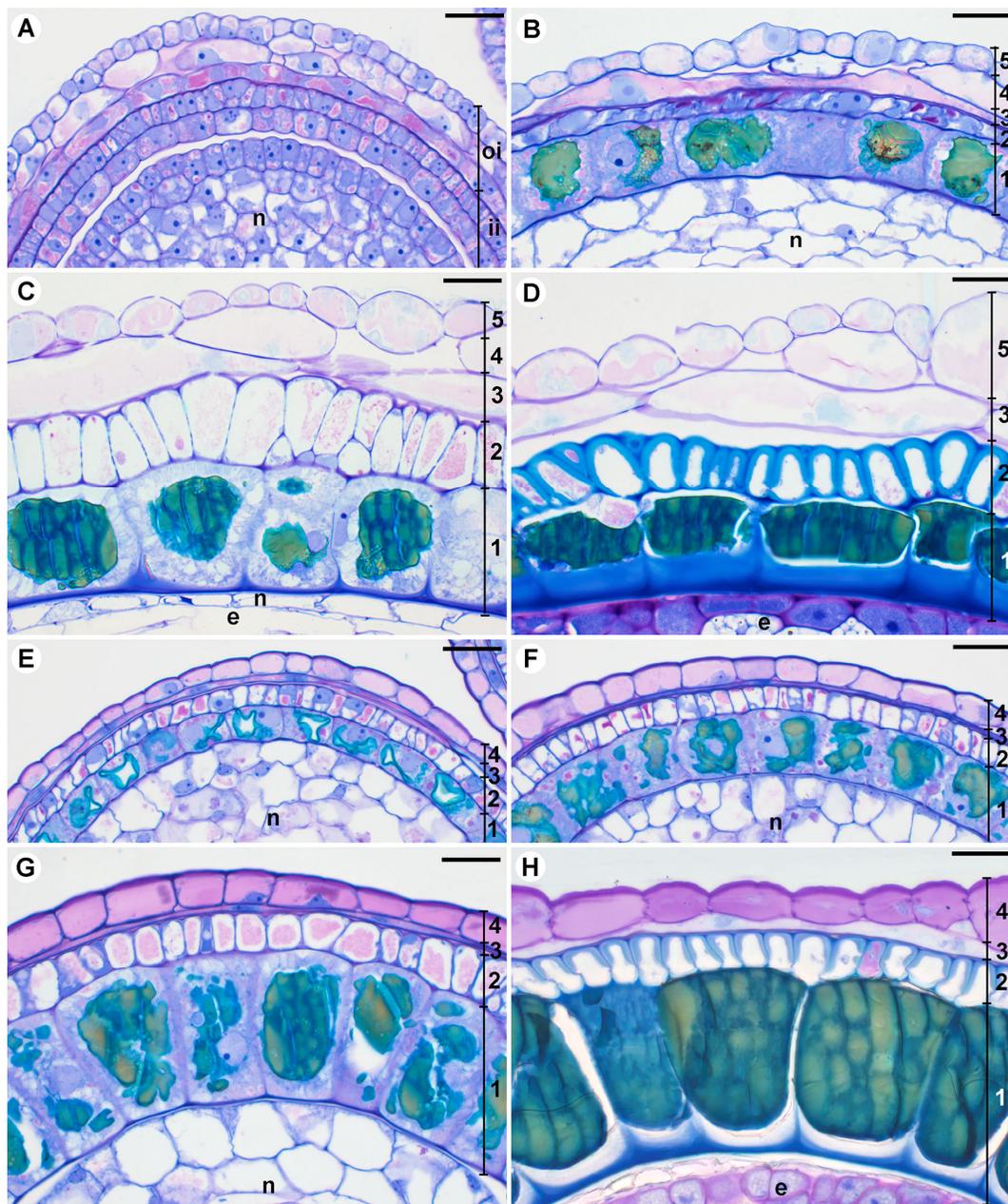
O tegumento externo em *Billbergia nutans* possui duas a três camadas de células, e o tegumento interno duas camadas na região antirrafeal (Fig. 3A-D). No tégmen, as células do endotégmen começam a acumular compostos fenólicos logo após a fecundação (Fig. 3B) desenvolvendo espessamento em forma de U, nas fases finais de diferenciação (Fig. 3C-D). As células no exotégmen passam por vacuolação e aumentam de volume desenvolvendo, então, espessamentos secundários com pares de pontoação nas paredes anticlinais (Fig. 3D). Essas camadas são comprimidas com a maturação da semente, mas é possível visualizar os lúmens celulares no exotégmen. A testa diferencia-se após vacuolação e aumento no volume celular, tanto na exotesta quanto na endotesta (Fig. 3A-D). Ambas acumulam pectinas no citoplasma, especialmente em fases iniciais da diferenciação celular, mas não desenvolvem qualquer tipo de espessamento, primário ou secundário (Fig. 3D).

Os tegmentos interno e externo em *Edmundoa lindonii* possuem duas camadas celulares cada na região antirrafeal (Fig. 3E-H). O tégmen se diferencia com o acúmulo de compostos fenólicos e aumento no comprimento radial das células do endotégmen, cerca de quatro vezes o do exotégmen (Fig. 3F-H). O endotégmen desenvolve espessamentos secundários em um padrão em formato de U basal nas fases finais de diferenciação do envoltório (Fig. 3G-H). As células do exotégmen tornam-se espessadas próximas à testa desenvolvendo espessamento especialmente nas paredes periclinais externas e no ápice das paredes anticlinais, em um padrão em forma de U invertido (Fig. 3H).

Na camada interna do tegumento externo as células são estreito-fusiformes em seção transversal, desde fases iniciais de diferenciação até a maturidade da semente, quando elas podem estar ausentes (Fig. 3E-H). A exotesta desenvolve-se aumentando o

volume celular e acumulando pectinas durante todo o desenvolvimento do envoltório.

Essa camada tem espessamentos primários nas paredes periclinais externas (Fig. 3H).

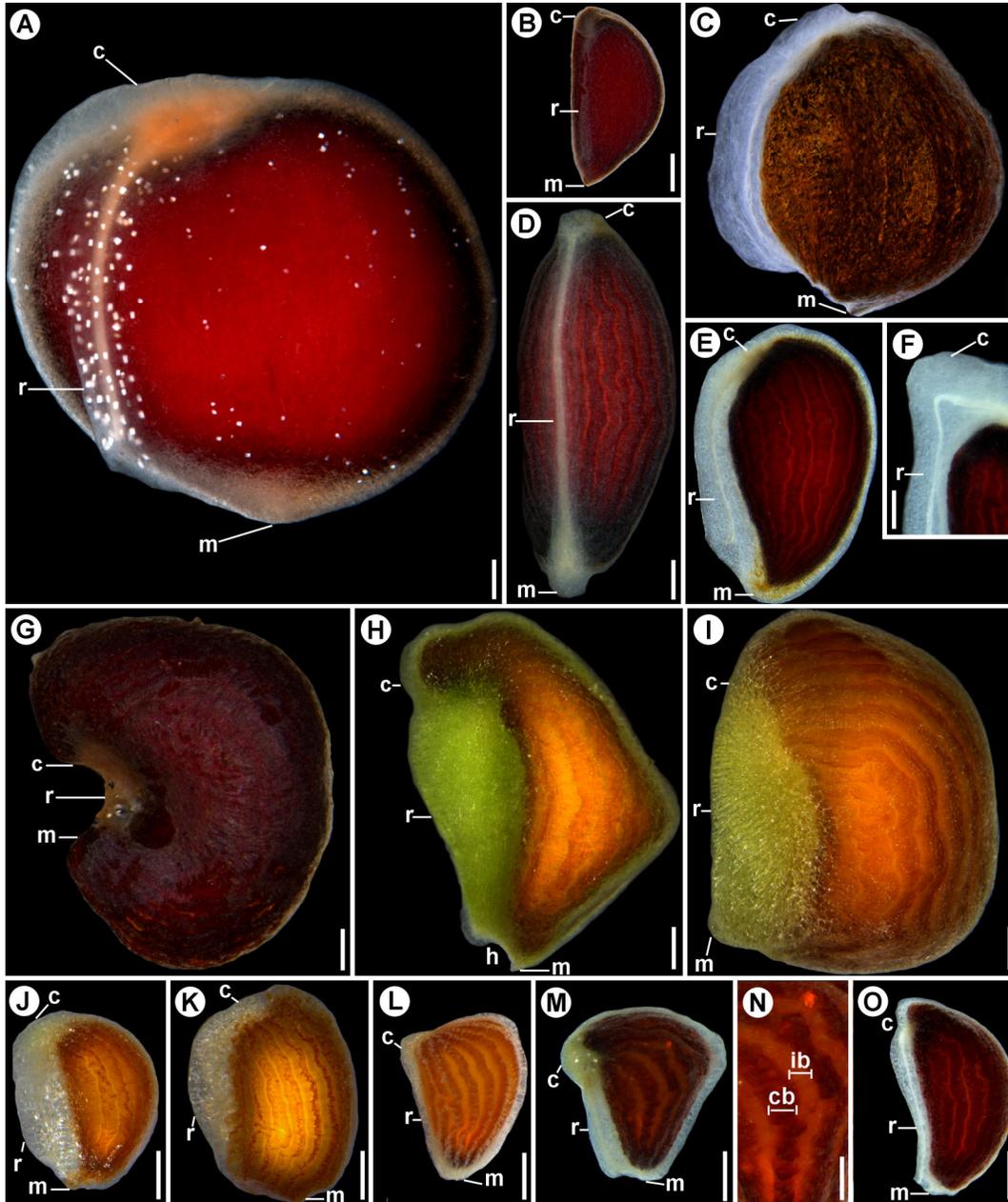


**Figura 3.** Ontogenia do envoltório da semente em *Billbergia nutans* e *Edmondoa lindenii*. A-H: diferenciação do envoltório na região antirrafeal. A-D: *Billbergia nutans*. E-H: *Edmondoa lindenii*. A, B, E, F: envoltório em fases nucleares da endospermogênese. C, D, H: envoltório na semente madura. G: envoltório na fase inicial da celularização do endosperma. e: endosperma; ii: tegumento interno; n: nucelo; oi: tegumento externo. Os números indicam as camadas do envoltório em desenvolvimento. 1: endotégmen; 2: exotégmen; 3: endotesta; 4: mesotesta; 5: exotesta. Barras 25 µm.

## Morfologia

Representantes das linhagens sem tanque (Fig. 4A-O) podem ter sementes discoides e lateralmente achatadas (Fig. 4A), obovoides ou ovoides e lateralmente achatadas (Fig. 4B, C, E, F) ou angulares, obovoides a ovoides (Fig. 4H-O). O comprimento da semente é geralmente menor que duas vezes a largura. *Ananas parguazensis* Camargo & L.B.Sm. é a única espécie com sementes alongadas, cilíndricas com extremidades agudas (Fig. 4D). *Neoglaziovia variegata* (Fig. 4G) é a única espécie com sementes reniformes e angulosas. Em todas as espécies analisadas, o envoltório externo da semente é normalmente translucido ou branco e o envoltório interno amarelo ocre a marrom escuro. Exceto nas espécies de *Bromelia*, *Fernseea itatiaiae* e *Greigia sphacelata* (Ruiz & Pav.) Regel (Fig. 4A-C), há bandas ou faixas arranjadas longitudinalmente, aparentemente, nas camadas internas do envoltório (Fig. 4D-O). Bandas de cores claras em baixo relevo (aqui tratadas como bandas intercostais) alternam-se com bandas mais protuberantes, escuras e normalmente mais largas (bandas costais). As bandas costais e intercostais têm aproximadamente a mesma largura apenas em *Hoplocrypanthus glaziovii* (Mez) Leme, S.Heller & Zizka e *Orthophytum leprosum* (Mez) Mez (Fig. 4L-N). A rafe é translúcida, mucilagínosa (efêmera) e linear (Fig. 4A-E, L-O), exceto por *Neoglaziovia variegata* e espécies de *Cryptanthus* e *Rokautskyia*, com rafes desenvolvidas, suculentas (persistentes) e globosas ou convexas (Fig. 4G-K). A rafe é verde apenas nas espécies de *Cryptanthus* (Fig. 4H-I). O apêndice calazal é geralmente inconspícuo ou curto (cônico) (Fig. 4L-M), apenas levemente destacado da rafe, exceto por *Ananas ananassoides* (Baker) L.B.Sm. com um apêndice calazal cônico e conspícuo (Fig. 4F). A região micropilar é sempre coberta pelo envoltório externo, embora seja visível a participação do envoltório interno na sua formação. A região micropilar é

normalmente mais estreita que a região calazal. O funículo não é persistente na semente madura e o hilo corresponde a uma depressão adjacente à micrópila, praticamente imperceptível na maioria das espécies (Fig. 4H).



**Figura 4.** Morfologia da semente em representantes das linhagens sem tanque de Bromelioideae. A: *Bromelia antiacantha*. B: *Fernseea itatiaiae*. C: *Greigia sphacelata*. D: *A. parguazensis*. E: *A. nanus*. F: *Ananas ananassoides* (detalhe do apêndice calazal). G: *Neoglaziovia variegata*. H: *Cryptanthus colnagoi*. I: *C. pickelii*. J: *Rokautskyia whitmanii*. K: *R. pseudoglazioui*. L: *Hoplocryptanthus glazioui*. M-N: *Orthophytum leprosum*. N: detalhe das bandas tégmicas. O: *O. pseudovagans*. c: região calazal ou apêndice; cb: banda costal; h: hilo; hy: hipóstase; ib: banda intercostal; m: região micropilar; r: rafe. Barras: 0.5 mm.

Representantes das Bromelioideae núcleo têm sementes alongadas ou longo-obovoides, geralmente com o comprimento maior que duas vezes a largura (Fig. 5A-V). A presença de um apêndice calazal é frequente, o qual pode ter vários milímetros ou ser inconspícuo. O apêndice calazal é formado exclusivamente pelo envoltório externo, e assim, tem as mesmas características deste (Fig. 5A-V). Quando conspícuo, ele pode ser longo-cilíndrico, linear ou curvado (Fig. 5A, F, G, K, T-V), longo-laminar e emaranhado (Fig. 5B), circinado (Fig. 5E), lateralizado e curto-laminar (Fig. 5H) ou apical e curto-laminar (Fig. 5Q). Quando inconspícuo, ele é cônico ou vestigial (Fig. 5C, D, I, J, L-P, R-SE). Com relação à forma, o apêndice calazal é delicado, perdendo sua forma original quando desidratado. Este usualmente não tem ornamentações, exceto por *Aechmea tocantina* Baker (Fig. 5E, cabeça de seta) e nas espécies de *Araeococcus* Brongn. (Fig. 5F, G, cabeça de seta), com papilas ou projeções como tricomas na sua superfície. O envoltório externo é mucilaginoso, translúcido ou branco, delicado e efêmero na maioria das espécies. Ele é estriado apenas em *Aechmea tocantina* (Fig. 5E) e é colorido apenas em *Nidularium innocentii* Lem. (vermelho por um curto período) (Fig. 5N) e *Quesnelia liboniana* (De Jonghe) Mez (verde) (Fig. 5R). O envoltório interno varia de amarelo ocre a marrom escuro, sendo persistente e podendo uma cor mais clara na região micropilar (e.g. Fig. 5C, D, Q, T). A rafe pode ser retilínea ou curvada, normalmente mucilaginoso (efêmera) e pode ser ligeiramente destacada ou mais desenvolvida que a antirrafe (Fig. 5A-K). O apêndice micropilar é normalmente inconspícuo, de fato apenas uma extensão do envoltório externo na região micropilar e uma pequena extensão da rafe (Fig. 5A-J, L-O, R-V). Um apêndice micropilar conspícuo é raro, ocorrendo apenas em *Wittrockia superba* Lindm. (Fig. 5P), *Canistrum aurantiacum* É.Morren (Fig. 5Q), e *Hylaeaicum levianum* (L.B.Sm.) Leme & Forzza (Fig. 5K) sendo formado predominantemente pelo funículo, concrescente com uma pequena extensão micropilar do envoltório externo. O

funículo é persistente na semente madura apenas nessas espécies e o hilo é imperceptível na maioria das espécies, com raras exceções como *Billbergia zebrina* (Herb.) Lindl. (Fig. 5H).



**Figura 5.** Morfologia da semente em representantes de Bromelioideae núcleo. A: *Aechmea castelnavii*. B: *A. bromeliifolia*. As sementes são unidas pela testa e apêndice calazal. C: *A. gamosepala*. D: *A. recurvata*. E: *A. tocantina*. F: *Araeococcus micranthus*. G: *Ar. goeldianus*. H: *Billbergia zebrina*. I: *B. nutans*. J:

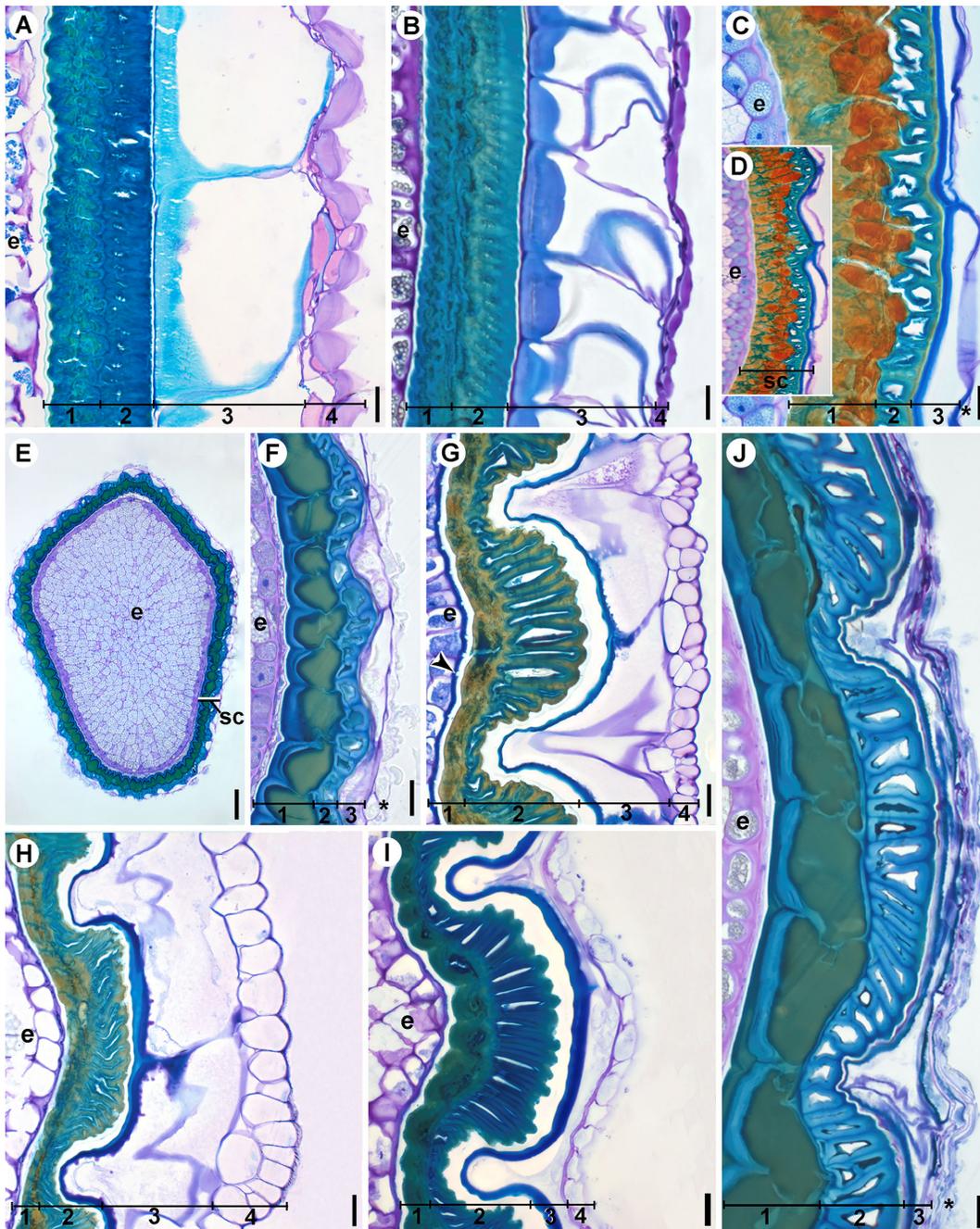
*Ursulaea tuitensis*. K: *Hylaeicum levianum*. L: *Canistroopsis billbergioides*. M: *Neoregelia retrorsa*. N: *Nidularium innocentii*. O: *Edmundoa lindenbergii*. P: *Wittrockia superba*. Q: *Canistrum aurantiacum*. R: *C. montanum*. S: *Quesnelia liboniana*. T: *Hohenbergia stellata*. U: *Hohenbergia augusta*. V: *Portea petropolitana*. Cabeça de seta: tricomas no apêndice calazal. c: apêndice calazal; f: funículo; h: hilo; m: região micropilar; r: rafe. Barras: 0,5 mm.

### *Anatomia da antirrafe*

A antirrafe nas linhagens sem tanque possui tégmen com duas camadas celulares. Ela é representada pelo exotégmen e endotégmen, ambos com células com espessamento secundário, raramente ocorrendo um mesotégmen descontínuo (Fig. 6A-J; 7A-I). As células do endotégmen são frequentemente comprimidas, onde os lúmens não são observados na maioria das espécies (Fig. 6A, B, G-I). As células do endotégmen possuem espessamentos em forma de U basal em todas as espécies de *Bromelia* analisadas (Fig. 6A-B), em forma de V em *Greigia sphacelata* (Fig. 6C, D; 11I) e em forma de U basal ou placa basal (Fig. 6G-J) em outras espécies. Em *Fernseea itatiaiae* (Fig. 6E, F) e nas espécies de *Cryptanthus* (Fig. 7H-I) o padrão em forma de U basal é observado, mas as paredes celulares anticlinais não são comprimidas como nas espécies de *Bromelia* (Fig. 6A-B). Quando distinguível, o mesotégmen é formado por células isoladas ou por uma camada descontínua (Fig. 6B), que se torna contínua e múltipla na região rafeal apenas nas espécies de *Cryptanthus* (veja na seção Rafes e apêndice calazal).

O exotégmen constitui uma camada com células regularmente arranjadas apenas nas espécies de *Bromelia* (Fig. 6A-B). Em *Greigia sphacelata* (Fig. 6C-D) e *F. itatiaiae* (Fig. 6E-F) o exotégmen é ondulado e formado por células que não variam muito em volume. Em *G. sphacelata* as ondulações são irregulares, sem um número fixo de células em cada costela e sulco (Fig. 6D), diferente de *F. itatiaiae*, em que sulcos ocorrem regularmente a cada cinco ou seis células (Fig. 6E-F). Em todas as outras espécies, o exotégmen mostra uma alternância entre células de maior ou menor volume ou

comprimento radial em seção (Fig. 6G-J; 7A-I), o qual corresponde às bandas costais e intercostais anteriormente descritas (Fig. 4C-N).



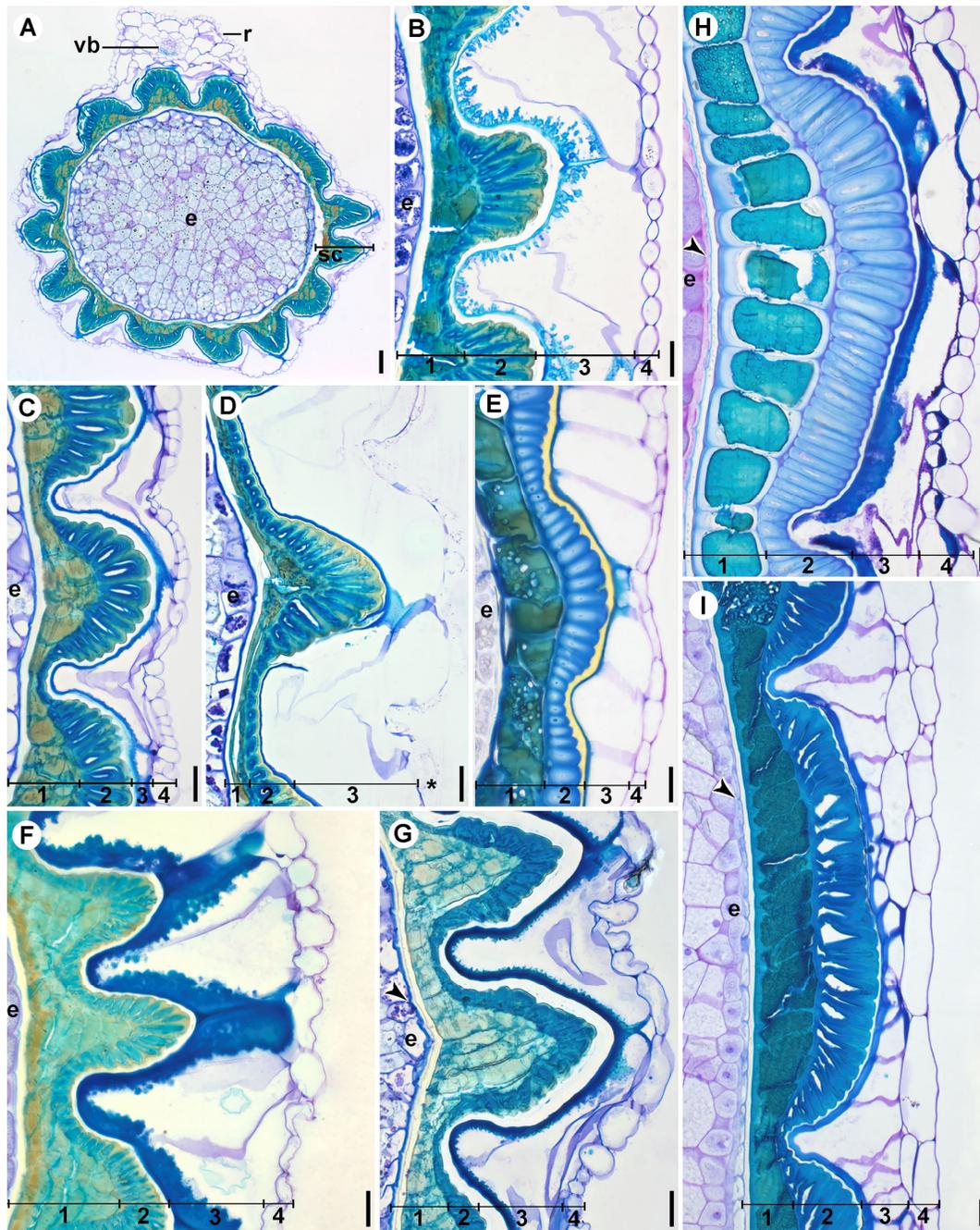
**Figura 6.** Anatomia do envoltório da semente em representantes de linhagens sem tanque de Bromelioideae. A-J: seções transversais medianas do envoltório na região antirrafeal. A: *Bromelia balansae*. B: *B. karatas*. C-D: *Greigia sphacelata*. E-F: *Fernseea itatiaiae*. E: semente em seção transversal mediana. G: *Ananas ananassoides*. H: *A. nanus*. I: *A. paraguayensis*. J: *Neoglaziovia variegata*. Cabeça de seta: ornamentação da cutícula; e: endosperma; sc: envoltório da semente. Os números indicam as diferentes camadas do envoltório da semente. 1: endotégmen, ou endotégmen + mesotégmen descontínuo;

2: exotégmen; 3: endotesta, com espessamentos secundários; 4: exotesta ou exotesta + mesotesta descontínua. Asterisco: exotesta colapsada. Barras: 25 µm.

As células nas bandas costais podem ser elípticas a colunares em seção, as bandas tendo aproximadamente 15 células de largura, exceto em *Neoglaziovia variegata* (Fig. 6J) e nas espécies de *Cryptanthus* (Fig. 7H-I), com 15 a cerca de 40 células de largura em cada banda costal. As células dessa banda podem ter aproximadamente o mesmo comprimento radial em seção, exceto no limite das bandas (Fig. 6G-I; 7B, E), ou podem ter os comprimentos radiais que decrescem em direção ao limite da banda, o qual é piramidal em seção, como em *Orthophytum pseudovagans* Leme & L.Kollmann (Fig. 7C), *Orthophytum leprosum* (Fig. 7D) e nas espécies de *Rokautskyia* (Fig. 7F-G). O exotégmen forma cristas nas bandas costais nessas espécies, não sendo possível distinguir o mesotégmen, mas a camada interna do tégmen também é costada. As células nas bandas intercostais são várias vezes mais estreitas que as costais, e aproximadamente circulares em seção. As bandas intercostais têm duas a quatro células de largura na maioria das espécies, exceto em *Hoplocryptanthus glaziovii* (cinco a dez células de largura) (Fig. 7B), e *O. leprosum* (oito a doze células de largura em cada banda intercostal) (Fig. 7D). O espessamento das células do exotégmen é contínuo na maioria das espécies, obstruindo parcialmente ou totalmente o lúmen celular. O espessamento é descontínuo ou com pares de pontoações em *Greigia sphacelata* (Fig. 6C-D) e *F. itatiaiae* (Fig. 6E-F), as quais também apresentam lúmen celulares irregularmente comprimidos. Células com paredes celulares sinuosas no exotégmen foram observadas apenas em *Ananas nanus* (L.B.Sm.) L.B.Sm. (Fig. 6H).

Na face externa e especialmente na face interna das células do tégmen, é possível distinguir uma cutícula (veja o teste histoquímico a seguir), a qual é espessa na maioria das espécies. Em alguns casos, é possível notar micro-ornamentações nessa cutícula,

evidentes em *Ananas ananassoides* (Fig. 6G), nas espécies de *Rokautskyia* (Fig. 7F-G) e *Cryptanthus* (Fig. 7H-I).



**Figura 7.** Anatomia do envoltório da semente em cryptanthoides. A: semente em seção transversal mediana de *Orthophytum pseudovagans*. B-D: seção transversal mediana do envoltório da semente na região antirrafeal. B: *Hoplocryptanthus glaziovii*. C: *O. pseudovagans*. D: *O. leprosum*. E: *O. saxicola*. F: *Rokautskyia pseudoglaziovii*. G: *R. whitmanii*. H: *Cryptanthus pickelii*. I: *C. colnagoi*. Cabeça de seta: cutícula; e: endosperma; r: rafe; sc: envoltório da semente. Os números representam as diferentes camadas do envoltório. 1: endotégmen, ou endotégmen + mesotégmen descontinuo; 2: exotégmen; 3: endotesta, com

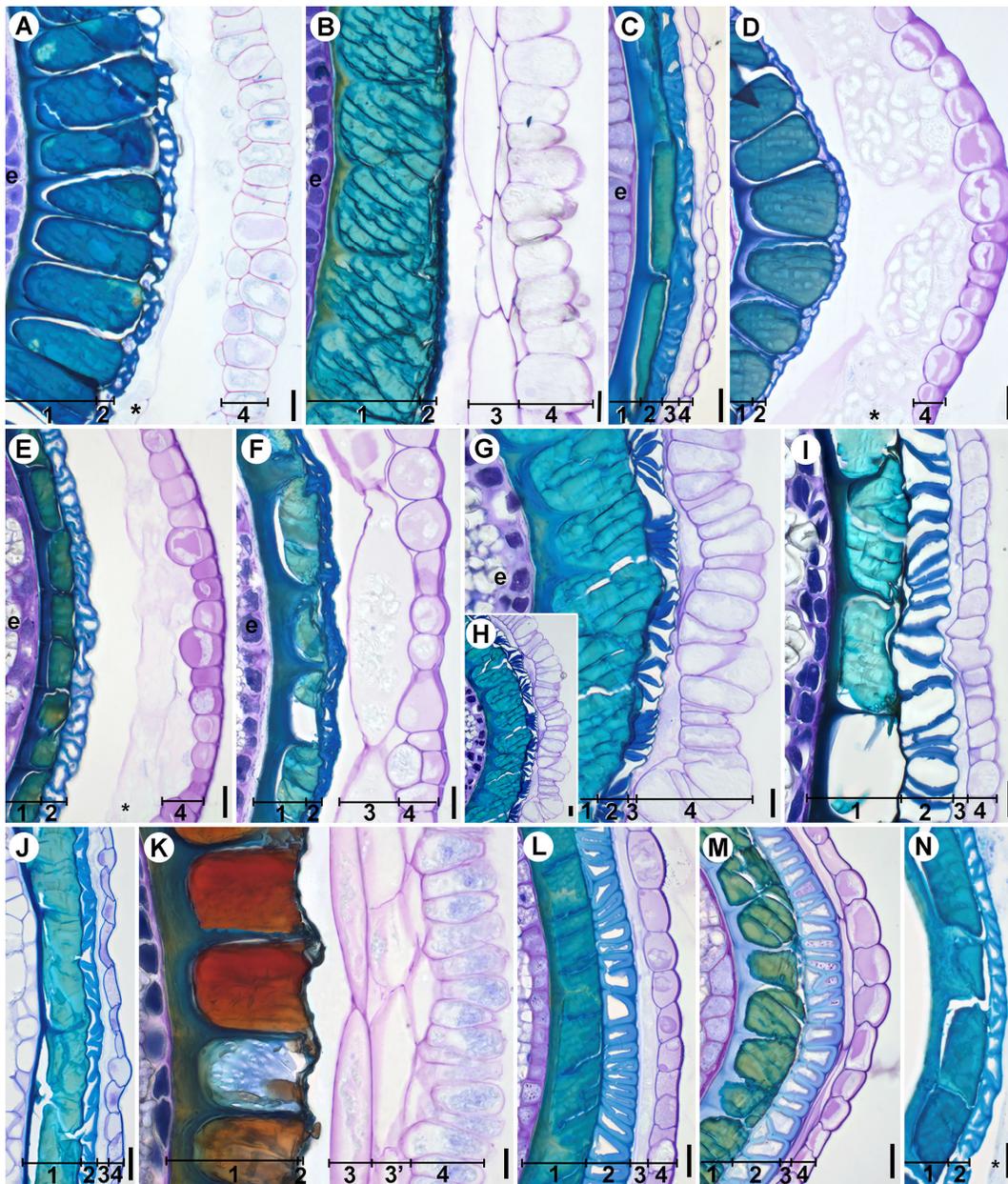
espessamentos secundários; 4: exotesta ou exotesta + mesotesta descontínua, apenas em *Cryptanthus*. Asterisco: exotesta colapsada. Barras: 25  $\mu\text{m}$ .

A testa possui duas a três camadas de células, e a endotesta é sempre a camada mais volumosa, e a única com espessamentos secundário em todas as espécies analisadas. As paredes celulares periclinais internas e a região basal das paredes anticlinais são tipicamente espessadas (Fig. 6A-J; 7A-I, camada 3). O padrão de espessamento secundário é em forma de placa basal típica em *Bromelia balansae* Mez (Fig. 6A), placa basal convexa em *Bromelia karatas* L. (Fig. 6B), placa basal em formato de U em *Bromelia antiacantha* (Fig. 1A-I) (ver a seção de ontogenia). O padrão de placa basal típica também ocorre em *Greigia sphacelata* (Fig. 6C-D), *F. itatiaiae* (Fig. 6E-F), nas espécies de *Ananas* (Fig. 6G-I), *Neoglaziovia variegata* (Fig. 6J), nas espécies de *Orthophytum* (Fig. 7C-E) e *Cryptanthus colnagoi* Rauh & Leme (Fig. 7I). Nesse padrão, há diferenças interespecíficas com relação ao grau de espessamento e a presença de ornamentações projetadas para o lúmen celular (placa basal papilosa), embora a conformação tridimensional desse espessamento seja desconhecida (Fig. 6H; 7A, G). Em *H. glaziovii* (Fig. 7B), *Rokautskyia pseudoglaziovii* (Leme) Leme, S.Heller & Zizka (Fig. 7F) e *Cryptanthus pickelii* L.B.Sm. (Fig. 7H), há projeções de parede celular floculosas dentro do lúmen celular (padrão floculoso). Diferente de papilas, floculações são mais visíveis e espessadas (Fig. 4F). No caso de *H. glaziovii* (Fig. 7B), as projeções floculosas são pontiagudas a cônicas e mais esparsas que em *R. pseudoglaziovii* (Fig. 7F) ou *C. pickelii* (Fig. 7H). Na primeira espécie, a floculação é intensa e produz flocos globoides, presentes em abundância nas paredes anticlinais, em contraste com o padrão basal papiloso de *Rokautskyia whitmanii* (Leme) Leme, S.Heller & Zizka (Fig. 7G). Floculações irregulares são observadas em *C. pickelii* (Fig. 7H), o qual possui um grau de espessamento maior que *C. colnagoi* (Fig. 7I), com um padrão em placa basal típico.

A endotesta é continuamente retilínea nas espécies de *Bromelia* (Fig. 6A-B), diferente de outras espécies, nas quais algumas células possuem evaginações nas paredes periclinais internas que acompanham as ondulações (Fig. 6A-F) ou costelas do tégmen (Fig. 6G-J; 7A-I). No segundo caso, as evaginações são profundas e alternadas com as paredes anticlinais espessadas.

A mesotesta frequentemente forma uma camada descontínua, sendo comprimida na maturidade da semente ou, quando presente, pode ser parenquimática (Fig. 6G-H) ou com espessamentos secundários (Fig. 7H-I). A exotesta, por outro lado, sempre tem paredes celulares primárias (pécticas), a qual é colapsada em sementes que já foram desidratadas (Fig. 6C-F, J; 7D). Nas espécies de *Bromelia*, as paredes periclinais externas são espessadas, mas com paredes primárias (Fig. 6A, B) (ver detalhes na seção de ontogenia).

A antirrafe nas Bromelioideae núcleo possuem tégmen com duas camadas de células em todas as espécies analisadas (Fig. 8A-N; 9A-P). Ela é representada pelo exotégmen e endotégmen, ambos com células com espessamento secundário. As células no endotégmen são frequentemente espessadas, com padrão em forma de U e, normalmente, acumulam compostos fenólicos no lúmen celular. Quando o espessamento da parede periclinal interna e anticlinal é acentuado, os lúmens celulares e o composto fenólico armazenado podem não ser notados, como em *Neoregelia compacta* (Mez) L.B.Sm. (Fig. 9G), *Canistrum montanum* Leme (Fig. 9K) e *Hylaeicum levianum* (Fig. 9L). Em algumas espécies, as paredes anticlinais são finamente espessadas, em um padrão de placa basal (Fig. 5L; 8J; 9A, B, D). Na superfície externa, e especialmente na superfície interna do tégmen, é possível distinguir uma fina cutícula, raramente espessa como em *Ursulaea tuitensis* (Magana & E.J.Lott) Read & Baensch (Fig. 9P).

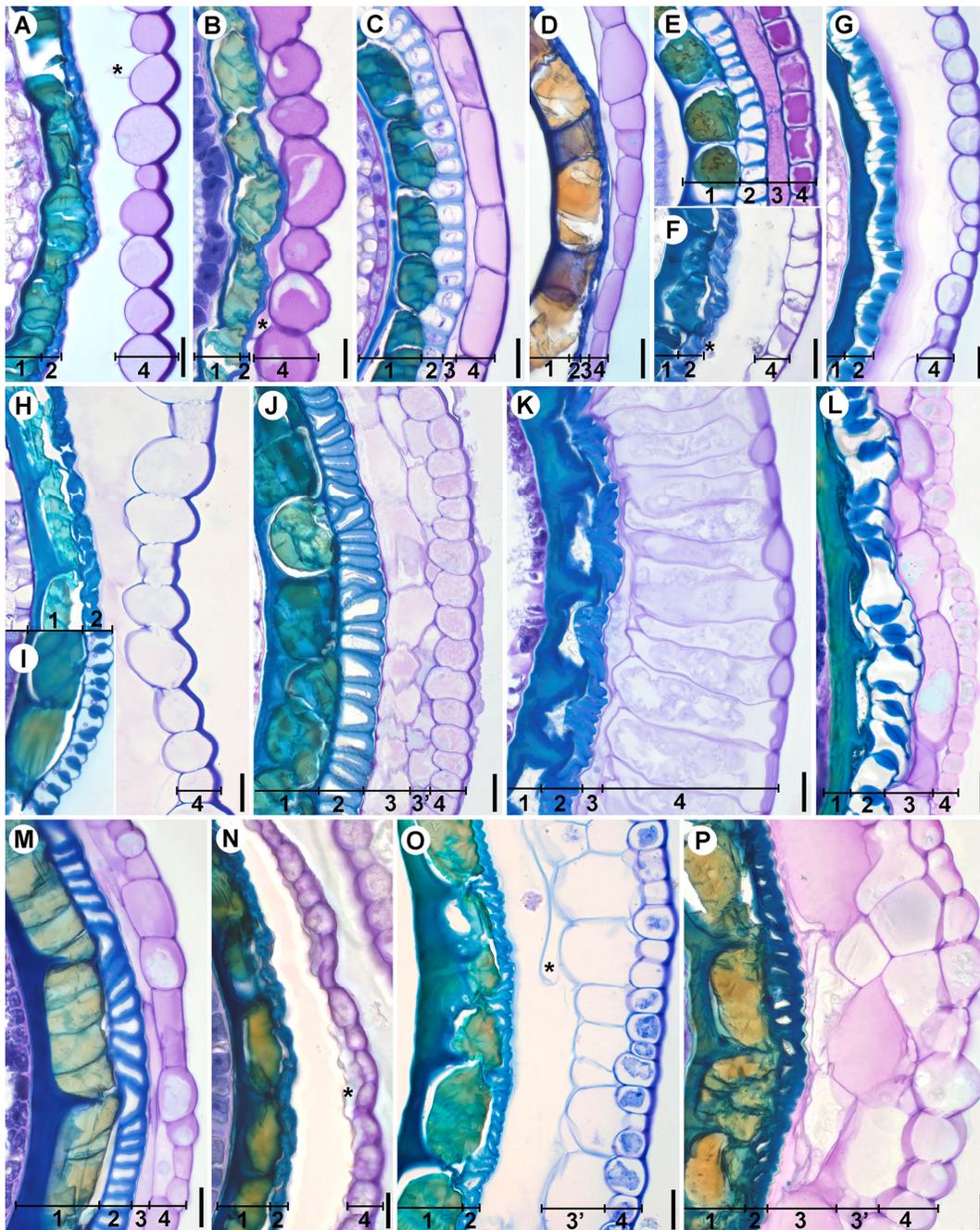


**Figura 8.** Anatomia do envoltório da semente em Bromelioideae núcleo: *Aechmea* e outros gêneros. A-N: seção transversal mediana do envoltório na região antirrafeal. A: *Aechmea bromeliifolia*. B: *Aechmea castelnavii*. C: *Aechmea distichantha*. D: *Aechmea gamosepala*. E: *Aechmea recurvata*. F: *Aechmea strobilina*. G-H: *Aechmea tocanina*. I: *Araeococcus micranthus*. J: *Araeococcus goeldianus*. K: *Billbergia zebrina*. L: *Hohenbergia stellata*. M: *Hohenbergia augusta*. N: *Karawata gustavoi*. Os números indicam as diferentes camadas do envoltório. 1: endotégmen; 2: exotégmen; 3: endotesta; 3': mesotesta contínua; 4: exotesta. Asterisco: endotesta colapsada. Barras: 25  $\mu$ m.

O exotégmen pode ser comprimido na semente madura, onde padrões de espessamento secundário são frequentemente descaracterizados (Fig. 8A-F, K; 9A, B, D, K, N, O). Em algumas dessas espécies, as paredes celulares são tortuosas e o lúmen celular pode ser reconhecido com uma pequena fenda irregular ou anticlinal (padrão um) (Fig. 8A, C, E, F, N; 9K, O). Nas outras espécies, é impossível distinguir o lúmen, sendo as células fortemente comprimidas e com um reduzido comprimento radial (padrão 2) (Fig. 8B, D, K; 9A, B, D, F, N). Em *Canistrum montanum* as células do exotégmen estão comprimidas dentro dos lúmens do endotégmen (Fig. 9K). Quando o exotégmen não é comprimido, é possível reconhecer diferentes padrões de espessamento secundário: o padrão isso-anticlinal, quando ao longo das paredes anticlinais, em *Aechmea tocantina* (Fig. 8G) e *Araeococcus micranthus* Brongn. (Fig. 8I); apo-anticlinal, quando apenas na porção superior das paredes anticlinais, em espécies de *Neoregelia* (Fig. 9G-I); ou meso-anticlinal, quando presente na porção mediana das paredes anticlinais, observado apenas em *Hylaeaicum levianum* (Fig. 9L). O padrão em forma de U invertido ocorre apenas em *Araeococcus goeldianus* L.B.Sm. (Fig. 8J). Nas outras espécies, há um padrão irregular, frequentemente com pares de pontoações nas paredes anticlinais (Fig. 8L-M; 9C, J, M, P).

A testa tem uma a quatro camadas de células com paredes celulares primárias e conteúdo geralmente pécticos (Fig. 8A-N; 9A-P). A mesotesta em uma camada contínua ocorre apenas em *Billbergia zebrina* (Fig. 8K), *Canistrum aurantiacum* (Fig. 9J) e *Ursulaea tuitensis* (Fig. 9P). Nas outras espécies, há duas camadas de células, raramente com poucas células formando uma mesotesta descontínua (Fig. 8A-J, L-N; 9A-H, K-O). Nessas espécies, a exotesta pode ser a única camada a restar na semente madura, como ocorre na maioria dos nidulariíodes (Fig. 9A-I). Apenas na exotesta, as células podem ter parede celular com espessamento, sempre primário quando presente. Uma parede

periclinal externa espessada é observada em várias espécies (Fig. 8D-F, L, M; 9G-K). A exotesta é ondulada apenas em *A. tocantina* (Fig. 8G-H). As células da exotesta são normalmente elípticas a retangulares em seção transversal, exceto em *C. montanum* (Fig. 9K), a única espécie com exotesta em paliçada, isto é, com células colunares. Células alongadas periclinalmente também ocorrem na exotesta em *A. tocantina* (Fig. 8G) e *B. zebrina* (Fig. 8K), mas elas são elípticas em seção.



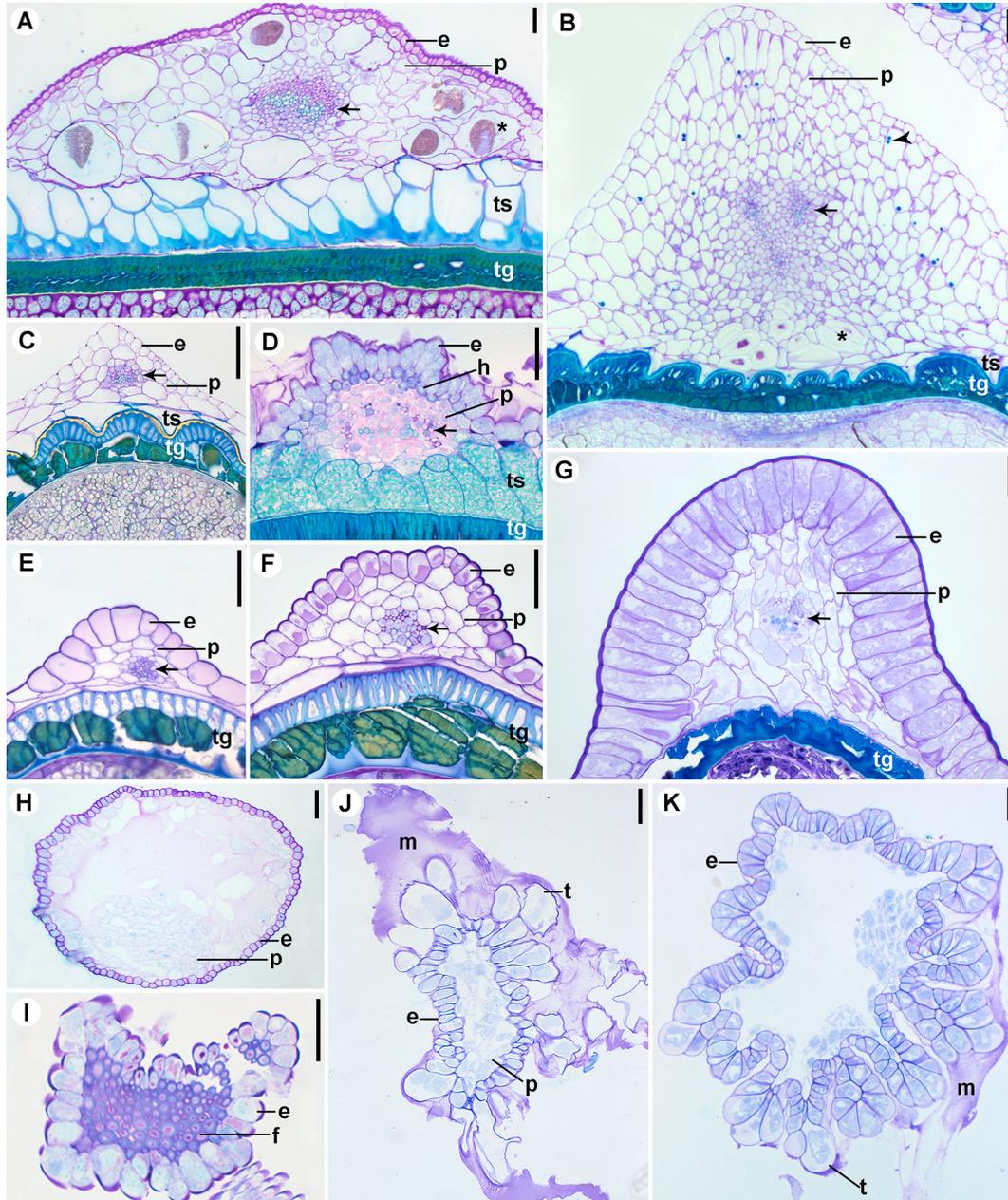
**Figura 9.** Anatomia do envoltório da semente em Bromelioideae núcleo: nidularioides e outros gêneros. A-P: seção transversal mediana do envoltório da semente na região antirrafeal. A: *Canistropsis billbergioides*. B: *Nidularium innocentii*. C: *N. amazonicum*. D: *Edmundoa ambigua*. E-F: *Wittrockia superba*. E: semente imatura; F: semente madura. G: *Neoregelia compacta*. H: *N. retrorsa*. I: *N. johannis*, testa não mostrada. J: *Canistrum aurantiacum*. K: *C. montanum*. L: *Hylaeaicum levianum*. M: *Portea petropolitana*. N: *Quesnelia liboniana*. O: *Q. quesneliana*. P: *Ursulaea tuitensis*. Os números indicam as diferentes camadas do envoltório. 1: endotégmen; 2: exotégmen; 3: endotesta; 3<sup>o</sup>: mesotesta contínua; 4: exotesta. Asterisco: endotesta colapsada. Barras: 25 µm.

### *Rafe e apêndice calazal*

A rafe nas espécies analisadas tem uma forma triangular em seção transversal, e consiste de uma epiderme idêntica à exotesta da região antirrafeal, e um único feixe vascular circundado por camadas de parênquima, abaixo do qual a endotesta e tégmen são localizados, também com os mesmos padrões anatômicos da região antirrafeal (Fig. 10A-G). A rafe difere entre espécies ou gêneros em termos de número de células do parênquima (Tab. 2). Ela varia de uma a três camadas de células em várias espécies, tanto das linhagens sem tanque, quanto das Bromelioideae núcleo (Fig. 10C-G), e cinco a doze ou mais camadas circundando o feixe vascular nas rafes volumosas das espécies de *Bromelia* e *Cryptanthus* (Fig. 10A-B). Apenas em *A. strobilacea* ocorre uma hipoderme com células espessadas, provavelmente com paredes secundárias, abaixo da epiderme (Fig. 10D). Em *C. montanum*, a epiderme repete o padrão em paliçada observado na exotesta antirrafeal (Fig. 10G). Apenas nas espécies de *Cryptanthus* há um aumento do número de camadas do tégmen na região rafeal, de quatro a seis camadas de células (Fig. 10B).

O apêndice calazal das espécies analisadas consiste de um parênquima não vascularizado, circundado por uma epiderme similar à exotesta, sem elementos de tégmen (Fig. 10H-K). Para a maioria das espécies analisadas, há um parênquima com alguns espaços intercelulares preenchidos com mucilagem ou resquícios celulares (Fig. 10H). Apenas em *A. strobilacea* ocorrem células fibrosas, provavelmente com paredes

secundárias (Fig. 10I). No apêndice calazal de *A. tocantina* e nas espécies de *Araeococcus*, ocorrem células epidérmicas com volume aumentado que secretam mucilagem, provavelmente tricomas unicelulares (Fig. 10J, K) (ver detalhes a seguir).



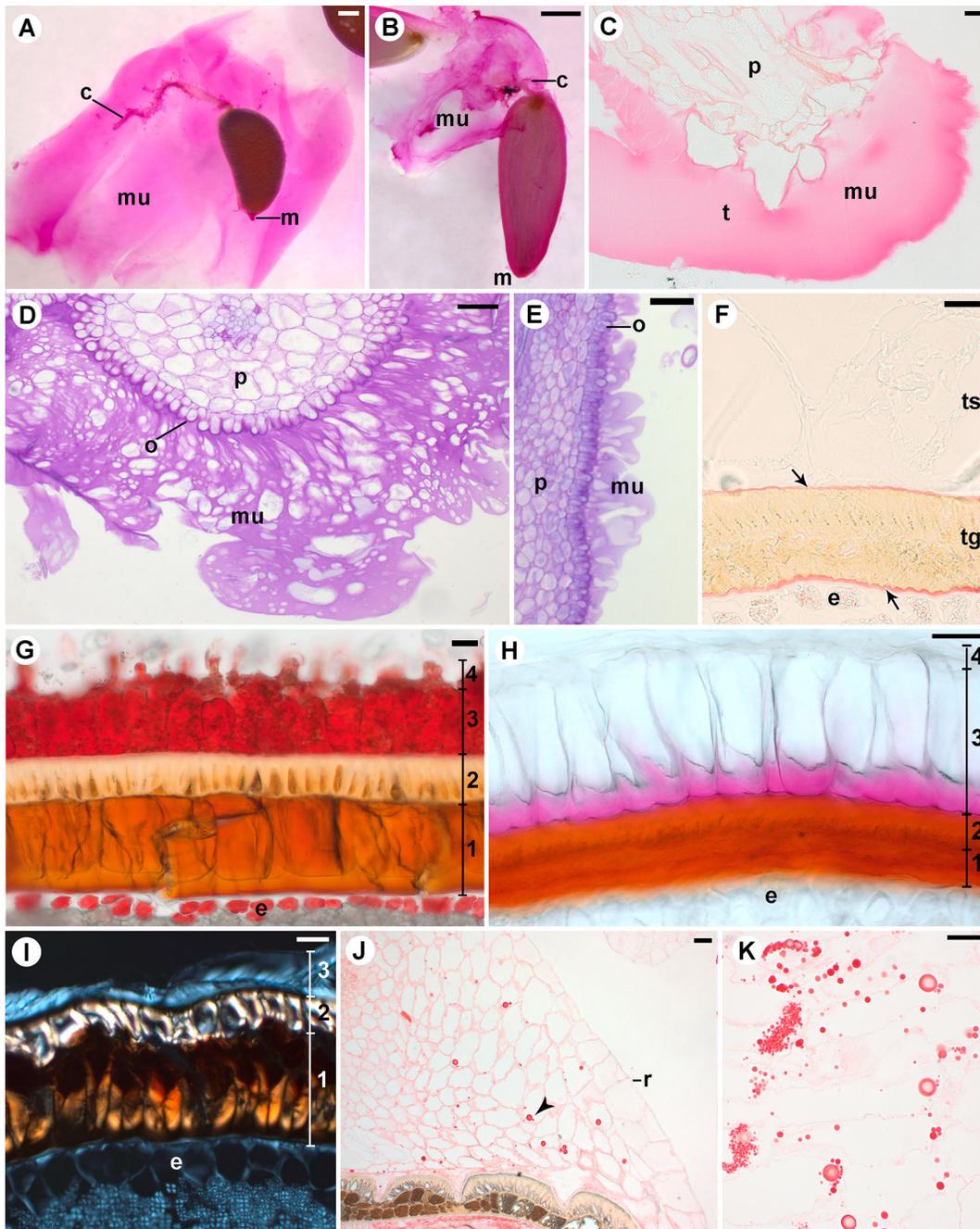
**Figura 10.** Anatomia da rafe e apêndice calazal em algumas Bromelioideae. A-G: região rafeal em seção transversal mediana. A: *Bromelia antiacantha*. B: *Cryptanthus colnagoi*. C: *Orthophytum saxicola*. D: *Acanthostachys strobilacea*. E: *Nidularium amazonicum*. F: *Hohenbergia augusta*. G: *Canistrum montanum*. H-K: apêndice calazal em seção transversal. H: *Aechmea strobilina*. I: *Acanthostachys strobilacea*. J: *Araeococcus micranthus*. K: *Aechmea tocantina*. Asterisco: idioblasto com ráfides; cabeça de seta: grão de proteína; seta: feixe vascular; e: exotesta; f: células fibrosas; h: hipoderme; m: mucilagem; p: parênquima; t: tricoma; ts: endotesta; tg: tégmen. Barras: 50 µm.

*Notas histoquímicas*

Substâncias pécnicas acumuladas nas células da exotesta, como também envolvendo a semente e nos lóculos do ovário, foram observadas nas sementes da maioria das Bromelioideae núcleo, algumas delas sendo circundadas por uma espessa camada de mucilagem observável a olho nu (Fig. 11A-B). Apenas em *A. tocantina* e nas espécies de *Araeococcus* (Fig. 10J-K; 11A-C), a mucilagem é produzida por células epidérmicas avolumadas no apêndice calazal. Em outras espécies, como em *B. nutans* (Fig. 11D) e *A. strobilacea* (Fig. 11E), a mucilagem parece ser produzida exclusivamente pelo obturador. Para quase todas espécies analisadas, lipídeos foram observados apenas na cutícula tégmica (Fig. 8F), exceto em *A. strobilacea* (Fig. 11G), com uma forte reação para lipídeos na testa, especialmente na endotesta.

Nas linhagens sem tanque, as sementes não são envolvidas por mucilagem e não foram encontradas quantidades significantes de substâncias de armazenamento no envoltório da semente. Uma reação positiva para lignina na endotesta foi observada em espécies de *Bromelia* (Fig. 11H), e para luz polarizada, também confirmando as paredes celulares secundárias na endotesta em outros representantes das linhagens sem tanque (Fig. 11I).

A rafe possui constituição pécnica em todas as Bromelioideae núcleo (Fig. 10C-G). Nenhuma substância de armazenamento significativa foi detectada nessa região em quase todas as outras espécies. Exceto nas espécies de *Bromelia*, nas quais ocorrem abundantes idioblastos com ráfides no parênquima (Fig. 4A; 10A) e nas espécies de *Cryptanthus* em que ocorrem cristais de proteína no parênquima da rafe, além de alguns idioblastos com ráfides próximos ao tégmen (Fig. 10B; 11J-K).



**Figura 11.** Alguns aspectos histoquímicos do envoltório da semente em espécies de Bromelioideae. A-C: mucilagem corada com Vermelho de Rutênio. A-B: estereomicroscopia de sementes frescas envoltas por mucilagem (sob água). C: seção transversal do envoltório da semente, mostrando tricoma secretor e mucilagem. A: *Araeococcus micranthus*. B-C: *A. goeldianus*. D-E: seções transversais e longitudinais do funículo e obturador (epiderme). Mucilagem corada com Toluidina O. D: *Billbergia nutans*. E: *Acanthostachys strobilacea*. F-G: seção transversal do envoltório da semente e teste Sudan III para lipídeos. F: *Bromelia balansae*. A cutícula cora em vermelho (seta). G: *Acanthostachys strobilacea*. Sudan III cora lipídeos em vermelho vívido na testa (camadas 3 e 4) e epiderme do endosperma (camada de aleurona). O tégmen apresenta sua cor natural. H: *Bromelia antiacantha*. Cortes transversais à mão livre da semente. Lignina na endotesta é mostrada em pink, corada com floroglucinol acidificado (camada 3). A cor alaranjada natural das paredes celulares impede a observação de reação positiva no tégmen. I: *Greigia*

*sphacelata*. Corte transversal do envoltório da semente sob luz polarizada, mostrando paredes celulares secundárias no tégmen e endotesta. Note o espessamento em padrão em forma de V do endotégmen. J-K: rafe em seção transversal, grãos de proteína corados com Xylidine Ponceau. J: *Cryptanthus colnagoi*. K: *C. pickelii*. Detalhe do parênquima rafeal, mostrando grãos de proteína abundantes. Os números em G-I indicam as camadas do envoltório em desenvolvimento. 1: endotégmen. 2: exotesta; seta: cutícula; cabeça de seta: grão de proteína; c: apêndice calazal; e: endosperma; m: micrópila; mu: mucilagem; o: obturador (epiderme); p: parênquima; r: rafe; tg: tégmen; ts: testa. Barras: A-B: 0,5 mm; C-E, G, H, J, K: 50 µm; F: 20 µm; I: 25 µm.

## Discussão

### *Caracteres potencialmente informativos filogeneticamente*

Neste estudo, 33 caracteres morfoanatômicos variáveis para 48 espécies e 25 gêneros (*ca.* 60% dos gêneros de Bromelioideae) foram descritos e comparados. A análise englobou a morfologia da semente e anatomia do envoltório, rafe e apêndice calazal, a maioria pela primeira vez em Bromeliaceae. Os caracteres e seus respectivos estados de caráter (dois a oito estados) estão resumidos nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2.** Caracteres variáveis e estados dos caracteres do envoltório da semente em Bromelioideae

	Caráter	Estado
1	Morfologia da semente	0 = achatada, obovoide a ovoide 1 = alongada, longo-obovoide-oblongoide 2 = angulosa 3 = achatada, triangular a fusiforme
2	Eixo micropilar-calazal	0 = retilínea ou levemente curvada 1 = curvada
3	Apêndice calazal: morfologia	0 = inconspícuo 1 = curto a longo cilíndrico 2 = longo-laminar/emaranhado 3 = curto, cônico a laminar 4 = curto circinado 5 = elástico/cilíndrico muito longo
4	Apêndice calazal: posição	0 = apical 1 = subapical/lateralizado
5	Apêndice calazal: tricomas	0 = ausente 1 = presente
6	Apêndice calazal: seção transversal	0 = elíptica ou irregular 1 = plicada
7	Apêndice calazal: células fibrosas	0 = ausente 1 = presente no parênquima 2 = presente na exotesta
8	Apêndice micropilar (funiculo + micrópila)	0 = muito curto ou ausente 1 = presente

9	Rafe: morfologia	0 = mucilaginoso/linear 1 = suculenta/ globoide 2 = achatada/aliforme
10	Rafe: camadas de parênquima (concentricamente)	0 = 1-3 1 = 3-5 2 = 5 a mais de 10
11	Rafe: hipoderme	0 = ausente 1 = presente
12	Rafe: idioblastos com ráfides	0 = ausentes ou raros 1 = frequentes
13	Rafe: grãos de proteína	0 = ausentes 1 = abundantes
14	Rafe: camadas de tégmen	0 = 2 1 = 3- 5
15	Rafe: paredes celulares na exotesta	0 = pécticas (primárias) 1 = secundárias
16	Rafe: células na exotesta	0 = similares à antiraphe 1 = distintas da antiraphe
<b>Testa</b>		
17	Cor	0 = branca/transparente 1 = verde 2 = vermelho (temporariamente) 3 = marrom
18	Camadas celulares na semente madura	0 = 1 1 = 2-3 (descontínuas) 2 = 3-4 (contínuas)
19	Exotesta: células em seção transversal	0 = retangular a elípticas 1 = em paliçada 2 = comprimidas
20	Exotesta: espessamento de parede	0 = não/pouco espessada 1 = espessada (primária) 2 = espessada (secundária)
21	Exotesta: ondulações regulares	0 = ausente 1 = presente
22	Mesotesta	0 = ausente 1 = presente, parenquimática 2 = presente, espessada
23	Endotesta	0 = ausente na semente madura 1 = presente na semente madura
24	Endotesta: constituição das paredes celulares	0 = primária/péctica 1 = secundária/lignificada
25	Endotesta: padrão de espessamento	0 = não espessada 1 = em forma de U basal 2 = placa basal 3 = placa basal convexa 4 = placa basal papilosa 5 = floculoso
<b>Tégmen</b>		
26	Exotégmen: padrão anatômico	0 = regular 1 = ondulado 2 = costate
27	Exotégmen: células costais (número de séries em seção transversal)	0 = ausente 1 = 8-12 2 = 10-20 3 = 20-40
28	Exotégmen: células costais (disposição em seção transversal)	0 = ausente 1 = levemente onduladas 2 = fortemente onduladas
29	Exotégmen: células intercostais (número de séries em seção longitudinal)	0 = ausente 1 = 1-3 2 = 3-5 3 = 6-12
30	Exotégmen: padrão de espessamento	0 = indefinido/irregular 1 = contínuo (assimétrico) 2 = contínuo (simétrico) 3 = perfurado 4 = em forme de U invertido 5 = apo-anticlinal 6 = iso-anticlinal 7 = meso-anticlinal
31	Exotégmen: compressão	0 = não comprimido 1 = comprimido/paredes tortuosas 2 = comprimido/lúmen não visível

32	Mesotégmen	0 = ausente 1 = presente, descontinuo
33	Endotégmen: padrão de espessamento	0 = em forma de U 1 = em forma de U basal/lúmen comprimido 2 = em forma de U basal/lúmen não comprimido 3 = placa basal 4 = em forma de V 5 = fortemente espessado, com lúmen comprimido

**Tabela 3.** Espécies e respectiva matriz de estados de caracteres

Espécies	Estados de caracteres (1-33)
<i>Acanthostachys strobilacea</i>	105000100110000001010010000002002
<i>Aechmea bromeliifolia</i>	10210000000000003100000000000102
<i>Aechmea castelnavii</i>	101100000100000002000010000000202
<i>Aechmea distichantha</i>	100000000000000001000010000000103
<i>Aechmea gamosepala</i>	10010000000000000001000000000202
<i>Aechmea recurvata</i>	10010000000000000001000000000103
<i>Aechmea strobilina</i>	101000000100000001010110000000100
<i>Aechmea tocanina</i>	104011000200000001001010000006002
<i>Ananas ananassoides</i>	003100000100000001000111222112013
<i>Ananas nanus</i>	000100000100000001000111422112113
<i>Ananas paraguayensis</i>	100100000100000001000111222112013
<i>Araeococcus goeldianus</i>	103010000000000001000010000004003
<i>Araeococcus micranthus</i>	101010000000000001000010000006003
<i>Billbergia nutans</i>	100100000100000001000110000002000
<i>Billbergia zebrina</i>	103101000100000002001110000000200
<i>Bromelia antiacantha</i>	000100000201000001010111100001011
<i>Bromelia balansae</i>	000100000201000001010211200001011
<i>Bromelia karatas</i>	000100000200000001010111300001011
<i>Canistropsis billbergioides</i>	100100000000000000010000000000203
<i>Canistrum aurantiacum</i>	103000010100000002000110000002000
<i>Canistrum montanum</i>	100100000100000001110010000000105
<i>Cryptanthus colnagoi</i>	210100001201110011000111223111012
<i>Cryptanthus pickelii</i>	210100001201110011000211523111012
<i>Edmundoa ambigua</i>	10010000000000000000000000000203
<i>Edmundoa lindenii</i>	100100000000000000010000000004002
<i>Fernseea itatiaiae</i>	000100000000000001000011210003002
<i>Greigia sphacelata</i>	200100000200000001000111210003004
<i>Hohenbergia augusta</i>	101100000000000001000010000003000
<i>Hohenbergia stellata</i>	101100000000000001000010000003003
<i>Hoplocrytanthus glaziovii</i>	200100000000000001000011521221013
<i>Hylaeicum levianum</i>	101000010100000001000010000007005
<i>Karawata gustavoi</i>	10010000000000000000000000000100
<i>Neoglaziovia variegata</i>	010100001200000011000211223112012
<i>Neoregelia compacta</i>	100100000000000000010000000005005
<i>Neoregelia johannis</i>	100100000000000000000000000005000
<i>Neoregelia retrorsa</i>	100100000000000000010000000005000
<i>Nidularium amazonicum</i>	100100000000000000000000000002000
<i>Nidularium innocentii</i>	100100000000000002000000000000203
<i>Orthophytum leprosum</i>	200100000000000001000011221231013
<i>Orthophytum pseudovagans</i>	200100000000000001000011221211013
<i>Orthophytum saxicola</i>	200100000000000001000011221111003
<i>Portea petropolitana</i>	101100000100000001000010000002000
<i>Puya mirabilis</i>	303100212000001131221011210001003
<i>Quesnelia liboniana</i>	10010000000000000000000000000200
<i>Quesnelia quesneliana</i>	100100000100000001010100000000100
<i>Rokautskyia pseudoglazioui</i>	200100000100000001000011521211013
<i>Rokautskyia whitmanii</i>	200100001100000001000011421211013
<i>Ursulaea tuitensis</i>	100100000100000002000110000002000
<i>Wittrockia superba</i>	10010001000000000000000000000100

Os resultados demonstram que sementes tégmicas com sarcotesta mucilagínosa, anteriormente generalizadas para Bromelioideae (Smith & Downs, 1974; Silva *et al.*, 2020), ocorrem apenas nas Bromelioideae núcleo. Nas outras linhagens, as sementes possuem uma endotesta com espessamento secundário, atuando como uma camada mecânica extra, em uma semente tégmica-endotestal, apenas relatado para algumas espécies de *Ananas* e *Bromelia* (Nemirovich-Danchenko, 1985; Carvalho & Mariath, 2021b). As sementes nas linhagens sem tanque não possuem uma sarcotesta típica, embora as células das camadas externas tenham paredes primárias. Esse é um dos caracteres anatômicos mais conservados avaliados aqui, sendo potencialmente filogeneticamente informativo, suportando as relações filogenéticas recuperadas de classificações moleculares em dois grupos principais: um clado núcleo, conhecido como Bromelioideae núcleo ou linhagem com tanque, e algumas linhagens em um grau conhecido como “linhagens sem tanque”, ou linhagens “cedo-divergentes” (Schulte *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2015; Paule *et al.*, 2020).

Nossos dados indicam que sementes alongadas, oblongoides/obovoides, exclusivamente tégmicas (com sarcotesta verdadeira), e com tégmen regular, ocorrem nos principais gêneros das Bromelioideae núcleo, como apontado para outras espécies no grupo (Smith & Downs, 1974; Silva *et al.*, 2020; Carvalho & Mariath, 2021b). O tégmen possui sempre duas camadas de células, com endotégmen normalmente acumulando compostos fenólicos nos lúmens celulares. O exotégmen é a camada mais variável em termos de padrões de espessamento, característicos de certas espécies ou gêneros. O número de camadas na testa e a presença ou ausência de endotesta na semente madura são importantes características de espécies ou gêneros estreitamente relacionados, como os nidulariídeos, todos com testa de uma ou duas camadas e endotesta frequentemente colapsada. O exotégmen nesse grupo pode ser comprimido ou no padrão apo-anticlinal,

exclusivo de *Neoregelia*, também observado em *Neoregelia bahiana* (Ule) L.B.Sm. (Silva *et al.*, 2020). A presença/ ausência de apêndices, o tamanho da semente e características anatômicas do exotégmen, testa e embrião foram caracteres informativos na nova circunscrição de *Neoregelia* e elevação de *Neoregelia* subgênero *Hylaeaicum* (Ule) L.B.Sm. & Read para gênero (Leme *et al.*, 2021). Da mesma forma, eles são potencialmente importantes na delimitação de outros gêneros polifiléticos, ou subgêneros em Bromelioideae, em espécies com caracteres morfoanatômicos da semente contrastantes, *e.g.* *Aechmea*, *Quesnelia* e *Billbergia*.

*Aechmea*, o maior gênero de Bromelioideae (e o mais taxonomicamente desafiador), é recorrentemente recuperado como polifilético, assim como a maioria dos seus subgêneros (Evans *et al.*, 2015). Dadas as variações morfoanatômicas encontradas em uma pequena amostra do gênero nesse estudo, a morfologia da semente e a anatomia do envoltório podem fornecer avanços nesse contexto, com a ainda inexplorada diversidade de caracteres, como a morfologia do apêndice calazal e os padrões de espessamento do exotégmen. Isso será importante na validação de hipóteses de homologia primária (De Pinna, 1991) para a circunscrição de *Aechmea* e gêneros relacionados. Por exemplo, na aliança *Aechmea*, *Canistrum* compreende os subgêneros *Canistrum* e *Cucullatanthus* Leme, e tem sido tratado como polifilético (Heller, 2018). Nesse contexto, *Canistrum* subgênero *Cucullatanthus* pode ser elevado a nível de gênero (Leme & Siqueira-Filho, 2006), como também suportado pelos caracteres morfológicos contrastantes de *Canistrum* subgênero *Canistrum*. A exotesta com células em paliçada é um caráter único de *C. montanum* (*Canistrum* subgênero *Cucullatanthus*), o qual o endotégmen fortemente espeçado e exotégmen comprimido com paredes celulares tortuosas são distintas de *C. aurantiacum* (*Canistrum* subgênero *Canistrum*) e outras espécies da aliança (com testa de células isodiamétricas em seção, endotégmen com

paredes levemente espessadas e exotégmen não comprimido, com padrão regular de espessamento). Além disso, a anatomia da semente e morfologia externa (sementes biapendiculadas, com uma rafe estreita vs. sementes com apêndice calazal rudimentar e rafe espessa) podem fornecer caracteres potencialmente informativos filogeneticamente para a futura delimitação de *Canistrum*.

As linhagens sem tanque incluem os gêneros irmãos de todas as outras Bromelioideae, *Bromelia*, *Fernseea*, *Greigia*, *Deinacanthon* Mez, *Ochagavia* Phil. e *Fascicularia* Mez, além dos cryptanthoides (*Cryptanthus*, *Forzzaea*, *Hoplocryptanthus*, *Krenakanthus* (Leme, S.Heller & Zizka) Leme, Zizka & Paule, *Orthocryptanthus* (Leme, S.Heller & Zizka) Leme, Zizka & Paule, *Lapanthus*, *Orthophytum*, *Rokautskyia*, *Sincoraea* e *Siqueiranthus* Leme, Zizka, E.H.Souza & Paule) e provavelmente gêneros proximamente relacionados, como *Ananas* e *Neoglaziovia*, táxons com posições conflitantes na maioria das hipóteses filogenéticas recentes (Evans *et al.*, 2015; Paule *et al.*, 2020). O hábito sem tanque e simetria das pétalas são os únicos caracteres morfológicos associados com esse grupo informal. Sementes achatadas, obovoídes a ovoídes ou angulares, endotesta com espessamentos secundários e tégmen ondulado ou costado ocorrem apenas nas linhagens sem tanque, e podem ser tão constantes nesse grupo quanto a simetria das pétalas e o hábito sem tanque.

Apesar de presente em diferentes gêneros analisados, o espessamento secundário na endotesta possui diversas variações nos padrões de espessamento e ornamentação, os quais provaram ser informativos na caracterização de espécies ou gêneros, especialmente entre os cryptanthoides. Nesse grupo, as diferentes variações do tégmen costado é uma característica anatômica constante e notável, mesmo sob um estereomicroscópio. Caracteres como a largura das bandas e conformação das células do exotégmen provaram ser importantes na delimitação de espécies, *e.g.* em *Orthophytum* e *Rokautskyia*. Leme *et*

*al.* (2017) também observou um padrão costado ou em bandas em sementes de espécies de *Forzzaea*, *Lapanthus* e *Sincoraea* e, mais recentemente, nos novos gêneros cryptanthoides (*Siqueiranthus*, *Orthocryptanthus* e *Krenakanthus*) (Leme *et al.*, 2022), indicando que este é conservado entre os cryptanthoides. Esse padrão foi também observado aqui em *Ananas*, o que pode indicar uma relação próxima entre esse gênero e os cryptanthoides, uma hipótese proposta em diferentes análises filogenéticas moleculares (Schulte *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2015), porém com baixo suporte. Similarmente, a posição de *Neoglaziovia variegata* entre as linhagens sem tanque foi recuperada com baixo suporte em análises filogenéticas moleculares (Schulte *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2015). Uma hipótese recente inclui essa espécie com baixo suporte entre as Bromelioideae núcleo (Paule *et al.*, 2020), contradizendo evidências morfológicas (hábito sem tanque, pétalas simétricas) e cariológicas (poliploidia), além das reportadas aqui (sementes achatadas e curvadas, tégmen costado, endotesta espessada). Sementes com bandas no envoltório foram também observadas em *Disteganthus lateralis* (L.B.Sm.) Gouda e *Aechmea fernandae* (É.Morren ex André) Baker (Leme *et al.*, 2021), em um padrão similar ao observado em *Neoglaziovia variegata*, *Ananas* e nos cryptanthoides, o que pode indicar que essas características evoluíram cedo em Bromelioideae. O padrão ondulado do tégmen de *Fernseea itatiaiae* e *Greigia sphacelata* também está presente em *Puya* Molina (observação pessoal), e é potencialmente simplesiomórfico na subfamília, mas essa hipótese deve ser contextualizada com análises que incluam *Deinacanthon*, *Ochagavia* e *Fascicularia*. A endotesta espessada e tégmen com mais de duas camadas (em alguns representantes) consistem em camadas mecânicas extras de proteção nesse grupo e reagiram positivamente para lignina e luz polarizada. O tégmen costado/ondulado necessita mais estudos focando na sua função, especialmente em relação a dispersão da semente e germinação.

A região da antirrafe fornece os caracteres mais variáveis do envoltório da semente nas espécies analisadas, embora a rafe tenha sido importante no reconhecimento de algumas espécies e gêneros amostrados, principalmente devido ao número de camadas de parênquima. Por exemplo, *Cryptanthus* é diferenciado de outros gêneros cryptanthoides por sua rafe com várias camadas de células e um tégmen multi-estratificado nessa região. Nas Bromelioideae núcleo, o número de camadas de células na rafe também varia entre espécies. Os padrões da testa e do tégmen são similares àqueles encontrados na antirrafe, exceto para as espécies de *Cryptanthus* (o qual tégmen possui mais camadas nessa região), *Acanthostachys strobilacea* (a única espécie com hipoderme de células espessadas na rafe) e *C. montanum* (o qual repete o peculiar padrão em paliçada da exotesta na epiderme rafeal).

A descrição e comparação dessas características é o primeiro passo em direção ao mapeamento dos caracteres anatômicos da semente em Bromelioideae e outras subfamílias destacando sua importância como evidência morfológica em árvores filogenéticas e seu uso combinado para delimitação de espécies e gêneros em abordagens de evidência total. Contudo, há algumas limitações metodológicas, uma vez que quase não há dados da anatomia e desenvolvimento da semente em outras subfamílias (Magalhães & Mariath, 2012). Além disso, o baixo grau de sobreposição entre espécies amostradas e marcadores moleculares e morfológicos em Bromeliaceae impede estudos mais abrangentes de evolução de caracteres (Kuhn *et al.*, 2020) e a combinação de dados morfológicos e moleculares de diferentes fontes (Escobedo-Sarti *et al.*, 2013). Dada a posição filogenética das linhagens sem tanque e analisando representantes de outras subfamílias (observação pessoal), nós hipotetizamos que a semente tégmico-testal é ancestral nesse grupo, com a perda da camada mecânica da testa tendo evoluído apenas nas Bromelioideae núcleo. Futuras análises em outras representantes, especialmente das

linhagens sem tanque, será essencial para compreensão da evolução dessas características na subfamília. Da mesma forma, análises anatômicas e ontogenéticas da semente em outras subfamílias de Bromeliaceae poderá fornecer dados anatômicos inexplorados para a sistemática e evolução de caracteres da família.

*Homologia morfológica entre os tegumentos do rudimento seminal e as camadas do envoltório*

A ontogenia das camadas do envoltório da semente corrobora os caracteres taxonomicamente/filogeneticamente informativos propostos, como a localização dos tecidos mecânicos e número de camadas na semente madura. Isso é relevante uma vez que a diferenciação dos tegumentos, como a compressão ou perda de certas camadas, impedem uma clara interpretação dos caracteres e sua homologia na semente madura (Corner, 1976). O rudimento seminal tem sido avaliado morfológicamente como marcador efetivo de gêneros ou clados, *e.g.* na aliança *Ronnbergia* (Aguirre-Santoro *et al.*, 2016), ou anatomicamente, *e.g.* no “complexo nidularioide” (Nogueira *et al.*, 2015). A presença/ausência de apêndices no primeiro caso e principalmente o número de camadas do tegumento no segundo mostraram-se filogeneticamente informativos. A diferenciação do envoltório da semente, contudo, permanece amplamente negligenciada nesse grupo diverso morfológicamente (Silva *et al.*, 2020), no qual é difícil reconhecer a homologia das variações encontradas em camadas dos tegumentos do rudimento seminal em relação às camadas do envoltório da semente (Carvalho & Mariath, 2021b). Neste estudo, embora algumas características do rudimento seminal sejam mantidas na semente madura, como a presença de apêndices, as camadas do tegumento podem passar por profundas mudanças durante a maturação da semente.

Em *Bromelia antiacantha*, a endotesta se diferencia precocemente e desenvolve espessamentos secundários durante a diferenciação final. Testes para lignina e luz polarizada confirmam a natureza secundária do espessamento, essa camada se mantém na semente mesmo após o colapso das camadas mesotesta e exotesta, contribuindo para sua proteção mecânica. O tégmen desenvolve uma camada de mesotégmen, o qual se espessa mas é comprimida com endotégmen na semente madura, resultando na característica conformação dessas camadas nas espécies de *Bromelia*. Para outros representantes das linhagens sem tanque, a presença de um mesotégmen descontínuo pode ser notada, mas em alguns casos, apenas análises ontogenéticas poderiam confirmar sua presença, uma vez que a compressão de camadas e cor natural dos compostos fenólicos armazenados impedem a observação das paredes celulares nas camadas internas do tégmen. *Ananas comosus* é a única espécie desse grupo na qual a diferenciação do envoltório da semente foi investigada (Rao & Wee, 1979), corroborando que o tégmen tenha ondulações ou costelas, como descrito aqui para outras espécies de *Ananas*, *Neoglaziovia variegata* e *cryptanthoides*. Investigações ontogenéticas dessa característica, especialmente com relação à diferenciação da parede celular, pode fornecer detalhes desse processo único de diferenciação celular, a qual função ainda é desconhecida.

Apenas para os representantes das Bromelioideae núcleo, a análise ontogenética indica que o tegumento externo se diferencia em uma sarcotesta verdadeira com paredes celulares permanecendo primárias, como observado em outras espécies desse grupo (Silva *et al.*, 2020). Da mesma forma, elas apresentam algumas variações em termos de volume, substâncias armazenadas e presença de endotesta na semente madura. A análise ontogenética em *Edmundoa lindonii* indica que a compressão da endotesta ocorre desde fases iniciais de diferenciação, como também observado nos nidularioides (Nogueira *et*

*al.*, 2015) e outras espécies de Bromelioideae núcleo. Em todas as espécies de Bromelioideae núcleo o tégmen permanece com duas camadas, o endotégmen sendo a primeira camada a se diferenciar, com células aumentando de volume e acumulando compostos fenólicos, se tornando espessada nas fases finais de diferenciação do envoltório. A presença de compostos fenólicos no tégmen, especialmente no endotégmen, é uma característica comum em Poales (Venturelli & Bouman, 1988; Coan & Scatena, 2004; Coan *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2009), assim como a presença de uma cutícula mais ou menos espessa circundando o tégmen.

*Acanthostachys strobilacea* é uma espécie peculiar sem tanque, recorrentemente situada como grupo irmão de todas as outras Bromelioideae núcleo (Evans *et al.*, 2015; Paule *et al.*, 2020). No presente estudo, essa é a única espécie analisada a produzir um apêndice calazal com crescimento contínuo, alcançando vários centímetros quando esticado, aparentemente sendo produzido continuamente por um meristema intercalar na calaza. Essa espécie também se destaca por outras características potencialmente autapomórficas, tais como a presença de células fibrosas no apêndice calazal elástico e hipoderme na rafe, além de abundante acúmulo de lipídeos nas camadas da testa. Apesar disso, a diferenciação geral e anatomia do envoltório parece ser similar a outras espécies de Bromelioideae núcleo, como a diferenciação da endotesta e tégmen.

#### *Aspectos histoquímicos do envoltório da semente*

A produção de mucilagem pelas células do obturador no funículo e na placenta parece ser comum nas Bromelioideae núcleo analisadas, tendo sido observadas na maioria das espécies, além da peculiar produção de mucilagem por células epidérmicas no apêndice calazal de *Aechmea tocantina* e nas espécies de *Araeococcus*. A estrutura e

função de secreção de mucilagem desses apêndices calazais foram relatadas para Bromeliaceae pela primeira vez neste estudo. Silva *et al.* (2020) observaram secreção após a fecundação nos lóculos do ovário de *Neoregelia bahiana*, provavelmente secretada pelo obturador, embora eles não tenham identificado a substância secretada. Além de observações macroscópicas, que mostraram uma produção abundante de mucilagem nas espécies analisadas aqui, o teste histoquímico (Vermelho de Rutênio) e a reação metacromática da Toluidina O indicaram fortemente a presença de polissacarídeos pécnicos, os principais componentes da mucilagem, que também pode estar presente nos vacúolos das células da testa. Secreção de mucilagem por tricomas peltados modificados com atividade de coléter em inflorescências de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B.Sm. (Paiva, 2016; Ballego-Campos & Paiva, 2018) e *Wallisia cyanea* Barfuss & W.Till (Ballego-Campos *et al.*, 2020) são os únicos registros de secreção de mucilagem na família com descrição ultra-estrutural e histoquímica, apesar de mucilagem abundante ser observada em inflorescências de *Alcantarea* (É.Morren ex Mez) Harms (*e.g.* *A. mucilaginoso* Leme; Leme, 2009), em espécies de *Guzmania* Ruiz & Pav. (*e.g.* *G. globosa* L.B.Sm.; Benzing, 2000) e *Vriesea* Lindl. (obs. pess.).

O fruto de Bromelioideae, um antocarpo carnoso de ovário ínfero, é recorrentemente associado à zoocoria na subfamília (Benzing, 2000; Givnish *et al.*, 2005), embora sua diversidade morfoanatômica seja amplamente negligenciada (Leme *et al.*, 2021). Da mesma forma, os apêndices da semente nesse grupo têm sido relacionados à dispersão secundária por animais (epizoocoria), quando aderindo na sua superfície, ou ainda se fixando no substrato rochoso ou epifítico, aumentando a eficiência reprodutiva em espécies epifíticas com poucas sementes (Silva *et al.*, 2020; Leme *et al.*, 2021). Dada a natureza adesiva da mucilagem em representantes das Bromelioideae núcleo analisadas, a qual envolve a semente em abundância mesmo após a desidratação, nós hipotetizamos

que a mesma auxilia na adesão ao dispersor ou substrato, além de ser uma potencial fonte de açúcar para o animal dispersor. Além disso, mesmo nas espécies das Bromelioideae núcleo com apêndice calazal inconspícuo como os nidularioides, nos quais a sarcotesta é fina e degradada enquanto ainda no fruto, a semente permanecendo envolta por mucilagem produzida nos lóculos do ovário, o que também pode contribuir para sua adesão. A ausência de mucilagem nos lóculos do ovário ou envolvendo a semente e apêndices inconspícuos, são importantes características das linhagens sem tanque, as quais podem ter estratégias diferentes para a dispersão da semente. Por exemplo, a presença de grãos de proteína na rafe succulenta exclusiva de *Cryptanthus*, pode representar um importante investimento de energia para um gênero com frutos de pericarpo fino e não carnosos. Análises histoquímicas e ontogenéticas do fruto, combinados com a busca pelos dispersores naturais, será essencial para elucidar a implicação das morfologias e substâncias armazenadas distintas encontradas nas sementes de Bromelioideae.

## Conclusões

A análise anatômica do envoltório da semente em Bromelioideae revelou ao menos 33 caracteres anatômicos variáveis. Estes caracteres são relevantes no reconhecimento de mecanismos que grupos específicos evoluíram para proteção e dispersão do embrião, além de refinar a delimitação de algumas espécies e, especialmente, gêneros e agrupamentos supragenéricos. Os caracteres mais conservados, como a constituição das paredes celulares da endotesta, se mostraram relevantes no reconhecimento das principais linhagens de Bromelioideae, e são potenciais marcados morfológicos para estes grupos. Representantes das linhagens sem tanque possuem

sementes tégmico-endotestais. Os padrões de espessamento e ornamentação das paredes celulares da endotesta, as características do exotégmen e número de camadas do parênquima na rafe foram os caracteres mais relevantes na delimitação de espécies e gêneros, especialmente entre os cryptanthoides. As Bromelioideae núcleo possuem sementes exclusivamente tégmicas. A presença e formato do apêndice calazal, número de camadas e características anatômicas da testa, os padrões de espessamento do exotégmen e número de camadas de parênquima na rafe foram os caracteres mais variáveis nesse grupo. A presença de mucilagem nos lóculos do ovário e envolvendo a semente é comum nas Bromelioideae núcleo, e é normalmente secretada pelo obturador após a fecundação, exceto em *Aechmea tocantina* e espécies de *Araeococcus*, a qual é secretada pelo apêndice calazal secretor, uma variação estrutural e função registrado aqui pela primeira vez em Bromeliaceae. A análise ontogenética foi essencial para confirmação da homologia morfológica entre as camadas do envoltório da semente nos diferentes grupos analisados, e pode ser expandida principalmente entre os cryptanthoides com tégmen costado. A análise anatômica ontogenética do envoltório da semente e embrião em outros gêneros de Bromelioideae e subfamílias de Bromeliaceae pode gerar dados informativos para futuras abordagens filogenéticas integrativas e análises de evolução de caracteres.

### **Agradecimentos**

Nós agradecemos a Natividad Ferreira Fagundes pelo acesso à coleção de Bromeliaceae do Jardim Botânico de Porto Alegre, Rafaela Campostrini Forzza por fornecer amostras herborizadas pertencentes ao herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, e Jones Caldas da Silva por providenciar inúmeras amostras de sua coleção viva. Nós também agradecemos Ivón Mercedes Ramírez Morillo pelas amostras de

*Bromelia karatas* e Anderson Santos de Mello pelas amostras de *Billbergia zebrina*. Nós agradecemos ao Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio técnico. Nós também agradecemos à Fernanda Mayara Nogueira, Rafaela Campostrini Forzza, Sofia Aumond Kuhn e aos três revisores anônimos pela revisão do manuscrito. Esse estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bolsas número 141695/2019-6 (J.D.T.C.) e 303840/2019-6 (J.E.A.M.).

## Referências

- Aguirre-Santoro J. 2017.** Taxonomy of the *Ronnbergia* Alliance (Bromeliaceae: Bromelioideae): new combinations, synopsis, and new circumscriptions of *Ronnbergia* and the resurrected genus *Wittmackia*. *Plant Systematics and Evolution* **303**: 615-640.
- Aguirre-Santoro J, Michelangeli FA, Stevenson DW. 2016.** Molecular phylogenetics of the *Ronnbergia* Alliance (Bromeliaceae, Bromelioideae) and insights into their morphological evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **100**: 1-20.
- Benzing DH. 2000.** *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ballego-Campos I, Forzza RC, Paiva EA. 2020.** More than Scales: Evidence for the Production and Exudation of Mucilage by the Peltate Trichomes of *Tillandsia cyanea* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). *Plants* **9**: 763.
- Ballego-Campos I, Paiva ÉAS. 2018.** Mucilage secretion in the inflorescences of *Aechmea blanchetiana*: Evidence of new functions of scales in Bromeliaceae. *Flora* **246**: 1-9.
- Carvalho JDT, Essi L, Oliveira JMS. 2017.** Flower and floral trichome morphology of species of *Dyckia* Schult. f. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae), and their importance to species characterization and genus taxonomy. *Acta Botanica Brasilica* **31**: 29-41.

- Carvalho JDT, Oliveira JMS, Freitas CC, Martins MS. 2016.** Stamen morphoanatomy of *Dyckia* Schult. F. (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) species: new data for taxonomic use. *Acta Botanica Brasilica* **30**: 389–400.
- Carvalho JDT, Mariath JEA. 2021a.** Embryo and endosperm development in *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel (Bromelioideae-Bromeliaceae) and its implications for the embryonomy of Bromeliaceae. *Flora* **281**: 151867.
- Carvalho JDT, Mariath JEA. 2021b.** Anatomia do envoltório seminal em espécies de Bromelioideae (Bromeliaceae). In: *LXXII Congresso Nacional de Botânica e XIII Encontro de Botânicos do Centro - Oeste*.
- Coan AI, Alves MV, Scatena VL. 2008.** Comparative study of ovule and fruit development in species of *Hypolytrum* and *Rhynchospora* (Cyperaceae, Poales). *Plant systematics and evolution* **272**: 181-195.
- Coan AI, Scatena VL. 2004.** Embryology and seed development of *Blastocaulon scirpeum* and *Paepalanthus scleranthus* (Eriocaulaceae). *Flora* **199**: 47-57.
- Corner EJH. 1976.** *The Seeds of Dicotyledons: Volume 1 (Vol. 1)*. Cambridge: Cambridge University Press.
- De Pinna MC. 1991.** Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. *Cladistics* **7**: 367-394.
- Escobedo-Sarti J, Ramirez I, Leopardi C, Carnevali G, Magallón S, Duno R, Mondragón D. 2013.** A phylogeny of Bromeliaceae (Poales, Monocotyledoneae) derived from an evaluation of nine supertree methods. *Journal of Systematics and Evolution* **51**: 743-757.
- Evans TM, Jabaily RS, Faria, APG, Sousa LOF, Wendt T, Brown GK. 2015.** Phylogenetic relationships in Bromeliaceae subfamily Bromelioideae based on chloroplast DNA sequence data. *Systematic Botany* **40**: 116–128.
- Fagundes NF, Mariath JEA. 2014.** Ovule ontogeny in *Billbergia nutans* in the evolutionary context of Bromeliaceae (Poales). *Plant Systematics and Evolution* **300**: 1323–1336.
- Givnish TJ, Pires JC, Graham SW, McPherson MA, Prince LM, Patterson TB, Rai HS, Roalson EH, Evans TM, Hahn WJ, Millam KC, Meerow AW, Molvray M, Kores PJ, O'Brien HE, Hall JC, Kress WJ, Sytsma KJ. 2005.** Repeated evolution of net venation and fleshy fruits among monocots in shaded habitats confirms a priori predictions: evidence from an ndhF phylogeny. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **272**: 1481–1490.

- Gerrits PO, Smid L. 1983.** A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* **132**: 81–85.
- Givnish TJ, Millam K, Berry PE, Sytsma, KJ. 2007.** Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae Inferred from ndhF sequence data. *Aliso* **23**: 3–26.
- Givnish TJ, Barfuss MH, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JA, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2011.** Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* **98**: 872–895.
- Gouda EJ, Butcher D, Gouda CS. 2022. (Continuously updated)** Encyclopaedia of Bromeliads, version 4 (2018) Available online <https://bromeliad.nl/encyclopedia/>(accessed 09 august 2022).
- Heller S. 2018.** *Systematics, phylogeny, evolution and biogeography of Eu-Bromelioideae and genome size evolution in Bromeliaceae*. PhD Dissertation, Faculty of Bioscience of the Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt.
- Heller S, Leme E, Schulte K, Benko-Iseppon AM, Zizka G. 2015.** Elucidating phylogenetic relationships in the *Aechmea* alliance: AFLP analysis of *Portea* and the *Gravisia* complex (Bromeliaceae, Bromelioideae). *Systematic Botany* **40**: 716-725.
- Johansen DA. 1940.** *Plant Microtechnique*. New York and London: McGraw-Hill Book Co.
- Karnovsky MJ. 1965.** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **27**: 1A-149A.
- Kuhn SA, Nogueira FM, Chauveau O, Mariath JEA. 2020.** Diversity and evolutionary trends of the ovary and ovule in Bromeliaceae. *Flora* **272**: 151691.
- Kuhn SA, Nogueira FM, Fagundes NF, Mariath JEA. 2016.** Morphoanatomy of the ovary and ovule in Bromeliaceae subfamily Tillandsioideae and its systematic relevance. *Botanical Journal of the Linnean Society* **181**: 343–361.
- Leme EMC. 1997.** *Canistrum – Bromeliads of the Atlantic Forest*. Rio de Janeiro: Salamandra.
- Leme EMC. 1998.** *Canistropsis – Bromeliads of the Atlantic Forest*. Rio de Janeiro: Salamandra.

- Leme EMC. 2000.** *Nidularium – Bromeliads of the Atlantic Forest*. Rio de Janeiro: Sextante.
- Leme EMC, Siqueira-Filho JA. 2006.** Taxonomia das bromélias dos fragmentos de Mata Atlântica de Pernambuco e Alagoas. In: Siqueira-Filho JA, Leme EMC, eds. *Fragmentos de Mata Atlântica do nordeste, biodiversidade, conservação e suas bromélias*. Rio de Janeiro: A. Jakobsson Estúdio, 190–381.
- Leme EMC. 2009.** Notes on *Alcantarea*: A new medium-sized species and additions to *A. roberto-kautskyi*. *Journal of the Bromeliad Society* **59**: 19–27.
- Leme EMC, Heller S, Zizka G, Halbritter H. 2017.** New circumscription of *Cryptanthus* and new Cryptanthoid genera and subgenera (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on neglected morphological traits and molecular phylogeny. *Phytotaxa* **318**: 1–88.
- Leme EMC, Zizka G, Paule J, Aguirre-Santoro J, Heller S, Ramírez-Morillo IM, Halbritter H, Mariath JEA, Carvalho JDT, Forzza RC. 2021.** Re-evaluation of the Amazonian *Hylaeaicum* (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on neglected morphological traits and molecular evidence. *Phytotaxa* **499**: 1-60.
- Leme EMC, Zizka G, Souza EH, Paule J, Carvalho JDT, Mariath JEA, Halbritter H, Ribeiro OBC. 2022.** New genera and a new species in the “Cryptanthoid Complex” (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on the morphology of recently discovered species, seed anatomy, and improvements in molecular phylogeny. *Phytotaxa* **544**: 128-170.
- Magalhães RI, Mariath JEA. 2012.** Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* **298**: 1881–1895.
- McDowell EM, Trump BR. 1976.** Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **100**: 405–414.
- Nakamura AT, Longhi-Wagner HM, Scatena VL. 2009.** Desenvolvimento de óvulo, fruto e semente de espécies de Poaceae (Poales). *Brazilian Journal of Botany* **32**: 165-176.
- Nogueira FN, Fagundes NF, Kuhn SA, Fregonesi JN, Mariath JEA. 2015.** Ovary and ovule anatomy in nidularioid complex and its taxonomic utility (Bromelioideae: Bromeliaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**: 66–77.
- O’Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.

- Paiva EAS. 2016.** How do secretory products cross the plant cell wall to be released? A new hypothesis involving cyclic mechanical actions of the protoplast. *Annals of Botany* **117**: 533-540.
- Paiva EAS, Pinho SZ, Oliveira DMT. 2011.** *Large Plant Samples: How to Process for GMA Embedding?* In: Chiarini-Garcia H, Melo R, eds. *Light Microscopy. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Totowa: Humana Press.
- Paule J, Heller S, Maciel JR, Monteiro RF, Leme EM, Zizka G. 2020.** Early diverging and core Bromelioideae (Bromeliaceae) reveal contrasting patterns of genome size evolution and polyploidy. *Frontiers in plant science* **1295**.
- Palací CA, Brown GK, Tuthill DE. 2004.** The seeds of *Catopsis* (Bromeliaceae: Tillandsioideae). *Systematic Botany* **29**: 518-527.
- Rao AN, Wee YC. 1979.** Embryology of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. *New Phytologist* **83**: 485-497.
- Schulte K, Barfuss MHJ, Zizka G. 2009.** Phylogeny of Bromelioideae (Bromeliaceae) inferred from nuclear and plastid DNA loci reveals the evolution of the tank habit within the subfamily. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **51**: 327-339.
- Silva KR, Stützel T, Oriani A. 2020.** Seed development and its relationship to fruit structure in species of Bromelioideae (Bromeliaceae) with fleshy fruits. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**: 868-886.
- Silvestro D, Zizka G, Schulte K. 2014.** Disentangling the effects of key innovations on the diversification of Bromelioideae (Bromeliaceae). *Evolution* **68**: 163-175.
- Smith LB, Downs RJ. 1974.** *Pitcairnioideae (Bromeliaceae)*. In: *Flora Neotropica* **14**: 1-658.
- Spjut RW. 1994.** *A systematic treatment of fruit types*. New York: New York Botanical Garden.
- Venturelli M, Bouman F. 1988.** Development of ovule and seed in Rapateaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **97**: 267-294.
- Vidal BC. 1970.** Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. *Annales d'histochimie* **15**: 289-296.

## Capítulo IV

### Desenvolvimento do embrião e do endosperma em *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel (Bromelioideae - Bromeliaceae) e suas implicações para a embriologia de Bromeliaceae

Flora 281 (2021) 151867



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

**Flora**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/flora](http://www.elsevier.com/locate/flora)





### Embryo and endosperm development in *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel (Bromelioideae - Bromeliaceae) and its implications for the embryology of Bromeliaceae

Jordano Dorval Tavares de Carvalho<sup>\*</sup>, Jorge Ernesto de Araujo Mariath

Laboratório de Anatomia Vegetal, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEP, 91609-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

---

**ARTICLE INFO**

*Keywords:*  
Embryogenesis  
embryogeny  
helobial endosperm  
Monocots  
Poales  
zygote

**ABSTRACT**

The proposition of patterns, types, and variations for embryogenic events is one of the objectives of embryology. Bromeliaceae is a diverse neotropical plant family for which this approach has been ambiguously and rarely discussed in detail. In this study, we analyzed the embryogeny and endospermogenesis of *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel, a bromeliad worldwide known as ornamental and with no embryogenic studies recorded to date. Seeds of *B. nutans* were periodically collected after manual pollination and processed with standard methods for analysis under light microscopy. Among other embryogenic characteristics, we highlight the longitudinal division of *ca* and its major contribution to the formation of the embryo, the presence of hypophysis derived from *m*, and the formation of the first internal cells of the proembryo from *q*. Endospermogenesis is helobial, and the cellularization in each chamber occurs at specific stages of the embryogenesis. The embryonic number is 211 and the embryonomic formula  $ca = pco + phy + pvt + icc$ ;  $cb = iec + ico + co + s$ , typical of the Onagrad Type. This classification is unprecedented for Bromeliaceae, although it can be contradictorily applied to other species of the family. Special embryogenic characteristics of *B. nutans*, as the contribution of *n* in the formation of the root cap and the longitudinal divisions in the suspensor cells, led to the proposal of a new variation for this type: the *Billbergia* Variation, which also can be applied to some other Bromeliaceae species.

## RESUMO

A proposição de padrões, tipos e variações para os eventos embriogênicos é um dos objetivos da embrionomia. Bromeliaceae é uma diversa família de plantas neotropical, para o qual essa abordagem tem sido ambigualmente e raramente discutida em detalhes. Neste estudo, nós analisamos a embriogenia e endospermogênese em *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel, uma bromélia conhecida mundialmente como ornamental e sem estudos embriogênicos realizados até o momento. Sementes de *B. nutans* foram coletadas periodicamente após polinização manual e processadas com métodos padrões para análise sob microscopia de luz. Entre outras características embriogênicas, nós destacamos a divisão longitudinal de *ca* e sua maior contribuição na formação do embrião, a presença de hipófise derivada de *m*, e a formação das primeiras células internas do proembrião em *q*. A endospermogênese é helobial, e a celularização em cada câmara ocorre em estágios específicos da embriogênese. O número embriônico é 211 e a fórmula embriônica  $ca = pco + phy + pvt + icc$ ;  $cb = iec + ico + co + s$ , típica do Tipo Onagráceo. Esta classificação é inédita para Bromeliaceae, embora possa ser contraditoriamente aplicada a outras espécies da família. Características embriogênicas especiais de *B. nutans*, como a contribuição de *n* na formação da coifa e as divisões longitudinais nas células do suspensor, levaram à proposição de uma nova variação para esse Tipo: a Variação *Billbergia*, a qual pode ser aplicada a outras espécies de Bromeliaceae.

**Palavras-chave:** embriogênese - embriogenia - endosperma helobial - Monocotiledôneas - Poales - zigoto

## Introdução

O desenvolvimento do embrião em angiospermas envolvem eventos complexos de segmentação e destinação celular, normalmente regulares e conservados, principalmente em estágios iniciais da embriogênese (Johansen, 1950; Johri, 1984). A Embriogenia é um ramo especial da Embriologia que descreve essas regularidades, a partir da primeira divisão do zigoto até os estágios finais de diferenciação do embrião (Johansen, 1950; Johri, 1984). A descrição dessas fases é baseada em leis relativas à origem, disposição e destinação celular, as quais devem ser avaliadas parcimoniosamente em uma investigação embriogênica (Souèges, 1937; Johansen, 1950). A Embrionomia é um ramo da Embriogenia que determina a extensão pela qual essas leis são expressas em espécies, gêneros ou famílias de plantas (Johansen, 1950; Johri, 1984), se cada órgão do embrião se originar de blastômeros (células iniciais) específicos. Essa abordagem tem um caráter essencialmente teórico e é fundamental para a classificação dos eventos embriogênicos e estudos comparativos (Johri *et al.*, 1992; Batygina, 2005).

Sistemas embrionômicos clássicos são baseados nos planos de divisão celular na embriogênese inicial e/ou na destinação dessas primeiras células na formação do embrião propriamente dito e o suspensor (Schnarf, 1929; Souèges, 1939; Souèges, 1941; Johansen, 1950). Para isso, fórmulas diagramáticas e diagramas ilustram alguns arquétipos os quais, no caso do sistema de Johansen (Johansen, 1950) representam seis tipos e muitas variações expandidas de Schnarf (1929). Esse sistema é o mais simples e mais amplamente utilizado para angiospermas, apesar das dificuldades metodológicas envolvendo o acompanhamento das linhagens celulares a partir do zigoto (Periasamy, 1977; Johri *et al.*, 1992). Embora negligenciada na maioria dos estudos embriogênicos, um sistema mais recente proposto por Periasamy (1977) permite uma outra perspectiva

sobre os eventos embriogênicos. Esse sistema prioriza os primeiros eventos de internalização celular no proembrião. De acordo com esse autor, a primeira formação de células completamente internalizadas é um evento morfogênico crítico em nível celular na embriogenia das angiospermas. Nessa classificação, a combinação de três dígitos no “número embriônico” gera algumas informações sobre a internalização celular no proembrião, fornecendo um critério de classificação significativo (Johri, 1984).

Devido às dificuldades metodológicas na abordagem embrionômica, investigações embriogênicas normalmente abordam uma única espécie, não sendo sempre possível reconhecer as linhagens celulares e a indicação precisa dos eventos embriogênicos a partir de fórmulas e diagramas em detalhe. Da mesma maneira, mesmo que a fórmula numérica de Periasamy (Periasamy, 1977) não necessite monitoramento de todos os estágios da embriogênese, é necessário estabelecer a formação das primeiras células internas do proembrião, um evento que não é sempre descrito. Essas dificuldades metodológicas e teóricas, levam à ambiguidades que impedem a correta interpretação embrionômica, e a classificação embriogênica se torna hipotética em muitos casos. Apesar disso, uma vez que os estágios embriogênicos são devidamente ilustrados, a classificação embrionômica é extremamente importante no reconhecimento de grupos proximalmente relacionados, como ocorre em diferentes gêneros e famílias de angiospermas (Johansen, 1950; Periasamy, 1977; Johri, 1984).

Esse contexto pode ser aplicado a Bromeliaceae Juss., uma família de monocotiledôneas da ordem Poales, compreendendo 77 gêneros e aproximadamente 3630 espécies (Gouda *et al.*, 2018, continuamente atualizado). Em Bromeliaceae, a embrionomia como uma ampla discussão dos padrões embriogênicos tem sido negligenciada desde Johansen (1950), que abordou a caracterização de uma única espécie da família. Desde então, tentativas de classificação embriogênica têm sido, em sua

maioria hipotética em investigações embriológicas gerais (esporogênese - gametogênese), onde a ausência de estágios importantes da embriogênese tem impedido uma interpretação embrionômica e questionado sua classificação (Billings, 1904; Birge, 1911; Rao & Wee, 1979). Os dados embriogênicos nessa família são ambíguos, fragmentados, e frequentemente pouco compreendidos para seis espécies somente; *Tillandsia usneoides* (L.) L. (Billings, 1904), *Tillandsia recurvata* (L.) L. (Birge, 1911), *Ananas comosus* (L.) Merr (Rao & Wee, 1979), *Vriesea carinata* Wawra (Sartori, 2008), *Dyckia pseudococcinea* L.B. Sm. (Mendes *et al.*, 2010) e *Pitcairnia encholirioides* L.B. Sm (Mendes *et al.*, 2018). Essas espécies pertencem a gêneros de três diferentes subfamílias e, aparentemente, compartilham eventos embriogênicos similares (Mendes *et al.*, 2018). Desde então, a maioria destes estudos tem proposto o Tipo Asteráceo de desenvolvimento embrionômico (nenhuma variação tem sido proposta), o que poderia significar uma potencial generalização embrionômica para a família, como já proposto para algumas famílias de monocotiledôneas, incluindo Bromeliaceae (Johri, 1984; Johri *et al.*, 1982; Batygina, 2005). Em Poales, por exemplo, espécies de diferentes gêneros e subfamílias compartilham o mesmo tipo e variação embrionômicos em Poaceae Barnhart (Johansen, 1950; Deshpande, 1976), Eriocaulaceae Martinov (Johansen, 1950; Ramaswamy & Arekal, 1982), Juncaceae Juss. (Souèges, 1933; Johansen, 1950; Munro & Linder, 1997), e Cyperaceae Juss. (Johansen, 1950; Padhye & Makde, 1982). Por outro lado, apenas em dois casos em Bromeliaceae as linhagens celulares e contribuições celulares relativas do proembrião bicelular na formação do embrião foram devidamente delimitadas (Mendes *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2018). No entanto, a ausência ou não aplicabilidade das leis e fórmulas embrionômicas, mesmo nesses estudos, torna necessário revisar os conceitos embrionômicos mais elementares para essa família.

*Billbergia* Thunb. é um gênero de Bromeliaceae (Bromelioideae) com aproximadamente 60 espécies, a maioria ornamental (Gouda *et al.*, 2018, continuamente atualizado). *B. nutans* H. Wendl. ex Regel (Fig. 1) é naturalmente distribuída no sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e nordeste da Argentina (Smith & Downs, 1974).



**Figura 1.** *Billbergia nutans* em período de floração. A: Hábito; B: flores, vista lateral. Barras: 1 cm.

Essa é uma das espécies de bromélia mais bem conhecidas e mais cultivadas ao redor do mundo, provavelmente devido à atratividade de suas flores e fácil cultivo (McWilliams, 1968; Fagundes & Mariath, 2014). Essa espécie já teve aspectos profundos da sua embriologia e anatomia investigados (Fagundes, 2013), sendo também uma das únicas plantas a ter seu gametófito feminino reconstruído em 3D (Fagundes & Mariath, 2014). Em contraste, eventos embriogênicos e endospermogênicos permanecem desconhecidos em *Billbergia* e gêneros proximalmente relacionados (Fagundes & Mariath, 2014). Assim, levando em conta as ambiguidades na classificação embrionômica em Bromeliaceae e a

ausência de estudos embriogênicos em *B. nutans*, nós conduzimos uma detalhada investigação embriogênica para essa espécie, com os seguintes objetivos: 1) descrever a embriogenia de *B. nutans* e sua sincronia com a endospermogênese; 2) propor uma classificação embrionômica para *B. nutans* baseada em diferentes sistemas embrionômicos; e 3) revisar a classificação embrionômica para espécies de Bromeliaceae previamente investigadas.

## Material e Métodos

### *Amostragem*

Onze indivíduos de *Billbergia nutans* H. Wendl ex Regel foram obtidos de diferentes locais no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Tab. 1), e mantidos na coleção viva do Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Dois espécimes herborizados no Herbário ICN foram selecionados como vouchers (Tab. 1). Todos os indivíduos foram polinizados manualmente durante o completo desenvolvimento da inflorescência (duas a três semanas) para garantir a produção de sementes. Um total de 60 frutos em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados em dois eventos de frutificação, entre julho e agosto de 2018 e 2019.

**Tabela 1.** Indivíduos, vouchers e seus respectivos locais de origem.

Número de registro	Local de origem
Coleção viva do LAVeg (UFRGS) - Indivíduos amostrados	
CV0289	Nova Petrópolis, RS, Brazil
CV0290	Maquiné, RS, Brazil
CV0291	Derrubadas, RS, Brazil
CV0292	Nova Petrópolis, RS, Brazil
CV0293	Maquiné, RS, Brazil

CV0297	Derrubadas, RS, Brazil
CV0298	Canela, RS, Brazil
CV0299	Derrubadas, RS, Brazil
CV0300	Santa Cruz do Sul, RS, Brazil
CV0301	Derrubadas, RS, Brazil
Herbário ICN- Vouchers	
ICN 190645	Nova Petrópolis, RS, Brazil
ICN 190646	Derrubadas, RS, Brazil

### *Preparação para microscopia de luz*

Todas as análises anatômicas foram realizadas no Laboratório LAVeg da UFRGS. Em diferentes estágios de desenvolvimento, frutos e sementes foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), modificada por McDowell & Trump (1976) (glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7.2) e após mantidas sob baixo vácuo por 24 horas. Subsequentemente, o material foi lavado no mesmo tampão, desidratado numa série crescente de etanol (10 a 100%), incluído em resina sintética 2-hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid, 1983), depois de um estágio intermediário de pré-inclusão em etanol absoluto e resina (1:1). Devido à dificuldade de incluir as sementes, antes da polinização, o material foi mantido em resina pura por 7 dias, após sendo mantido em freezer (24h) com catalisador (Paiva *et al.*, 2011). Seções transversais e longitudinais (4-6  $\mu\text{m}$ ) das sementes foram feitas usando micrótomo de rotação Zeiss Mikron HM 340 E. As seções foram depositadas em lâminas histológicas e secas em chapa aquecedora a 50° C. Para observação sob microscopia de luz, as seções de sementes maduras foram coradas com Azul de Toluidina O 0,05%, modificado por O'Brien *et al.* (1964) (pH 7.2 em tampão fosfato de sódio). Água foi usada como meio de montagem temporário, para manter as propriedades metacromáticas (O'Brien *et al.*, 1964). As seções de sementes imaturas até o estágio de embrião globular foram coradas com Azul de Toluidina O 0,5% e contrastadas com Fucsina Básica 0,1% (aquosa) e montadas em óleo de imersão. No endosperma maduro foi usado reagente de Lugol

(Johansen, 1940) para detectar amido, reagente de ácido periódico/Schiff (PAS) (O'Brien & McCully, 1981) para polissacarídeos, Sudan III para lipídeos (Johansen, 1940) (em seções à mão livre) e Xylidine-Ponceau para proteínas (Vidal, 1970). A análise e captura das imagens foram realizadas usando um microscópio Leica DMR, com câmera digital Zeiss AxioCam HRC, utilizando o programa de captura de imagens Axiovision SE 64 v 4.9.1. As figuras e diagramas foram produzidos com os programas Photoshop<sup>TM</sup> e Vector Graphics Editor<sup>TM</sup>.

### *Terminologia e conceitos*

A terminologia usada neste trabalho foi proposta por Souèges (1937; 1939) e expandida por Johansen (1950), a qual é amplamente utilizada na descrição de ventos embrionômicos de angiospermas (Johri, 1984; Johri *et al.*, 1992). As fórmulas e leis propostas por estes autores (*i.e.*, Lei da Parcimônia, Lei da Origem, Lei dos Números, Lei da Disposição e Lei da Destinação) foram aplicadas para descrição e interpretação dos eventos embriogênicos em *B. nutans*. Os seguintes elementos foram utilizados na fórmula embrionômica: *ca*: célula apical, resultante da primeira divisão do zigoto; *cb*: célula basal, resultante da primeira divisão do zigoto; *m*: célula mediana ou linhagem mediana, derivada de *cb*; *ci*: célula inferior, derivada de *cb*; *q*: linhagem quadrante (e suas derivadas), derivada de *ca*; *l*: linhagem superior derivada de *q*; *l'*: linhagem inferior derivada de *q*; *n*, *o*, *p*: linhagens derivadas de *ci*; *pco*: cotilédone; *pvt*: epicótilo (ápice caulinar); *phy*: região hipocotilar; *icc*: iniciais do cilindro central do hipocótilo (iniciais do pleroma); *iec*: iniciais do cilindro central (meristema provascular) do córtex da raiz; *ico*: iniciais da coifa; *co*: coifa; *s*: suspensor.

Os seguintes conceitos foram utilizados para evitar equívocos terminológicos, baseados em Johansen (1950):

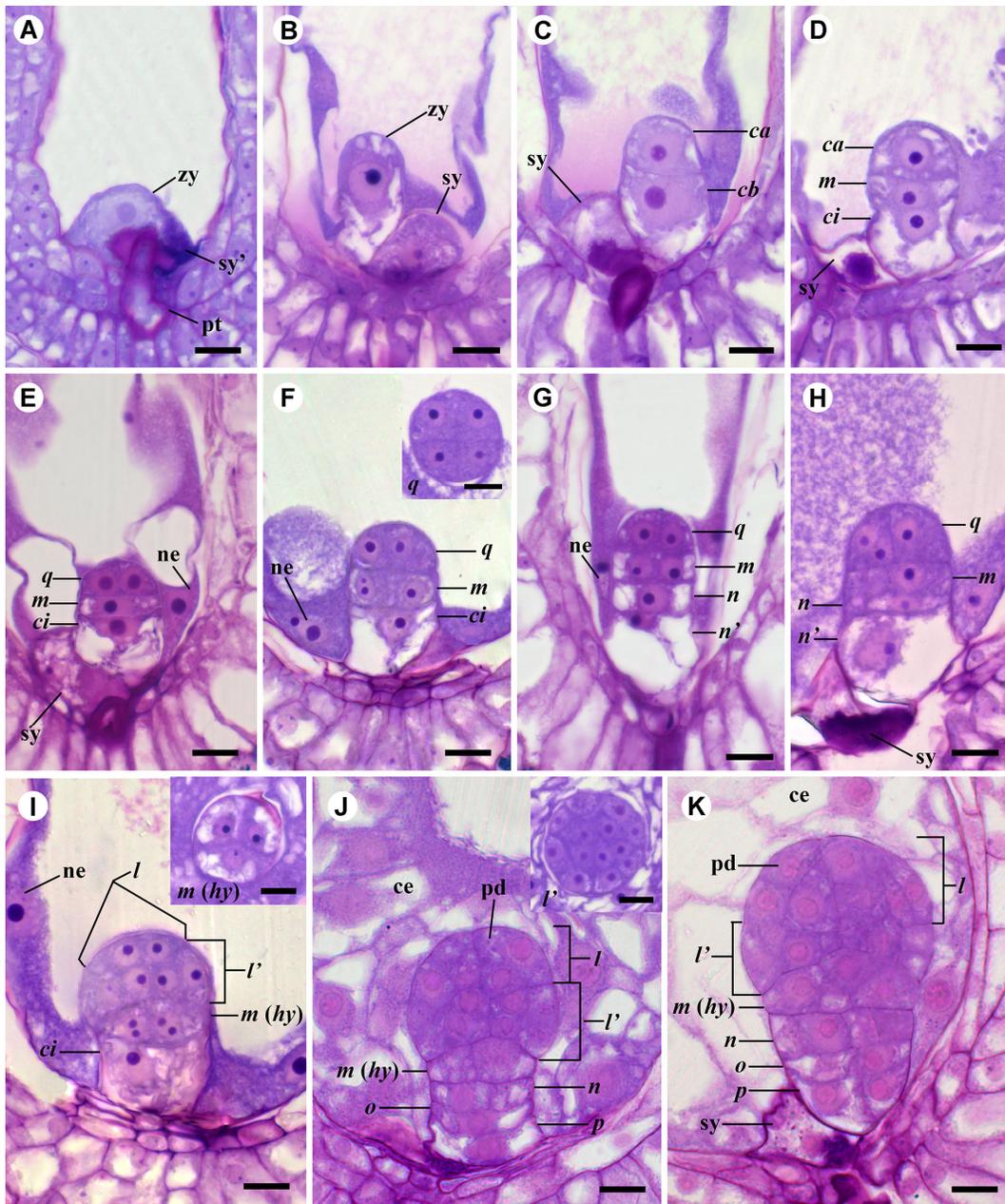
- a) Embriogênese: estágios iniciais da embriogenia, da primeira divisão do zigoto ao desenvolvimento da protoderme;
- b) Embriogenia: compreende todos os estágios do desenvolvimento do embrião, incluindo a embriogenia inicial ou embriogênese;
- c) Embrionomia: a exposição teórica dos eventos embriogênicos, incluindo os sistemas de classificação.

Para a classificação embrionômica, além do sistema de Johansen (Johansen, 1950), o qual designa tipos e variações baseadas em chaves propostas pelo autor, nós utilizamos o sistema numérico proposto por Periasamy (1977) para caracterizar o proembrião logo após a formação das primeiras células internas propriamente ditas. O número embrionômico tem três dígitos que se referem a: a) Grupo - pelo número de linhagens do proembrião; b) Série - pelo número de células e posição de determinada linhagem (terminal ou subterminal), antes da segmentação das primeiras células internas; c) Variação - pela localização (terminal ou subterminal) das primeiras células internas. Uma linhagem é definida como células ou camadas de células com divisões longitudinais, ou camadas basais do proembrião sem divisões longitudinais (iniciais do suspensor).

## **Resultados**

### *Embriogenia*

Após a fecundação, o zigoto se alonga e adquire polaridade (Fig. 2A-B), desenvolvendo um considerável vacúolo basal no polo micropilar e um proeminente núcleo no polo calazal (Fig. 2B).

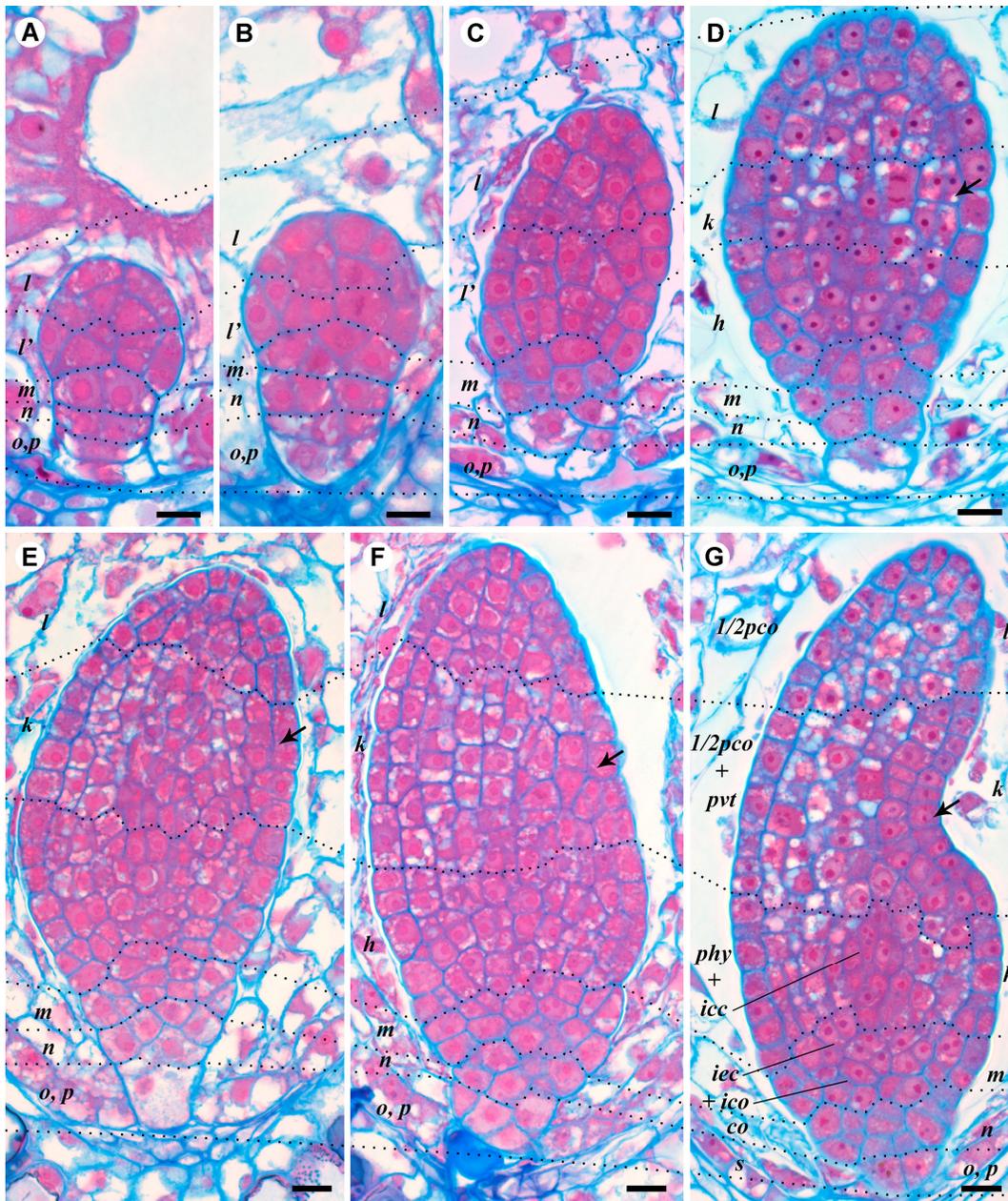


**Figura 2.** Embriogênese e desenvolvimento do embrião globular em *B. nutans*. A-I: estágios de proembrião. J-K: embrião globular. A-B: polarização do zigoto. C: proembrião bicelular. D: proembrião tricelular. E: proembrião tetraclular, em forma de T. F: proembrião de sete células após divisão longitudinal em *m*. Detalhe: seção transversal em *q*, mostrando as quadrantes. G: proembrião de oito células após divisão de *ci*; H: proembrião logo após a formação da primeira célula interna em *q*; I: proembrião pós-octante, quando *ci* ainda não está dividida transversalmente. Detalhe: seção transversal em *m* (tricelular). J: embrião globular após divisões da protoderme e das células internas de *q* (*l* e *l'*) (detalhe: seção transversal em *l'*). K: embrião globular após divisões oblíquas em *m* e *n* e divisões longitudinais em *o* e *p*. *ca*: célula apical; *cb*: célula basal; *ci*: célula inferior (derivada inferior de *cb*; *ce*: endosperma celular; *l*: camada superior derivada de *q*; *l'*: camada inferior derivada de *q*; *m*: célula ou linhagem mediana (derivada superior de *cb*); *m* (*hy*) hipófise derivada da linhagem *m*; *n*, *n'*: linhagens derivadas de *ci*; *o*, *p*: linhagens derivadas de *n'*; *pd*: protoderme inicial em *q*; *ne*: endosperma nuclear; *pt*: tubo polínico; *sy*: sinérgide persistente; *sy'*: sinérgide obliterada; *zy*: zigoto. Barras 10  $\mu$ m.

A embriogênese inicia com a primeira divisão transversal do zigoto, originando o proembrião bicelular com duas células sobrepostas (Fig. 2C): uma célula basal (micropilar), *cb*, e uma apical (calazal), *ca*. Devido à polaridade do zigoto a primeira divisão é assimétrica (Fig. 2C).

A célula basal (*cb*) divide-se então em duas células sobrepostas: *ci*, inferior e com grande vacúolo na base, e *m*, superior com vacuolização periférica (Fig. 2D). Um proembrião com três células sobrepostas é formado. A célula apical (*ca*) divide-se em duas células justapostas (*q*) originando um proembrião tetracelular em forma de T (Fig. 2E). Depois de outra divisão longitudinal de cada célula de *q*, o quadrante é formado (Fig. 2F). Ao mesmo tempo, *m* divide-se longitudinalmente pela primeira vez, gerando duas células justapostas (Fig. 2F-G); *ci* pode se dividir transversalmente, gerando duas células sobrepostas (Fig. 2G-H), *n* e *n'* (Fig. 2G), ou manter-se indivisa até estágios posteriores (Fig. 2I).

A embriogênese continua com mais divisões em *q*, o qual não gera diretamente octantes, uma vez que as divisões são assíncronas (Fig. 2H). Divisões paradérmicas ocorrem nas células de *q* o que gera precocemente as primeiras células internas do proembrião nessa linhagem (Fig. 2H). Deste ponto em diante, as células externas em *q* passam por divisões anticlinais, enquanto algumas divisões longitudinais e transversais podem ocorrer nas células internas (Fig. 2I-J). Assim, *q* passa a compreender duas linhagens sobrepostas: *l*, superior, e *l'*, inferior (Fig. 2I), e as iniciais da protoderme podem ser reconhecidas; as células na linhagem *m* passam por uma ou mais divisões oblíquas (Fig. 2I, detalhe). Neste ponto, a hipófise pode ser delimitada, sendo formada exclusivamente por *m* (Fig. 2I-K; 3A-B).



**Figura 3.** Embrião globular e embriogenia final em *B. nutans*. C, D: Alongamento do embrião globular. E-G: diferenciação do cotilédone, radícula, hipocótilo e epicótilo na embriogenia final. As linhas indicam os limites aproximados entre linhagens durante os estágios de desenvolvimento. *co*: coifa; *h*: linhagem inferior derivada de *l'* (hipocótilo); *icc*: iniciais do meristema provascular do hipocótilo; *ico*: iniciais da coifa; *iec*: iniciais do córtex e meristema provascular da radícula; *k*: linhagem superior derivada de *l'*; *l*: linhagem superior derivada de *q*; *l'*: linhagem inferior derivada de *q*; *m*: linhagem mediana (hipófise); *n*: linhagem derivada de *ci*; *o, p*: linhagens derivadas de *n'*; *pco*: cotilédone; *phy*: hipocótilo; *pyt*: epicótilo (ápice caulinar); *r*: radícula; *s*: suspensor. Seta: localização da emergência do epicótilo. Barras: 10  $\mu$ m.

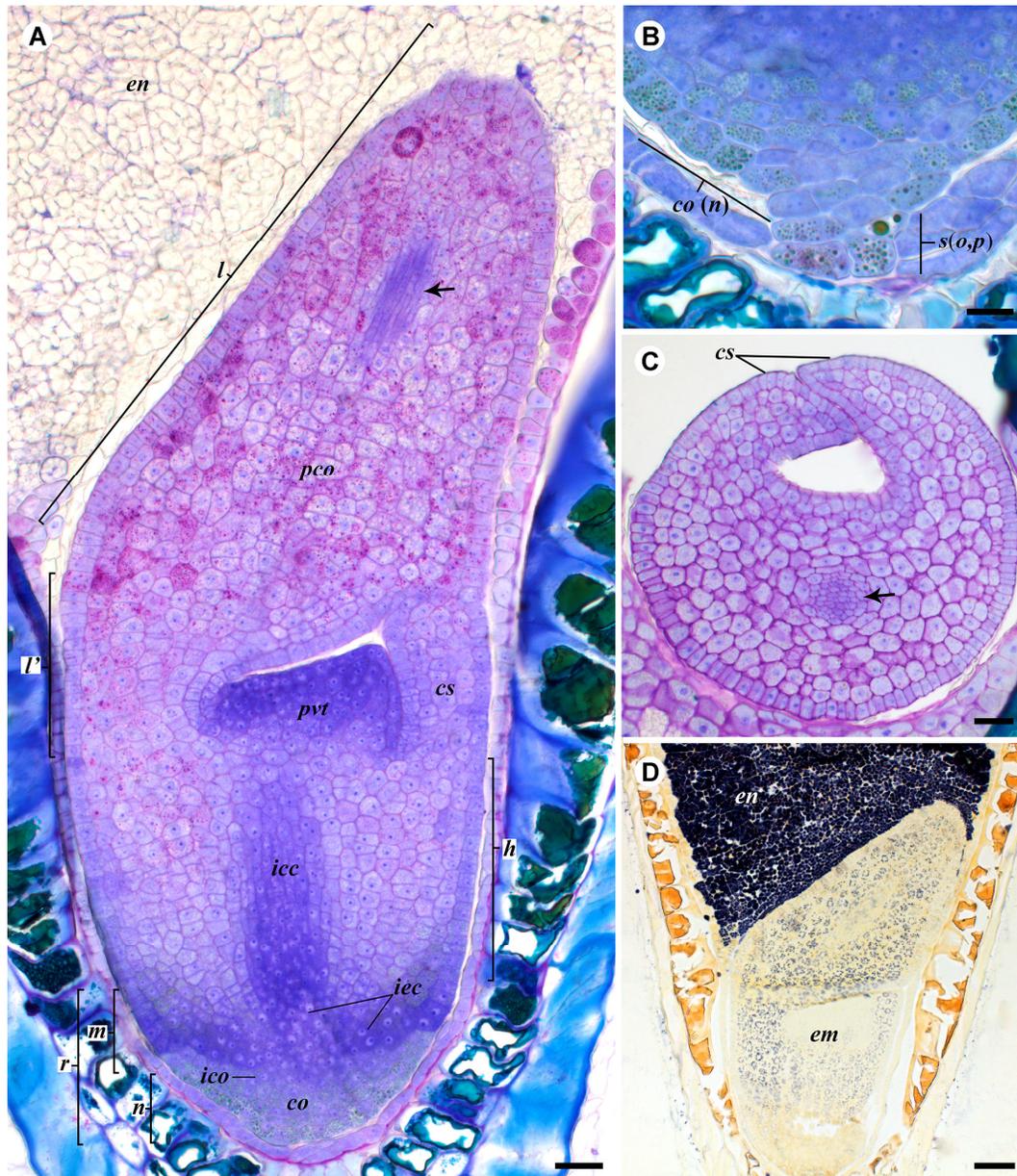
O fim da embriogenia inicial é marcada pela diferenciação da protoderme no embrião globular (Fig. 2J-K; 3A-B) e pela formação das primeiras células internas em *l*

(Fig. 2J; 3A);  $n'$  passa por divisões transversais, gerando duas células sobrepostas,  $o$  e  $p$  (Fig. 2J). Essas duas células passam por divisões longitudinais, gerando quatro células sobrepostas em duas linhagens, diretamente formando o suspensor (Fig. 2K). Nesse estágio é possível distinguir seis linhagens, do ápice para a base do embrião:  $l$  e  $l'$  (originadas de  $ca$ ),  $m$ ,  $n$ ,  $o$  e  $p$  (originadas de  $cb$ ), com a hipófise formando uma camada mediana exclusivamente por divisões oblíquas de  $m$  (Fig. 2J-K; 3A-C). Uma das sinérgides permanece intacta desde o desenvolvimento do zigoto até este estágio (Fig. 2K).

O estágio globular persiste até a formação de dois histogênios em  $l$  e  $l'$ : o periblema, abaixo da epiderme e um tecido mais profundo, o pleroma (Fig. 3C). Nesta fase, um alongamento assimétrico é notado (Fig. 3C):  $l'$  começa a apresentar mais camadas que  $l$  e se diferencia em duas regiões, uma superior ( $k$ ) e uma inferior ( $h$ ). Essas duas regiões inicialmente diferem pelos planos de divisão das suas células e pela posterior vacuolação:  $h$  apresenta divisões predominantemente longitudinais e células com citoplasma denso; e  $k$  com divisões transversais e oblíquas e células mais vacuoladas. Isso gera um alargamento do embrião em  $h$ , onde o hipocótilo será diferenciado, e o alongamento longitudinal em  $k$ , onde parte do cotilédone será diferenciado (Fig. 3C-D).

O alongamento assimétrico de  $k$  e  $l$  geram um cotilédone curvado (Fig. 3E-G). Na região oposta ao alongamento do cotilédone, uma depressão surge diferenciando uma região meristemática correspondente ao epicótilo (Fig. 3G). Simultaneamente, os limites entre hipocótilo, radícula e a formação dos primeiros elementos do meristema provascular no hipocótilo, podem ser percebidos (Fig. 3G). As seis linhagens do proembrião ( $l$ ,  $l'$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $o$ ,  $p$ ) correspondem, a partir daqui, a um elemento da organogênese final do embrião (Fig. 4A-B). Assim,  $l$  forma a porção apical do cotilédone ( $pc$ );  $l'$ , a região hipocotilar ( $h$ ) e a porção basal (hipofilo) ( $k$ ) do cotilédone ( $pc$ ), em conjunto com a bainha

cotiledonar (*cs*) e o epicótilo (*pvt*); *m* (hipófise) constitui a maior parte da radícula (*r*); *n*, parte da coifa (*co*) (três a cinco camadas de células) (Fig. 4A); *o* e *p* se diferenciam diretamente no suspensor (*s*), com pouca ou nenhuma proliferação celular e são sempre divididos longitudinalmente (Fig. 4B).

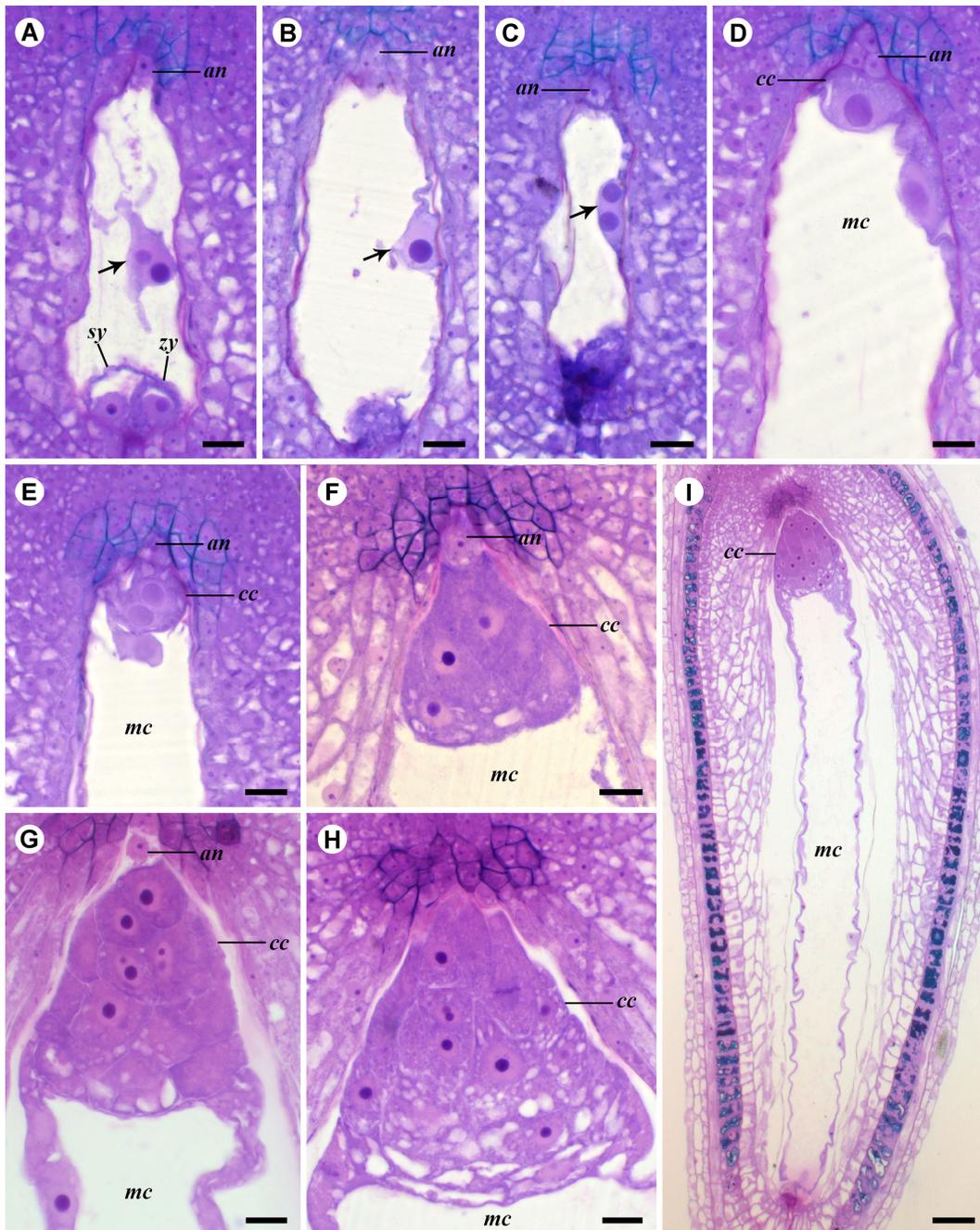


**Figura 4.** Embrião maduro de *B. nutans*. A: aspecto geral do embrião em seção longitudinal mediana. B: detalhe do suspensor e coifa. C: seção longitudinal na altura da bainha do cotilédone (*cs*). D: Teste de Reagente de Lugol, mostrando grãos de amido no endosperma e embrião. *co*: coifa; *cs*: bainha do cotilédone; *icc*: iniciais do meristema provascular do hipocótilo; *ico*: iniciais da coifa; *iec*: iniciais do córtex e meristema provascular da radícula; *em*: embrião; *em*: endosperma; *l*: linhagem superior derivada de *q*; *l'*: camada inferior derivada de *q*; *m*: linhagem mediana (hipófise); *n*: linhagem inferior derivada de *ci*; *pco*: cotilédone; *pvt*: epicótilo (ápice caulinar). Setas: células provasculares do cotilédone. Barras: A: 25  $\mu$ m; B, C: 10  $\mu$ m; D: 50  $\mu$ m.

A maturação do embrião está completa quando, numa depressão na altura do nó cotiledonar, o meristema apical caulinar surge como único elemento do epicótilo (*pvt*), sem primórdios foliares se desenvolvendo nessa região (Fig. 4A). Simultaneamente, a bainha cotiledonar (*cs*) emerge como duas projeções que ocluem o epicótilo no nó cotiledonar (Fig. 4C). O cotilédone, hipocótilo e radícula começam a acumular compostos como amido e polissacarídeos pépticos (Fig. 4A, D). O embrião maduro, dessa forma, é uninodal e localizado na porção micropilar da semente. O longo cotilédone representa mais da metade do comprimento do embrião, possui um único feixe vascular, e se estreita em direção ao ápice. Devido a sua curvatura, o embrião é parcialmente lateralizado (Fig. 4A). O hipocótilo é formado pela epiderme, o meristema fundamental e pelo meristema provascular (*icc*). A radícula é formada pelo meristema apical radicular e suas iniciais (*iec*) e pela coifa e suas iniciais (*ico + co*), com quatro a cinco camadas de células (Fig. 4A-B).

### *Endospermogênese*

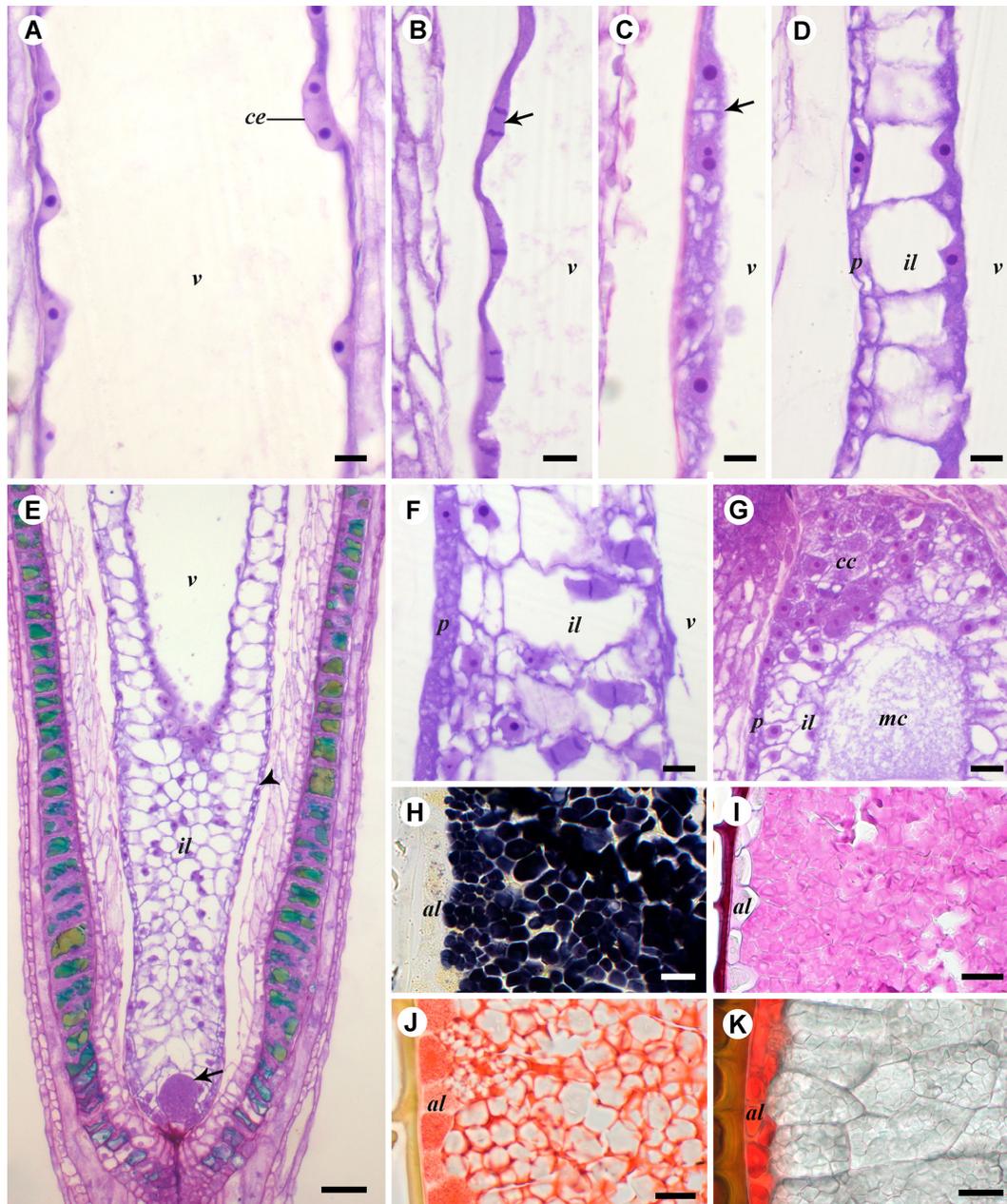
Durante a fecundação, um dos núcleos espermáticos funde-se com a oosfera, produzindo o zigoto (Fig. 5A). O outro núcleo espermático, passa por cariogamia com o núcleo polar (Fig. 5A), formando o núcleo primário do endosperma, ainda numa posição central (Fig. 5B). Uma única mitose ocorre no núcleo primário do endosperma durante a migração para o polo calazal da célula central (Fig. 5C). A primeira mitose resulta em duas câmaras assimétricas, uma calazal, menor em tamanho e contígua às ainda presentes antípodas (Fig. 5D), e uma micropilar, que ocupa a maior parte do endosperma. Nesta fase, a câmara micropilar mantém o núcleo no polo calazal do endosperma e um grande vacúolo se estende ao polo calazal (Fig. 5D).



**Figura 5.** Endospermogênese inicial em *B. nutans*. A-D: desenvolvimento do estágio bicelular. E-H desenvolvimento da câmara calazal. I: aspecto geral do endosperma antes da celularização da câmara micropilar. A: logo após a fertilização, cariogamia (seta) entre o núcleo espermático (com nucléolos menores) e o núcleo da célula mediana (com nucléolos maiores). No polo micropilar, o zigoto e uma das sinérgides. B: após cariogamia, o núcleo primário do endosperma (seta) migra para a periferia da célula central. C: Migração e mitose do núcleo primário do endosperma (seta). Mitose ocorre durante migração ao polo calazal. D: endosperma binucleado. O núcleo da célula micropilar continua próximo à câmara calazal. E: fase nuclear da câmara calazal. F, G: celularização da câmara calazal. H: alongamento e proliferação da célula. Em H, há uma placa metafásica próxima ao polo calazal. an: antípodas; cc: célula ou câmara calazal; mc: célula ou câmara micropilar; sy: sinérgide; zy: zigoto. Barras: A-H: 10  $\mu$ m; I: 50  $\mu$ m.

Na câmara calazal, o núcleo primário calazal passa por mitoses algumas vezes (Fig. 5E) antes de ocorrer a celularização (Fig. 5F), durante as primeiras divisões do zigoto. As células nessa câmara têm paredes primárias finas, um núcleo central e um denso citoplasma com poucos vacúolos na região de contato com as antípodas, mas numerosos vacúolos próximo à câmara micropilar (Fig. 5G-H). Divisões celulares, a maioria longitudinal e oblíqua, são concentradas nas células próximas à calaza, com divisões celulares tipicamente não ocorrendo próximo à câmara micropilar (Fig. 5H). Quando o seu máximo volume é alcançado, a câmara calazal apresenta um formato cônico (Fig. 5G-I).

Durante o desenvolvimento da câmara calazal, o núcleo da câmara micropilar passa por mitoses sucessivas, gerando um cenócito com um vacúolo amplo central e protoplasto periférico (Fig. 5I; 6A). Depois de algumas mitoses anticlinais (Fig. 6B), a celularização do cenócito ocorre. As primeiras células são formadas após um aumento na vacuolização do citoplasma, gerando paredes celulares anticlinais, individualizando as células nessa primeira camada (Fig. 6C). Subsequentemente, duas camadas assimétricas são formadas (Fig. 6D). A camada mais externa constitui a protoderme do endosperma, com células retangulares em seção, um núcleo central e proliferação anticlinal (Fig. 6D); e a camada mais interna, cujas células se alongam periclinamente e mantêm um vacúolo volumoso basal, com citoplasma e núcleo concentrados na sua face interna (Fig. 6D-F). Dessa forma, o aumento no número de camadas é centrípeto, com um grande vacúolo central, que se estreita em direção ao embrião (Fig. 6E). A celularização no polo da câmara micropilar nunca ocorre antes da formação do embrião globular, quando as células preenchem completamente a câmara na região próxima ao embrião. Em estágios iniciais da celularização, a epiderme do endosperma (*i.e.*, a camada de aleurona) é diferenciada (Fig. 6D-F).



**Figura 6.** Desenvolvimento da câmara micropilar do endosperma em *B. nutans*. A-B: estágio cenocítico. C-G: estágio celular. H-I: endosperma maduro com acúmulo de substâncias de reserva. A: detalhe do cenócito na porção mediana da câmara micropilar. B: mitose anticlinal, núcleo em anáfase (seta). C: celularização do cenócito, a seta indica uma parede celular anticlinal recém-formada. D: endosperma celular com duas camadas de células. E: região micropilar da câmara micropilar, onde a proliferação celular já está completa. Seta: embrião globular. Cabeça de seta: protoderme. F: endosperma celular em na diferenciação da protoderme. Citocinese em planos periclinais e oblíquos. G: Região calazal do endosperma, onde a câmara calazal começa a colapsar. H: Endosperma com grãos de amido, evidenciado pelo Reagente de Lugol. Observa-se a ausência de grãos de amido na epiderme (camada de aleurona). I: endosperma com polissacarídeos restritos aos grãos de amido, evidenciado pela reação PAS. J: epiderme (camada de aleurona) e matriz celular com proteínas evidenciadas por Xylidine-Ponceau. K: epiderme (camada de aleurona) com lipídeos, corado com Sudan III. *al*: epiderme do endosperma (camada de aleurona); *cc*: câmara calazal; *ce*: cenócito; *il*: camadas internas de células da câmara micropilar; *mc*: câmara micropilar; *p*: protoderme; *v*: vacúolo (originalmente da célula central). Barras: A-D; F-I: 10  $\mu$ m; E: 50  $\mu$ m; J-K: 20  $\mu$ m.

A proliferação de camadas continua até que a câmara micropilar esteja completamente preenchida (Fig. 4A-D; 6F-G). O endosperma maduro acumula principalmente amido no parênquima (Fig. 6H-I), embora haja acúmulo de proteína na matriz citoplasmática, porém não formando grânulos (Fig. 6J). A epiderme (camada de aleurona) acumula proteínas e lipídeos (Fig. 6J-K).

## Discussão

### *Embrionomia de B. nutans e Bromeliaceae*

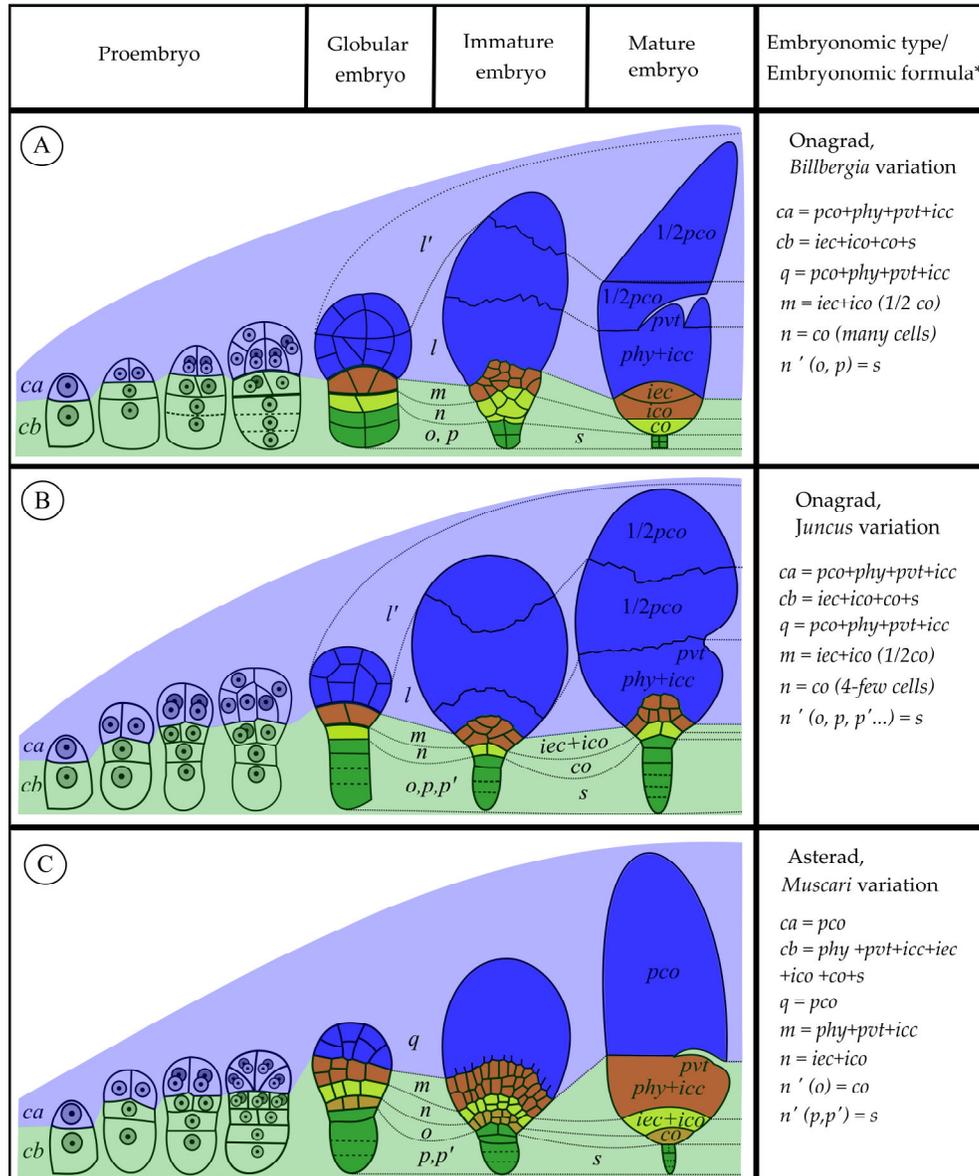
A embriogenia em *B. nutans* é do Tipo Onagráceo de desenvolvimento embriônico (Johansen, 1950), o que é corroborado pela primeira divisão do zigoto ser transversal, pela primeira divisão de *ca* ser longitudinal e por ter a fórmula embrionômica  $ca = pco + phy + pvt + icc$ ;  $cb = iec + ico + co + s$ . Além disso, outros caracteres embriogênicos corroboram a aplicação dessa tipologia, com a presença de hipófise correspondente à linhagem *m* (a qual apresenta divisões oblíquas) e a precoce formação das iniciais da protoderme em *q* (Johansen, 1950; Johri, 1984). Essa classificação é inédita para Bromeliaceae, embora a fórmula embrionômica e os eventos embriogênicos são contraditoriamente idênticas à outras espécies da família, como iremos discutir a seguir.

A classificação embrionômica de Johansen (1950), expandida a partir dos estudos de Schnarf (1929) e Souèges (1939; 1941), é alvo de algumas críticas (Johri, 1984; Johri *et al.*, 1992; Periasamy, 1977), dada a sua difícil aplicabilidade filogenética e complicado sistema de variações que não são sempre totalmente reconhecíveis. Além disso, ela envolve dificuldades metodológicas conspícuas, devido à necessidade de observar estágios embriogênicos específicos e a exata contribuição relativa das primeiras gerações

celulares na formação do embrião. Apesar disso, é o sistema mais amplamente utilizado para angiospermas (Johri, 1984; Johri *et al.*, 1982; Periasamy, 1977; Padhye & Makde, 1982; Venturelli & Bouman, 1986; Munro & Linder, 1997; Costa *et al.*, 2004, Chun-Ying & De-Zhu, 2005; Ross & Summer, 2005; Berg, 2009; Genovese-Marcomin *et al.*, 2014; Gonzalez, 2016; Kolomeitseva *et al.*, 2017; Nardi, 2018), especialmente para espécies onde a embriogênese foi investigada em detalhe, seguindo as leis embrionômicas, tal como *B. nutans*. Nesses casos, a classificação embrionômica pode ser crucial no reconhecimento de grupos estreitamente relacionados, especialmente quando ela é constante em um gênero ou família. Por exemplo, em Poales, provavelmente todas as Juncaceae e Cyperaceae analisadas até então (Johansen, 1950; Munro & Linder, 1997; Padhye & Makde, 1982) compartilham o Tipo Onagráceo, Variação *Juncus*, a qual também ocorre em Typhaceae Juss., uma família proximamente relacionada à Bromeliaceae.

Os caracteres especiais da variação *Juncus* incluem uma formação precoce das células internas em *q*; uma contribuição predominante de *m* (hipófise) na formação da radícula (formada por divisões oblíquas; a contribuição mínima de *n* na formação da coifa (frequentemente apenas quatro células); além do tipo monocotiledôneo de embrião formado (Johansen, 1950; Johri, 1984). As similaridades dessa variação com a embriogenia de *B. nutans* incluem a formação precoce das células internas em *q*, a presença de hipófise derivada de *m* (tendo divisões oblíquas), a contribuição de *cb* em elementos da radícula e do suspensor, e o embrião monocotiledôneo (Diagrama 1A-B). Por outro lado, a linhagem *n* em *B. nutans* contribui substancialmente na formação da coifa, além da precoce segmentação longitudinal e oblíqua nessa linhagem, a qual não se segmenta até os estágios finais na maioria das espécies que exibem a Variação *Juncus* (Souèges, 1933; Johansen, 1950; Munro & Linder, 1997; Padhye & Makde, 1982). Além

disso, na Variação *Juncus*, as derivadas de  $n'$  ( $o$  e  $p$ ) podem se dividir várias vezes transversalmente, gerando um longo suspensor, mas elas nunca dividem longitudinalmente, como ocorre com *B. nutans*.



**Diagrama 1.** Resumo diagramático dos eventos embriogênicos em três variações embrionômicas. (A) Tipo Onagráceo, variação *Billbergia*. Diagramas similares para *Billbergia nutans* (neste trabalho), *Dyckia pseudococcinea* (Mendes et al., 2010), e *Pitcairnia encholirioides* (Mendes et al., 2018) (Bromeliaceae). (B) Tipo Onagráceo, variação *Juncus*. Diagramas similares para *Juncus effusus* L., *Luzula forsteri* DC. (Souèges, 1933) (Juncaceae), *Pycurus pumilus* (L.) Nees, *Cyperus alternifolius* L., *Mariscus panicus* Vahl. e *Remirea maritima* Aubl. (Padhye & Makde, 1982) (Cyperaceae). (C) Tipo Asteráceo, variação *Muscari*. Diagrama baseado em *Muscari comosum* (L.) Mill. (Souèges, 1926; Johansen, 1950) (Liliaceae). As cores transparentes indicam a contribuição relativa de  $ca$  e  $cb$  na formação do embrião. Cores solidas nas células do embrião indicam a contribuição relativa das linhagens. Linhas pontilhadas no embrião indicam variação no número de linhagens na respectiva fase. \* Fórmula embrionômica nas primeira e terceira gerações de células, respectivamente. As legendadas para elementos individuais da fórmula embrionômica são exibidas no texto. Os diagramas foram vetorizados com base nas ilustrações originais.

Duas outras variações do Tipo Onagráceo ocorrem em monocotiledôneas, a Variação *Lilium* e a Variação *Helionopsis* (Johansen, 1950), encontradas em espécies de Liliaceae Juss. e Melanthiaceae Batsch (Liliales), respectivamente. Além do fato dessas famílias serem distantemente relacionadas a Poales, essas variações são muito distintas quando comparadas à Variação *Juncus*: *ci* pode degenerar rapidamente ou se tornar uma estrutura massiva na Variação *Lilium*, ou se tornar bicelular ou binucleada na Variação *Helionopsis*, não participando da formação do embrião propriamente dito.

Uma classificação embrionômica mais específica para *B. nutans* no sistema de Johansen deve considerar essas informações comparativas, e uma série de recomendações deve ser seguidas (Johansen, 1950). Para ser incluída na variação mais similar do Tipo Onagráceo (Variação *Juncus*), a embriogenia dessa espécie precisa ser do mesmo tipo embrionômico, além de compartilhar características fundamentais dessa variação, especialmente planos de divisão celular na embriogênese, a contribuição relativa das primeiras gerações celulares na formação do embrião e características citológicas do suspensor (Johansen, 1950; Johri, 1984). Se há diferenças sutis em alguns desses parâmetros, ela é considerada uma expansão da variação básica. Se há diferenças marcantes nesses três parâmetros, a proposição de uma nova variação dentro do tipo embrionômico é indicada (Johansen, 1950). A segmentação precoce de *n*, a contribuição substancial dessa linhagem na formação da coifa e o curso suspensor formado por divisões longitudinais em *o* e *p* são características embriogênicas que não ocorrem na Variação *Juncus*, ou nas outras variações do Tipo Onagráceo (Johansen, 1950). Isso nos levou a propor uma nova variação para esse Tipo: a Variação *Billbergia* (Diagrama 1A), baseado em todas as premissas sugeridas por Johansen (1950).

As características embriogênicas da Variação *Billbergia*, embora nunca propostas anteriormente, são idênticas quando comparadas a outras bromeliáceas (Tab. 2),

especialmente *Dyckia pseudococcinea* (Mendes *et al.*, 2010) e *Pitcairnia encholirioides* (Mendes *et al.*, 2018).

Espécies	Fórmula embrionômica	Tipo embrionômico	Variação	Observações	N. Embrionômico
<i>B. nutans</i> H. Wendl. (Carvalho & Mariath, 2021)	$ca = pco+phy+pvt+icc$ $cb = iec+ico+co+s$	Onagráceo	<i>Billbergia</i>	$n = co$ ; $n'(o, p) = s$ (segmentado longitudinalmente)	211
<i>P. encholirioides</i> L.B. Sm. (Mendes <i>et al.</i> , 2018)	$ca = pco+phy+pvt+icc$ $cb = iec+ico+co+s$	Onagráceo	<i>Billbergia</i> *	$n = co$ ; $n'(o, p) = s$ (segmentado longitudinalmente)	(?)(?)1
<i>D. pseudococcinea</i> L.B. Sm. (Mendes <i>et al.</i> , 2010)	$ca = pco+phy+pvt+icc$ $cb = iec+ico+co+s$	Onagráceo	<i>Billbergia</i> *	$n = co$ ; $n'(o, p) = s$ (segmentado longitudinalmente)	(?)(?)1
<i>V. carinata</i> Wawra (Sartori, 2008)	Não aplicável	Asteráceo/ Onagráceo(?)	Não proposto	$ca$ divide longitudinalmente	(?)(?)1
<i>A. comosus</i> (L.) Merr. (Rao and Wee, 1979)	Não aplicável	Asteráceo (?)	Não proposto	$ca$ divide longitudinalmente; $s$ segmentado longitudinalmente	(?)(?)1
<i>T. usneoides</i> (L.) L. (Johansen, 1950)	Não aplicável	Asteráceo/ Onagráceo(?)	<i>Muscari</i> (?)	$ca$ divide longitudinalmente; $s$ segmentado longitudinalmente; zona de constrição da radícula	(?)(?)1
<i>T. recurvata</i> (L.) L. (Birge, 1911)	Não aplicável	Não proposto	Não proposto	$ca$ divide longitudinalmente; zona de constrição da radícula	2(?)1
<i>T. usneoides</i> (L.) L. (Billings, 1904)	Não aplicável	Não proposto	Não proposto	$ca$ divide longitudinalmente; $s$ segmentado longitudinalmente; zona de constrição da radícula	(?)(?)1

**Tabela 2.** Resumo dos aspectos embrionômicos em espécies de Bromeliaceae. Os dados foram obtidos dos trabalhos originais, indicados abaixo dos nomes das espécies. Fórmula embrionômica da primeira geração celular após o zigoto. (?): indica incertezas acerca da aplicação do tipo ou número embrionômico. Tipos e variação baseados em Johansen (1950). Número embrionômico baseado em Periasamy (1977). \* Dados propostos pela primeira vez neste trabalho. Detalhes dos sistemas de classificação são dados durante o texto.

Há um acompanhamento detalhado da contribuição relativa de  $ca$  e  $cb$  na formação do embrião nessas espécies. Nesses casos,  $cb$  contribui apenas com a formação da radícula

e do suspensor (Mendes *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2018), em uma sequência de eventos marcadamente similar à descrita aqui para *B. nutans*. Contudo, os autores classificam a embriogenia dessas espécies como o Tipo Asteráceo, apesar deles não focarem sua discussão nas características embrionômicas deste Tipo, nem aplicarem uma forma embrionômica. Da mesma forma, eles justificam essa classificação pela primeira divisão de *ca* ser longitudinal, e *cb* contribuir para a formação do embrião. Como essas características são comuns aos Tipos Onagráceo e Asteráceo, uma ambiguidade embrionômica foi gerada. Quando aplicada a fórmula embrionômica para essas espécies (Tab. 2), não há dúvida que o tipo embrionômico era o Onagráceo, em uma variação quase idêntica à descrita aqui para *B. nutans*. As características que confirmam a inclusão dessas espécies na Variação *Billbergia* incluem: a presença de hipófise derivada de *m*, a qual apresenta divisões oblíquas, a segmentação precoce de *n*, a contribuição substancial de *n* na formação da coifa, e o curto suspensor formado por divisões longitudinais de *o* e *p* (Tab. 2).

Estudos prévios descrevem alguns aspectos embriogênicos em espécies de Bromeliaceae (Billings, 1904; Birge, 1911; Rao & Wee, 1979; Sartori, 2008) (Tab. 1), mas o tipo embrionômico, quando adotado foi também o Tipo Asteráceo. Essa classificação pode ser duvidosa, principalmente porque, como previamente mencionado, a aplicação da forma embrionômica é necessária para distinção entre os tipos Onagráceo e Asteráceo, e não foi nunca, até onde sabemos, explicitamente apresentada em qualquer estudo envolvendo Bromeliaceae. Mesmo Johansen (1950), quando propôs a primeira classificação embrionômica para Bromeliaceae, não aplicou uma fórmula embrionômica para *Tillandsia usneoides* (Billings, 1904). Esse fato gerou a primeira ambiguidade embrionômica para a família (Johansen, 1950, p. 242):

“Em *Tillandsia usneoides*, o proembrião consiste de três células sobrepostas, mas não é completamente claro de onde a célula mediana é derivada [...]. Comparando as ilustrações dos estágios bi e tricelular, parece que é a célula basal que divide primeiro. A célula terminal ou intermediária se divide em seguida, a primeira longitudinalmente e a última transversalmente. Quadrantes, então octantes são produzidos nas derivadas da célula superior, no típico padrão do Tipo Onagráceo. É estabelecido que o cotilédone surge a partir da célula terminal (*l*) e o ápice caulinar, hipocótilo, ápice da raiz e o suspensor a partir da célula mediana (*l'* ao invés de *m*). A célula basal contribui com a construção do embrião e lhe confere, assim, o Tipo Onagráceo, e a melhor classificação que pode ser feita é sob a Variação *Muscari*.”

De fato, a embriogênese nessa espécie segue o típico padrão Onagráceo, como apontado por Johansen (1950), com indicações que *ca* é segmentado mais rapidamente que *cb* nessa espécie. Da mesma forma, não é claro se a derivada inferior de *ca* (*l'*) ou a derivada mediana de *cb* (*m*) contribui com a formação do hipocótilo, radícula e suspensor. Analisando a Variação *Muscari* do Tipo Asteráceo (Diagrama 1C), a ambiguidade dessa classificação para *T. usneoides* se torna ainda mais evidente, uma vez que não há correspondência entre a ilustração de Billings (1904), ainda que essas sejam detalhadas apenas na embriogênese inicial.

Assim, a contribuição de *cb* na construção do embrião é o principal argumento para a adoção do Tipo Asteráceo em Bromeliaceae (Billings, 1904; Birge, 1911; Rao & Wee, 1979; Sartori, 2008; Mendes *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2018). Contudo, é sabido que em ambos os tipos, Asteráceo ( $ca = pco + pvt$  (ou apenas *pco*);  $cb = phy + icc + iec + ico + co + s$ ) e Onagráceo ( $ca = pco + phy + pvt + icc$ ;  $cb = iec + ico + co + s$ ), *cb* contribui na formação do embrião, porém em diferentes proporções. Isso é devido a taxa de segmentação das derivadas de *cb* ser mais alta no Tipo Asteráceo (Johansen, 1950; Johri 1984). Nesse tipo, *cb* contribui para a formação do hipocótilo, radícula e suspensor, e pode ou não contribuir na formação do epicótilo. Por outro lado, no Tipo Onagráceo, *cb* se segmenta mais lentamente e contribui apenas para formação da radícula e do

suspensor. A contribuição relativa exata de *cb* e *ca* na formação do embrião maduro é ambígua não só para *T. usneoides* (Billings, 1904), mas também para *T. recurvata* (Birge, 1911), *Ananas comosus* (Rao & Wee, 1979) e *Vriesea carinata* (Sartori, 2008). A ambiguidade é devida a ausência de uma clara indicação das linhagens histogênicas após a embriogênese e a indicação de teratologias como variantes da embriogênese, além da ausência de estágios chave da embriogênese. Dessa forma, para uma classificação embriogênica dessas espécies, uma reinvestigação é necessária, priorizando os critérios de classificação embrionômica. Contudo, o Tipo Onagráceo pode ser mais parcimonioso, se nós considerarmos apenas os eventos de embriogênese inicial nessas espécies.

Uma tentativa de superar as dificuldades metodológicas do sistema de Johansen (Johansen, 1950) foi proposto por Periasamy (1987), em um sistema de grupos, séries e variações que avaliam apenas um estágio embriogênico. O proembrião logo após a formação das primeiras células internas é a base desse sistema, o qual utiliza um número de três dígitos para caracterizar o proembrião nesse estágio (número embriônico). O primeiro dígito (Grupo) representa quantas linhagens o proembrião mostra nessa fase; o segundo (Série) se relaciona ao número de células e posição de uma dada linhagem (terminal ou subterminal), imediatamente antes da segmentação das primeiras células internas; o terceiro (Variação) indica em qual linhagem (terminal ou subterminal) as primeiras células internas são formadas. Uma linhagem é entendida como uma célula ou uma camada de células que passa por divisões longitudinais. Linhagens celulares sem divisões longitudinais nessa fase são consideradas uma única linhagem (Periasamy, 1977). Assim, em *B. nutans* o número embriônico é 211. Isso significa que o proembrião, logo depois da formação das primeiras células internas, apresenta três linhagens (Grupo 2): uma terminal (*q*), uma subterminal (*m*), e uma basal (*n + n'* ou *ci*). A linhagem terminal tem quatro células imediatamente antes da primeira internalização (Série 1), e a linhagem

que internaliza antes é terminal ( $q$ ) (Variação 1). Esse número também caracteriza o proembrião de *Luzula fosteri* (Juncaceae) (Periasamy, 1977) o qual mostra um padrão típico do Tipo Onagráceo, Variação *Juncus*, que torna essa variação próxima à aqui descrita para *B. nutans*, ao menos nesse estágio específico da embriogênese.

Como para outras espécies de Bromeliaceae, o número embriônico não é completamente aplicável na maioria dos casos, já que o estágio do proembrião requerido não foi descrito (Tab. 2). Apesar disso, o terceiro dígito (Variação) pode ser generalizado para essas espécies, já que ele não necessariamente precisa de estágios específicos da embriogênese para ser determinado. Em todos eles (Billings, 1904; Birge, 1911; Rao & Wee, 1979; Sartori, 2008; Mendes *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2018) as primeiras células internas do proembrião são formadas na linhagem terminal, constituindo a Variação 1 (Tab. 2). Isso implica na dominância da célula apical na segmentação do proembrião, uma característica essencial do Tipo Onagráceo. Contudo, uma tipologia embrionômica para *T. usneoides* (Billings, 1904), *T. recurvata* (Birge, 1911), *Ananas comosus* (Rao & Wee, 1979) e *Vriesea carinata* (Sartori, 2008) deve ser aplicado apenas se os eventos embriogênicos ambíguos forem reanalisados.

Finalmente, considerando que o Tipo Onagráceo é encontrado em famílias proximamente relacionadas a Bromeliaceae, uma classificação embrionômica revisada para essa família teria importantes implicações no entendimento da evolução embriogênica em Poales, uma vez que o Tipo Asteráceo está presente em famílias distantemente relacionadas, como Poaceae (Johansen, 1950; Deshpande, 1976), Eriocaulaceae (Ramaswamy & Arekal, 1982) e Xyridaceae (Nardi, 2018).

### *Endospermogênese*

*Billbergia nutans* apresenta endospermogênese classificada como uma variação do tipo helobial caracterizada pela formação de duas células ou câmaras (micropilar e calazal), a partir da divisão do núcleo primário do endosperma (Swamy & Parameswaran, 1963; Johri, 1984; Batygina, 2005). Esse padrão de endospermogênese é observado em mais de 30 famílias de monocotiledôneas, algumas eudicotiledôneas e clados cedo divergentes de angiospermas (Swamy & Parameswaran, 1963; Batygina, 2005). Em monocotiledôneas com esse padrão de endospermogênese, a primeira divisão do núcleo primário do endosperma é assimétrica, gerando uma célula calazal menor e uma célula micropilar volumosa (Swamy & Parameswaran, 1963; Batygina, 2005). Swamy & Parameswaran (1963) classificam o endosperma helobial de monocotiledôneas em seis variações, nas quais cinco delas a câmara calazal permanece nuclear. No sexto tipo, a celularização frequentemente ocorre na câmara calazal, após a celularização na câmara micropilar. Apenas em Haemodoraceae R. Br., Philydraceae Link e Pontederiaceae Kunth (Commelinales) (Simpson, 1998; Hamann, 1998; Cook, 1998) e em Typhaceae e Bromeliaceae (Poales) (Johri *et al.*, 1992), a celularização ocorre antes na câmara calazal. De fato, o padrão observado em *B. nutans* em outras espécies de Bromeliaceae (Mendes *et al.*, 2018).

Em *B. nutans* e outras bromeliáceas (Mendes *et al.*, 2018), a celularização em cada câmara do endosperma é síncrona com estágios essenciais da embriogênese: a primeira divisão do zigoto e os estágios pós-octante e globular. O momento de celularização do endosperma coincide com os estágios pós-octante e globular e precisa ser fortemente regulado para o desenvolvimento normal do embrião em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Lafon-Placette & Köhler, 2014). Falhas nesse processo levam ao aborto da

semente e interrupção da embriogênese nos estágios globular e pós-globular em mutantes deficientes de FIS-PRC2 e EDE1 dessa espécie (Lafon-Placette & Köhler, 2014). Para *B. nutans* e outras bromeliáceas, a relação entre a celularização das duas câmaras do endosperma com estágios embriogênicos específicos requer maiores análises com relação aos mecanismos fisiológicos e genéticos. O período da endospermogênese e a detalhada embriogênese de *B. nutans* são dados fundamentais para o avanço desses estudos e para protocolos de cultura para embriões dessa espécie.

Por fim, nossos resultados indicam que a semente de *B. nutans* é endospérmica (Cocucci, 2004), sendo o amido o principal composto de armazenamento no parênquima do endosperma, e tanto proteínas quanto lipídeos na epiderme (camada de aleurona). Essa característica da epiderme do endosperma também é relatada para algumas espécies de *Tillandsia* (Cecchifiordi *et al.*, 2001) e para *Dyckia pseudococcinea* (Mendes *et al.*, 2021). Sua presença em representantes das três maiores subfamílias de Bromeliaceae indica que sua ocorrência pode ser mais ampla que previamente relatado.

## Conclusões

A embriogenia em *B. nutans* foi descrita e classificada a partir de uma perspectiva embrionômica. Essa é uma das poucas tentativas desde Johansen (1950) a analisar uma espécie de Bromeliaceae nessa perspectiva. Sua forma embrionômica é:  $ca = pco + phy + pvt + icc$ ;  $cb = iec + ico + co + s$  e o número embrionômico 211. Seguindo o sistema de Johansen (Johansen, 1950), o tipo embrionômico mais apropriado é o Tipo Onagráceo, uma classificação que é inédita para a família. Nós optamos pela proposição de uma nova variação para esse tipo, a Variação *Billbergia*, dadas as características particulares da embriogenia de *B. nutans*. Essas peculiaridades incluem a segmentação precoce de  $n$  e a

contribuição dessa linhagem na formação da coifa, e a segmentação longitudinal de *o* e *p* formando um curto suspensor. Essa classificação pode ser aplicada com os mesmos critérios para *D. pseudococcinea* e *P. encholirioides*, embora elas tenham sido originalmente classificadas sob o Tipo Asteráceo. Uma nova classificação embrionômica pode ser discutida também para todas as espécies de Bromeliaceae já estudadas, necessitando uma reinvestigação embriogênica na maioria dos casos. Contudo, o Tipo Onagráceo pode ser mais adequado para estas espécies, seja pelos eventos gerais da embriogênese ou pela dominância de *ca* no número de segmentações durante a embriogênese. Assim, a necessidade de novos estudos embriogênicos com uma perspectiva embrionômica em espécies de Bromeliaceae é evidenciada por certas ambiguidades que impedem uma classificação embrionômica correta para a família. A endospermogênese em *B. nutans* é do tipo helobial, com a celularização ocorrendo antes na câmara calazal. A celularização ocorre durante as primeiras divisões do zigoto na câmara calazal e durante o estágio de embrião globular na câmara micropilar, estágios chave para futuros estudos fisiológicos e de cultura *in vitro* dessa espécie. O endosperma maduro acumula principalmente amido no parênquima e proteína e lipídeos na epiderme.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Natividade Ferreira Fagundes pelas coletas da espécie em campo e ao Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio técnico.

Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob os números 141695/2019-6 (J.D.T.C.) e 303840/2019-6 (J.E.A.M.).

## Referências

- Batygina, T.B. (Ed.), 2005. Embryology of Flowering Plants: Terminology and Concepts, Vol. 2: The Seed. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
- Berg, R.Y., 2009. Embryo sac, endosperm, and seed of *Nemophila* (Boraginaceae) relative to taxonomy, with a remark on embryogeny in *Pholistoma*. Am. J. Bot. 96, 565-579. <https://doi.org/10.1071/BT13162>.
- Billings, F.H., 1904. A study of *Tillandsia usneoides*. Bot. Gaz. 38, 99-121.
- Birge, W.I., 1911. The Anatomy and some biological aspects of the "ball moss": *Tillandsia Recurvata* L. Bulletin of The University of Texas 194, 5-22.
- Cecchifiordi, A., Palandri, M., Turicchia, S., Tani, G., Di Falco, P., 2001. Characterization of the seed reserves in *Tillandsia* (Bromeliaceae) and ultrastructural aspects of their use at germination. Caryologia 54(1), 1-16. <https://doi.org/10.1080/00087114.2001.10589208>.
- Chun-Ying, X., De-Zhu L., 2005. Embryology of *Megacodon stylophorus* and *Veratrilla baillonii* (Gentianaceae): descriptions and systematic implications. Bot. J. Linn. Soc. 147, 317–331. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2005.00371.x>.
- Cocucci, A.E., 2004. Morphogenetic seed types of Spermatophyta. Plant Syst. Evol. 250, 1-6.
- Cook, C.D.K., 1998. Pontederiaceae, in: Kubitski, K. (Ed.), Families and genera of flowering plants. Flowering plants monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 395–406.
- Costa, M.E., Sampaio, D.S., Paoli, A.A.S., Leite, S.C.A.L., 2004. Poliembrionia e aspectos da embriogênese em *Tabebuia ochracea* (Chamisso) Standley (Bignoniaceae). Rev. Bras. Bot. 27, 395-406. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000200017>.
- Deshpande, P.K., 1976. Development of embryo and endosperm in *Eragrostis uniolooides* (Poaceae). Plant Syst. Evol. 125, 253-259.
- Fagundes, N.F., 2013. Desenvolvimento estrutural e dinâmica de constituintes químicos no gineceu de *Billbergia nutans* H. Wendl. Ex regel (Bromelioideae - Bromeliaceae). PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.

- Fagundes, N.F., Mariath, J.E.A., 2014. Ovule ontogeny in *Billbergia nutans* in the evolutionary context of Bromeliaceae (Poales). *Plant Syst. Evol.* 300, 1323-1336. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0964-x>.
- Genovese-Marcomin, P.R., Mendonça, M.S., Carmello-Guerreiro S.M., 2014. Embryonic development of *Syagrus inajai* (Spruce) Becc. (Arecaceae, Arecoideae), an Amazonian palm. *Aust. J. Bot.* 61, 611-621. <https://doi.org/10.1071/BT13162>.
- Gerrits, P.O., Smid, L., 1983. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *J. Microsc.* 132, 81-85.
- Gonzalez, A.M., 2016. Floral structure, development of the gynoecium, and embryology in *Schinopsis balansae* Engler (Anacardiaceae) with particular reference to aporogamy. *Int. J. Plant Sci.* 177, 326-338. <https://doi.org/10.1086/684847>.
- Gouda, E.J., Butcher, D., Gouda, C.S. (continuously updated) Encyclopaedia of Bromeliads, version 4 (2018) Available online <https://bromeliad.nl/encyclopedia/> (accessed 10 September 2020).
- Hamann, U., 1998. Philydraceae, in: Kubitski, K. (Ed.) Families and genera of flowering plants. Flowering plants monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 389-394.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill Book Co., New York and London.
- Johansen, D.A., 1950. *Plant embryology: Embryogeny of the Spermatophyta*. Chronica Botanica Company, Waltham, Massachusetts.
- Johri, B.M. (Ed.), 1984. *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Johri, B.M., Ambegaokar, K.B., Srivastava, P.S., 1992. *Comparative Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 1A-149A.
- Kolomeitseva, G.L., Ryabchenko, A.S., Babosha, A.V., 2017. Features of the embryonic development of *Dienia ophrydis* (Orchidaceae). *Cell Tiss. Biol.* 11, 314-323. <https://doi.org/10.1134/S1990519X17040071>.
- Lafon-Placette C., Köhler C., 2014. Embryo and endosperm, partners in seed development. *Curr. Plant Biol.* 17, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.11.008>.

- McDowell, E.M., Trump, B.R., 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 100, 405-414.
- McWilliams, E.L., 1968. The subgenus *Billbergia* in cultivation. *J. Bromel. Soc.* 18, 7-25.
- Mendes, S.P., Costa, C.G., De Toni, K.L.G., 2010. Embryo development of *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae), an endangered Brazilian species. *Aust. J. Bot.* 58, 485-492. <https://doi.org/10.1071/BT10073>.
- Mendes, S.P., Vieira, R.C., De Toni, K.L.G., 2018. Embryo and endosperm development in *Pitcairnia encholirioides* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae): an endangered species of the Atlantic Forest. *Flora* 246-247, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.06.006>.
- Mendes, S.P., Costa, C.G.D., De Toni, K.L.G., 2021. Endosperm development in *Dyckia pseudococcinea* (Pitcairnioideae-Bromeliaceae). *Rodriguesia* 72, e01682019. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860202172025>.
- Munro, S.L., Linder, H.P., 1997. The embryology and systematic relationships of *Prionium serratum* (Juncaceae: Juncales). *Am. J. Bot.* 84, 850-860.
- Nardi, K.D.O., 2018. Embriogênese e desenvolvimento pós-seminal de Xyridaceae e Mayacaceae e anatomia floral de *Xyris*, com ênfase na evolução de caracteres. PhD Thesis, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP, Brazil.
- O’Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368–373.
- O’Brien, T.P., McCully, M.E., 1981. *The Study of Plant Structure Principles and Selected Methods*. Termarcaphi Pty Ltd, Melbourne.
- Padhye, M.D., Makde, K.H., 1982. Embryogeny in some Cyperaceae. *Plant Syst. Evol.* 139, 279-287.
- Paiva, É.A.S., Pinho, S.Z., Oliveira, D.M.T., 2011. Large Plant Samples: How to Process for GMA Embedding?, in: Chiarini-Garcia, H., Melo, R. (Eds.), *Light Microscopy. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Humana Press, Totowa. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-950-5_3).
- Periasamy, K., 1977. A new approach to the classification of angiosperm embryos. *Prec. Indian Acad. Sci.* 86, 1-13.
- Ramaswamy, S.N., Arekal, G.D., 1982. On the embryogeny of three taxa of Paepalanthoideae (Eriocaulaceae). *Ann. Bot.* 49, 99-102.

- Rao, A.N., Wee, Y.C., 1979. Embryology of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. New Phytol. 83, 485-497.
- Ross, C.M., Sumner, M.J., 2005. Early endosperm and embryo development of the dwarf mistletoe *Arceuthobium americanum* (Viscaceae). Int. J. Plant Sci. 166, 901-907. <https://doi.org/10.1086/432897>.
- Sartori, J.S., 2008. Desenvolvimento floral em *Vriesea carinata* Wawra (Tillandsioideae – Bromeliaceae). PhD Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil.
- Schnarf, K., 1929. Embryologie der Angiospermen. Bornträger, Berlin.
- Simpson, M.G., 1998. Haemodoraceae, in: Kubitski, K. (Ed.), Families and genera of flowering plants. Flowering plants monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, pp. 212–222.
- Smith, L.B., Downs, R.J., 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae), in: Flora Neotropica Monography 14, part. 1. The New York Botanical Garden, New York.
- Souèges, R., 1933. Recherches sur l'embryogénie des *Joncacées*. Bull. Soc. Bot. France 80, 51-59.
- Souèges, R., 1937. Les lois du développement. Hermann et Cie, Paris.
- Souèges, R., 1939. Embryogénie et classification. Deuxième fascicule: Essai d'un système embryogénique. Hermann et Cie, Paris.
- Souèges, R., 1941. Variantes dans les deux premiers groupes des périodes de la classification embryogénique. Bull. Soc. Bot. France 88, 602-608.
- Swamy, B.G.L., Parameswaran, N., 1963. The helobial endosperm. Biol. Rev. 38, 1-50.
- Venturelli, M., Bouman, F., 1986. Embryology and seed development in *Mayaca fluviatilis* (Mayacaceae). Acta Bot. Neerl. 35, 497-516.
- Vidal, B.C., 1970. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. Ann. D'histochim. 15, 289–296.

## Capítulo VI

### Contribuições da morfoanatomia da semente na circunscrição de espécies e gêneros em Bromelioideae - Excertos

Aqui apresentarei fragmentos de trabalhos já publicados em parceria com Elton M.C. Leme (primeiro autor), no prelo ou em preparação, na qual a morfoanatomia da semente foi relevante na circunscrição de espécies e gêneros de Bromelioideae. Trarei apenas os principais resultados, compatíveis com o conteúdo da presente tese.

No excerto I apresento os resultados publicados em uma Monografia na revista *Phytotaxa*, a qual contém análises morfológicas, moleculares, biogeográficas, palinológicas e anatômicas para *Hylaeaicum*, um novo gênero de Bromelioideae segregado de *Neoregelia*, com representantes amazônicos. A presença de sementes biapiculadas e embriões grandes são características contrastantes de *Hylaeaicum* quando comparado a *Neoregelia*.

No excerto II apresento os resultados da morfoanatomia da semente em representantes dos Cryptanthoides, publicados em um artigo na revista *Phytotaxa*. O artigo contém análises morfológicas, biogeográficas e palinológicas sobre o grupo, incluído status de gêneros para antigos subgêneros (*Krenakanthus*, *Orthocryptanthus*), além da proposição de um novo gênero monoespecífico, *Siqueiranthus* (*Siqueiranthus cinereus*). O tamanho e morfologia do embrião e, especialmente, as variações anatômicas do tégmen costado foram as características mais relevantes com relação às sementes.

No excerto III apresento a importância da morfoanatomia do envoltório da semente (além da anatomia foliar, não apresentada aqui) na proposição de uma espécie nova de *Krenakanthus*, *K. ribeiranus*, já submetido para publicação na revista *Phytotaxa*.

Por fim, no excerto IV apresento os dados morfoanatômicos da semente para a circunscrição de *Canistrum* e o novo status de *Cucullatanthus*, provável novo gênero em Bromelioideae, ainda em preparação.

## Excerto I - *Hylaeicum*, um novo status para um subgênero amazônico de *Neoregelia*

Título da Monografia: “**Re-evaluation of the Amazonian *Hylaeicum* (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on neglected morphological traits and molecular evidence**”

Autores: Elton M. C. Leme, Georg Zizka, Juraj Paule, Julián Aguirre-Santoro, Sascha Heller, Ivón M. Ramírez-Morillo, Heidemarie Halbritter, Jorge E. A. Mariath, Jordano D. T. De carvalho & Rafaela C. Forzza.

 *Phytotaxa* 499 (1): 001–060  
<https://www.mapress.com/j/pt/>  
 Copyright © 2021 Magnolia Press

Monograph

ISSN 1179-3155 (print edition)  
**PHYTOTAXA**  
 ISSN 1179-3163 (online edition) 

<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.499.1.1>

# PHYTOTAXA

499

## Re-evaluation of the Amazonian *Hylaeicum* (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on neglected morphological traits and molecular evidence

ELTON M. C. LEME<sup>1,2,9\*</sup>, GEORG ZIZKA<sup>3,4,10</sup>, JURAJ PAULE<sup>4,11</sup>, JULIÁN AGUIRRE-SANTORO<sup>5,12</sup>, SASCHA HELLER<sup>3,13</sup>, IVÓN M. RAMÍREZ-MORILLO<sup>6,14</sup>, HEIDEMARIE HALBRITTER<sup>7,15</sup>, JORGE E. A. MARIATH<sup>8,16</sup>, JORDANO D. T. DE CARVALHO<sup>8,17</sup>  
 & RAFAELA C. FORZZA<sup>1,18</sup>

### Abstract

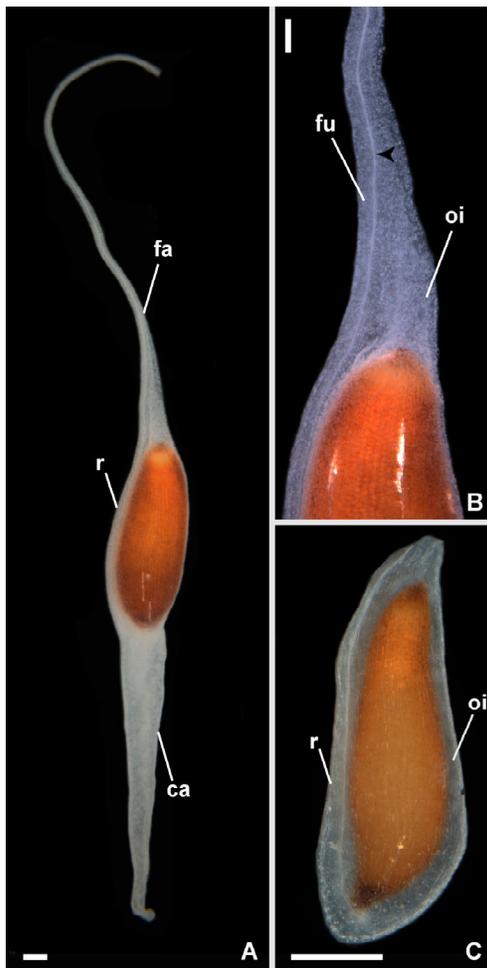
Generic status for the Amazonian *Hylaeicum* is proposed within the *Aechmea* alliance, excluding it from the “Nidularioid complex” in general and from *Neoregelia* in particular. The monophyly of this new genus is supported by molecular phylogenetic analyses. The taxonomic circumscription of *Hylaeicum* is based on the combination of geographical range and morphological characters, such as clonal growth, inflorescence structure, petal and corolla conformation, petal appendages, ovary, ovule, stigma, pollen, fruit, and seed, as well as seed anatomy, thoroughly documented and illustrated from field-collected specimens that flowered in cultivation in the Rio de Janeiro Botanical Garden, the Marie Selby Botanical Gardens, and in Refúgio dos Gravatás. The presence of seeds with long bicaudate appendages on both chalazal and micropylar ends is reported for the first time in Bromelioideae and considered an important character to distinguish *Hylaeicum* from the related genera in the *Aechmea* alliance. In order to support the morphological distinctness of *Hylaeicum*, the most varied and complete documentation of stigmata, fruits, and seeds of Bromelioideae is also presented for the first time, covering 24 genera and 17 subgenera. Fourteen new combinations, including 12 species and two varieties, are proposed.

**Keywords:** *Aechmea* alliance, morphology, “Nidularioid complex”, baccate fruits, appendaged seeds

**Espécies analisadas:** *Neoregelia compacta*, *Hylaeaicum margaretae*, *Hylaeaicum laevianum*

### Resultados e discussão

As sementes nas espécies de *Hylaeaicum* são biapendiculadas, com apêndices nos polos calazal e funicular (Fig. 1A-B). O apêndice funicular é formado principalmente pelo funículo, exceto próximo à micrópila, onde se conecta à porção micropilar do tegumento externo (Fig. 1B). Os apêndices são gelatinosos, translúcidos ou esbranquiçados, assim como o tegumento externo (sarcotesta) (Fig. 1A-B). Nas sementes de *Neoregelia compacta* não há apêndices, apenas o tegumento gelatinoso, translúcido ou esbranquiçado (sarcotesta) (Fig. 1C).



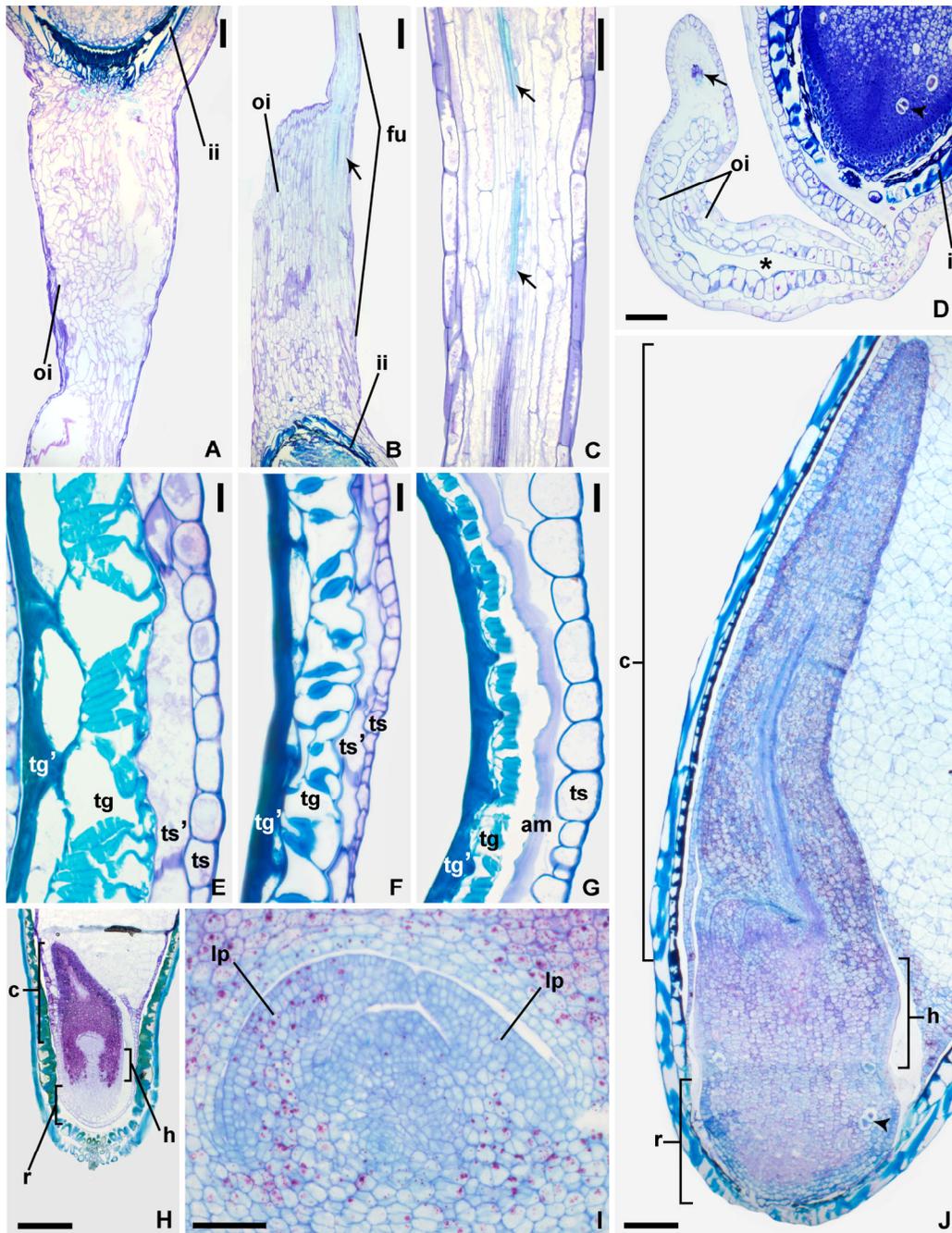
**Figura 1.** Morfologia da semente sob estereomicroscópio. A, B: *Hylaeaicum laevianum*. A: morfologia geral de uma semente hidratada. B: detalhe do apêndice funicular na porção micropilar. C: *Neoregelia compacta*. Morfologia geral de uma semente hidratada. O detalhe mostra uma semente em tamanho proporcional em comparação com a escala da Fig. 1A. ca: apêndice calazal. fa: apêndice funicular. oi: tegumento externo. r: rafe. Ponta de seta: feixe vascular. Barras: A,C: 500  $\mu\text{m}$ ; B: 300  $\mu\text{m}$ ;

Os apêndices observados nas sementes de *Hylaeicum* têm duas origens diferentes, o que pode ser confirmado pela análise anatômica das regiões calazal (Fig. 2A) e micropilar (Fig. 2B). O apêndice calazal se desenvolve a partir do tegumento externo sem contribuição do tegumento interno (Fig. 2A). Esta estrutura é formada por epiderme simples e internamente por parênquima de células volumosas, com paredes celulares pectico-celulósicas muito delgadas e não lignificadas, bem como grandes espaços intercelulares. Por outro lado, o apêndice funicular (Fig. 1B, 2B, C) tem origem dupla. Na região micropilar, é composto pelo prolongamento do tegumento externo, juntamente com uma porção funicular (Fig. 1B; 2B). Em corte longitudinal em vista frontal, o exóstoma micropilar pode ser observado nesta porção (fig. 2D). Abaixo dessa região apenas o funículo participa da formação do apêndice (Fig. 2C), demonstrado pela presença do parênquima funicular e feixe vascular funicular, sem elementos do tegumento externo. As paredes celulares do apêndice funicular também são muito finas e têm constituição pectico-celulósica, tanto na porção micropilar como funicular, assim como no apêndice calazal, o que também explica o aspecto gelatinoso e translúcido de ambas as estruturas (Fig. 1A -C).

Ambos os tegumentos contribuem para a formação do tegumento em todas as espécies analisadas (Fig. 2E-G). A testa possui duas ou três camadas celulares, frequentemente comprimidas ou deformadas em espécies de *Hylaeicum* (Fig. 2E, F), ou pode haver a dissolução completa das camadas internas, permanecendo apenas a exotesta em sementes de *Neoregelia compacta* (Fig. 2G). Nesta espécie, há resquícios do material celular, formando uma massa amorfa que reage positivamente para polissacarídeos pecticos na coloração com Azul de Toluidina. As paredes celulares das células da testa são delgadas e de constituição pectico-celulósica em todas as espécies analisadas. Essas características explicam o aspecto externo gelatinoso translúcido-esbranquiçado das

sementes, o que configura, em sentido amplo, uma sarcotesta efêmera, que desidrata após a dispersão das sementes. O tégmen é composto por duas camadas celulares, com paredes celulares lignificadas e espessadas (Fig. 2E-G). As sementes são, portanto, tégmicas, pois o exotégmen e o endotégmen constituem o principal tecido mecânico no tegumento da semente madura. Em corte transversal, as células do exotégmen exibem paredes anticlinais mais espessas do que as periclinais. O endotégmen, por outro lado, apresenta células com paredes internas periclinais e anticlinais altamente espessadas (em forma de U). Enquanto as células da testa são ligeiramente variáveis comparando as espécies, as do tégmen têm variações estruturais mais perceptíveis, comparando as espécies *N. compacta* (Fig. 2G) com *Hylaeicum* (Fig. 2 E, F), particularmente em termos de volume celular e parede celular grau de espessura, embora o potencial taxonômico desses caracteres seja ainda desconhecido.

O embrião da espécie analisada (Fig. 2H-J) é lateral segundo a classificação de Martin (1946). Nas espécies de *Hylaeicum* (Fig. 2I, J) os embriões são grandes e bem diferenciados, possuindo um longo cotilédone, que representa cerca de 70% do comprimento do embrião. A radícula apresenta idioblastos acumulando ráfides (Fig. 2D, J). O epicótilo, neste caso, é formada pelo meristema apical do embrião e alguns primórdios foliares (Fig. 2I). Embora também diferenciado, o embrião em *N. compacta* é 5x a 6x menor em relação a *Hylaeicum*, além de possuir um cotilédone curto (cerca de 50% do comprimento do embrião), radícula sem acúmulo de metabólitos secundários e epicótilo formado apenas pelo meristema apical, sem primórdios foliares (Fig. 2H).



**Figura 2.** Anatomia da semente. A-D, F: *Hylaeaicum laevianum*. E, I, J: *Hylaeaicum margaretae*. G, H: *Neoregelia compacta*. A-D: apêndices em seção longitudinal. A: apêndice calazal. B-D: apêndice funicular. B: porção micropilar em vista lateral. C: porção funicular. D: porção micropilar em vista frontal. fu: funículo. ii: tegumento interno (tégmen). oi: tegumento externo (testa). Seta: feixe vascular. Cabeça de seta: idioblasto com ráfides. E-G: envoltório da semente em seção transversal. am: massa amorfa. tg: exotégmen. tg': endotégmen. ts: exotesta. ts': endotesta. H, J: embriões em seção longitudinal (proporcionalmente na mesma escala). I: detalhe do epicótilo. c: cotilédone. h: hipocótilo. lp: primórdio foliar. r: radícula. Cabeça de seta: idioblasto com ráfides. Barras: A, B, H, J: 500  $\mu\text{m}$ . C, D, I: 200  $\mu\text{m}$ . E-G: 100  $\mu\text{m}$ .

**Excerto II - A morfoanatomia da semente nos Cryptanthoides: novos status e um novo gênero**

Título do artigo: “New genera and a new species in the “Cryptanthoid Complex” (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on the morphology of recently discovered species, seed anatomy, and improvements in molecular phylogeny”

Autores: Elton M. C. Leme, Georg Zizka, Everton Hilo De Souza, Juraj Paule, Jordano D. T. de Carvalho, Jorge E. A. Mariath, Heidemarie Halbritter & Otávio B. C. Ribeiro



*Phytotaxa* 544 (2): 128–170  
<https://www.mapress.com/pt/>  
 Copyright © 2022 Magnolia Press

Article

ISSN 1179-3155 (print edition)  
**PHYTOTAXA**  
 ISSN 1179-3163 (online edition)



<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.544.2.2>

**New genera and a new species in the “Cryptanthoid Complex” (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on the morphology of recently discovered species, seed anatomy, and improvements in molecular phylogeny**

ELTON M. C. LEME<sup>1,2,11\*</sup>, GEORG ZIZKA<sup>3,4,12</sup>, EVERTON HILO DE SOUZA<sup>5,6,13</sup>, JURAJ PAULE<sup>4,7,14</sup>, JORDANO D. T. DE CARVALHO<sup>8,15</sup>, JORGE E. A. MARIATH<sup>8,16</sup>, HEIDEMARIE HALBRITTER<sup>9,17</sup> & OTÁVIO B. C. RIBEIRO<sup>10,18</sup>

**Abstract**

The continuous refinement of the morphological, anatomical, and molecular studies on the genera of the “Cryptanthoid complex”, mainly considering the recently discovered outlier species, gave rise to new interpretations of species relationships. It reinforced the monophyly of the groups, and allowed the recognition of the new monotypic genus *Siqueiranthus* based on a morphologically unique endemic species from northeastern Brazil on the brink of extinction, as well as generic status for *Krenakanthus* and *Orthocryptanthus* previously conceived as subgenera of *Orthophytum*, with readjustments in the positioning of some species. An integrative approach with the combination of multiple traits and the critical assessment of the diagnostic characters proved to be useful for the establishment of the new monophyletic genera. A new unusual species of *Orthophytum* is also described and illustrated, and its phylogenetic relationships are discussed.

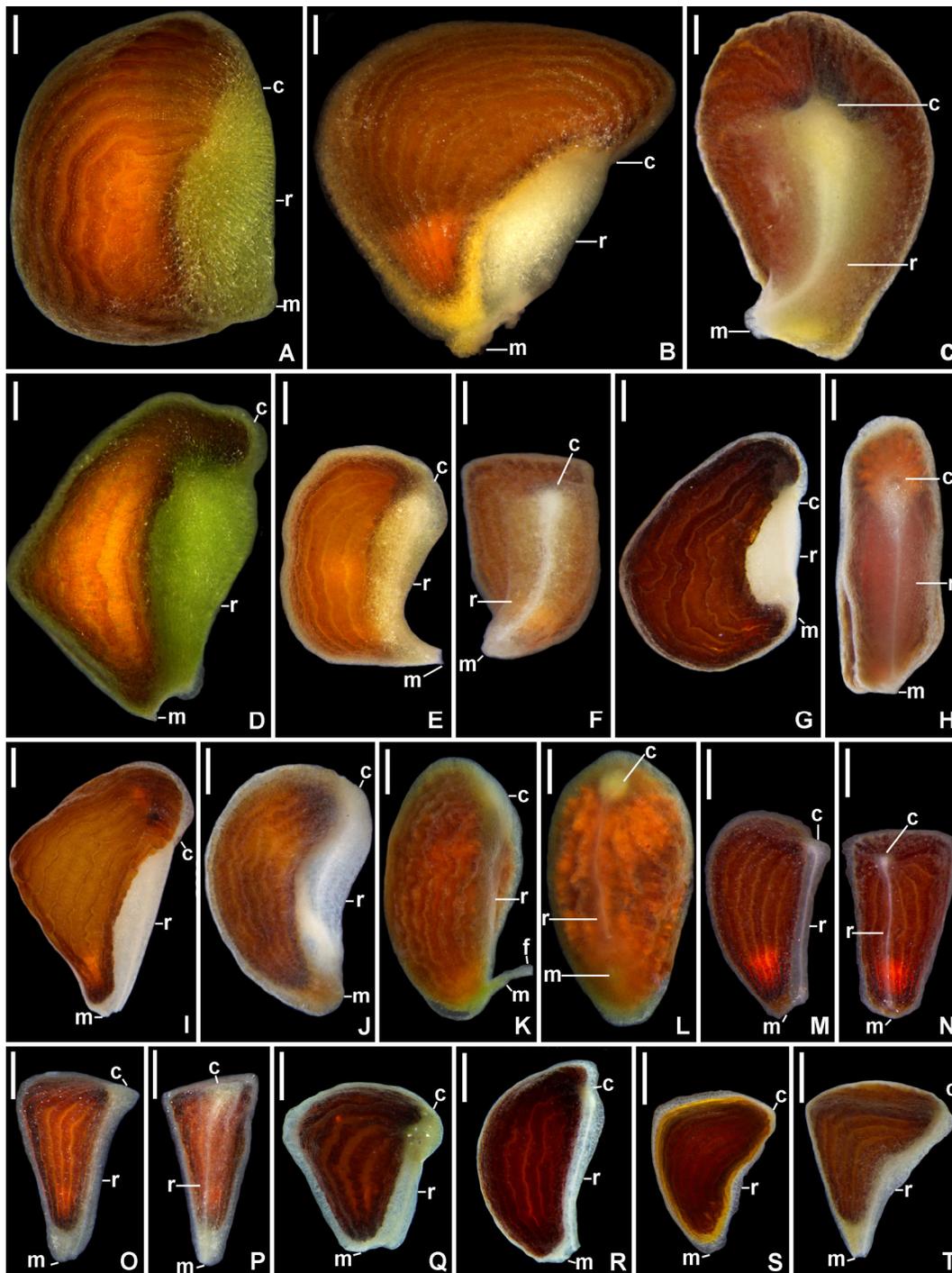
**Keywords:** *Cryptanthus*, integrative taxonomy, monophyly, morphology, *Orthophytum*, seed anatomy

**Espécies analisadas:** Para a análise morfoanatômica, foram amostrados frutos frescos e sementes de cinco espécies de *Cryptanthus* (*Cryptanthus* aff. *beuckeri*, *C. aff. burlemarxii*, *C. bahianus*, *C. colnagoi*, *C. pickelii* e *C. 9487*), seis espécies de *Orthophytum* (*O. compactum*, *O. leprosum*, *O. maracasense*, *O. pseudovagans*, *O. vagans* e *O. saxicola*) além das espécies *Krenakanthus roseolilacinus*, *Orthocryptanthus vasconcelosianus* e *Siqueiranthus cinereus*.

## Resultados

### *Envoltório da semente e morfologia do embrião*

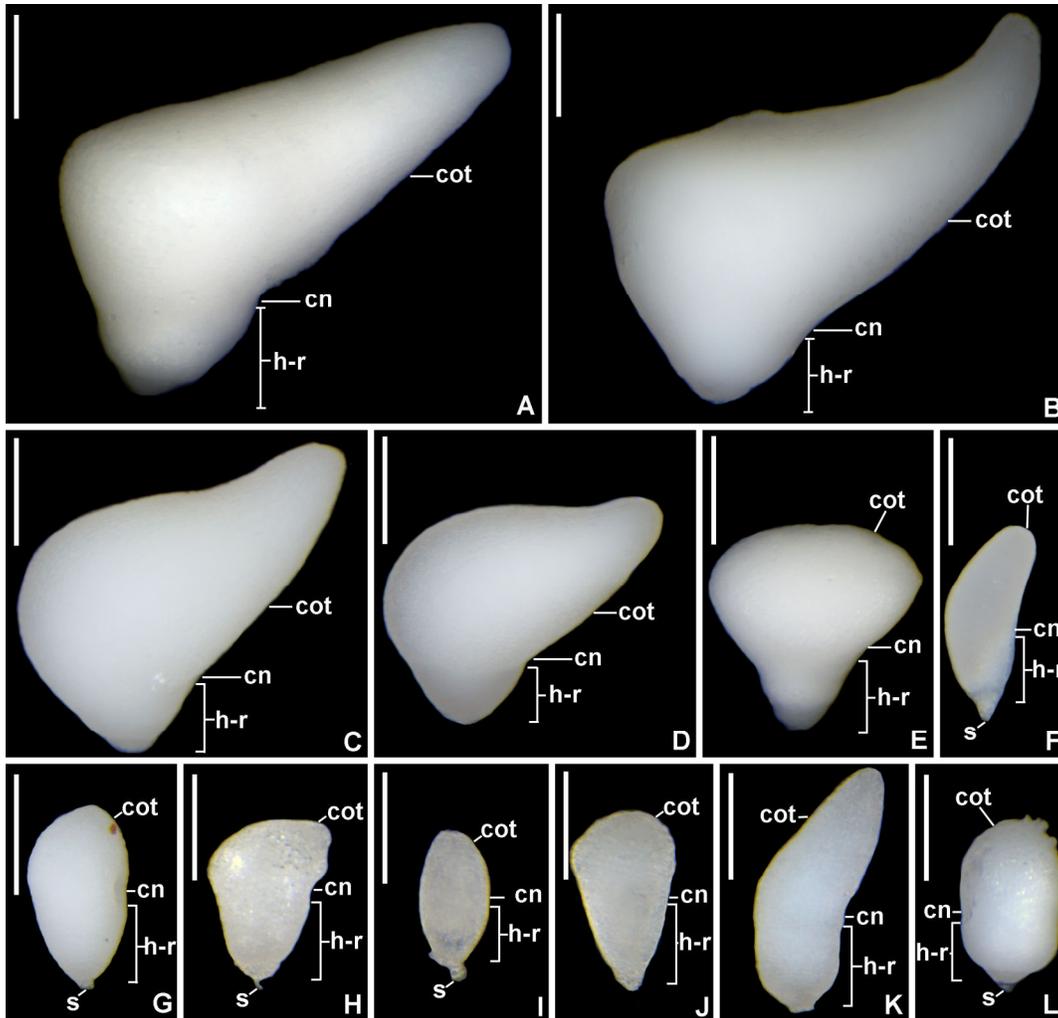
As sementes das espécies analisadas são exapendiculadas, com apêndice calazal imperceptível (Fig. 1A-T). A semente é angulosa, obovoide a ovoide nos representantes de *Cryptanthus* (Fig. 1A-E), nas espécies *Siqueiranthus cinereus* (Fig. 1G-I) e *Orthophytum* (Fig. 1M-T). *Krenakanthus roseolilacinus* (Fig. 1J) e *Orthocryptanthus vasconcelosianus* (Fig. 1K-L) são exceções, com semente obovoide achatada lateralmente e semente obovoide não angulosa, respectivamente. O tamanho da semente varia de 1,0 - 2,0 mm em *Orthophytum* a 4,0 mm em sementes maiores de *Cryptanthus*, com tamanho intermediário nas demais espécies. A cor da semente varia de amarelo ocre a marrom escuro, devido à cor do envoltório interno da semente. Este apresenta um padrão em faixas ou costado em todas as espécies analisadas (Fig. 1A-T). Costelas ou bandas largas e escuras (faixas costais) alternam com sulcos ou bandas intercostais geralmente mais estreitos e claros. Este padrão é encontrado em todas as espécies analisadas, variando em presença e padrões de sinuosidade. Somente em *O. leprosum* as bandas intercostais e costais têm aproximadamente a mesma largura (Fig. 1Q). O envoltório externo da semente é geralmente branco ou translúcido, exceto na espécie *Cryptanthus*, onde é amarelo esverdeado a verde, principalmente na região rafeal (Fig. 1A-D).



**Figura 1.** Morfologia da semente. Sementes em vista lateral (A, C-E, G-J, M, O, Q-T) e rafeal (B, F, H, L, N, P). A-B. *Cryptanthus aff. beuckeri*. C. *C. colnagoi*. D. *C. pickelii*. E-F. *C. bahianus*. G-I. *Siqueiranthus cinereus*. G e I apresentam duas variações morfológicas para esta espécie. J. *Krenakanthus roseolilacinus*. K-L. *Orthocryptanthus vasconcelosianus*. M-N. *Orthophytum maracasense*. O-P. *O. compactum*. Q. *O. leprosum*. R. *O. pseudovagans*. S. *O. vagans*. T. *O. saxicola*. c = região calazal ou apêndice calazal vestigial. m = região micropilar. r = rafe. Barras = 0,5 mm.

O eixo micropilar-calazal é ligeiramente curvo em todas as espécies analisadas. No entanto esta curvatura é mais evidente nas espécies de *Cryptanthus* e em *S. cinereus*, embora possa ser variável (Fig. 1G, I). A rafe é suculenta e volumosa nas espécies *Cryptanthus*, em *S. cinereus* e *K. roseolilacinus* (Fig. 1A-J), sendo pouco evidente nas espécies de *Orthophytum* e em *Orthocryptanthus vasconselosianus* (Fig. 1K-T). Somente em *Cryptanthus* há curvatura lateral da rafe próximo ao funículo (Fig. 1B, F), estando presente inclusive em *C. bahianus*, com a menor semente entre as espécies analisadas neste gênero. Em outras espécies, a rafe é aproximadamente retilínea ao longo do eixo (Fig. 1 H, L, N, P).

Na maioria das espécies de *Cryptanthus* o embrião é diferenciado, com um longo cotilédone oblongoide e curvado quase perpendicularmente ao eixo hipocótilo-radicular (Fig. 2A-D). Somente em *C. bahianus* (Fig. 1E) o cotilédone é curto e largo, caracterizando a morfologia capitada desse embrião, que e também aparenta ser diferenciado. Em *S. cinereus*, assim como nas espécies de *Orthophytum*, o embrião é relativamente menor e pouco desenvolvido, embora diferenciado, com cotilédone geralmente curto, cônico e ligeiramente lateralizado e eixo hipocótilo-radícula curto (Fig. 2F). O cotilédone é vestigial ou curto mesmo em sementes completamente desenvolvidas na maioria das espécies de *Orthophytum* (Fig. 2G-L), sendo uma pequena projeção cônica acima do nó cotiledonar. Nessas espécies também é comum a presença do suspensor em embriões maduros (Fig. 2G-L).

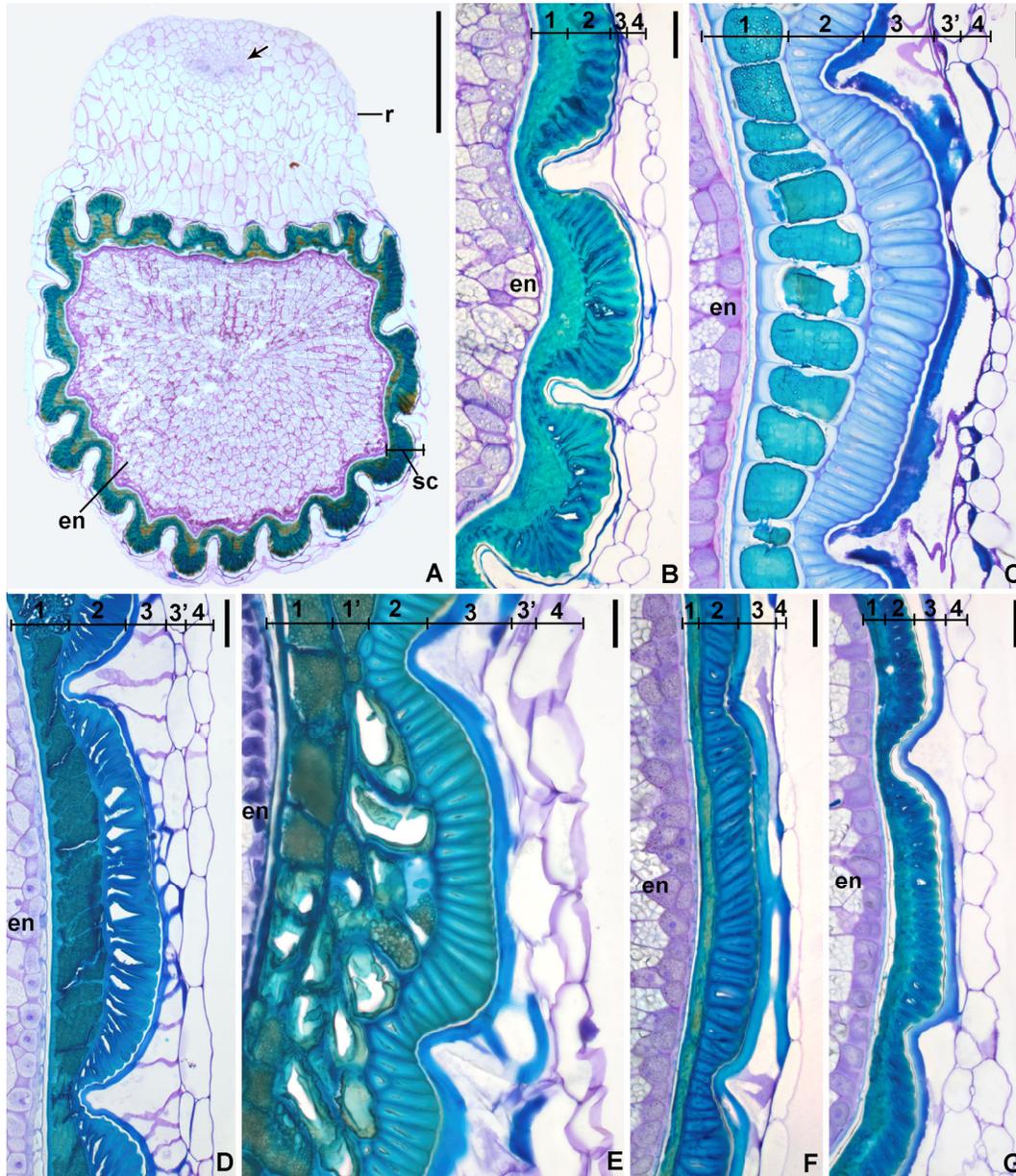


**Figura 2.** Morfologia do embrião. A-L. Embrião em vista lateral. A. *Cryptanthus aff. beuckeri*. B. *C. aff. burle-marxii*. C. *C. pickelii*. D. *C. colnagoi*. E. *C. bahianus*. F. *Siqueiranthus cinereus*. G. *O. saxicola*. H. *O. maracasense*. I. *O. compactum*. J. *O. pseudovagans*. K. *O. leprosum*. L. *O. vagans*. cn = nó cotiledonar; cot = cotilédone; h-r = eixo hipocótilo-radicular. s = suspensor. Barras = 250  $\mu$ m.

#### *Anatomia do envoltório da semente*

A semente em seção transversal mediana mostra um abundante endosperma central, rafe com várias camadas celulares de parênquima e tegumento antirrafeal

formado por ambos os tegmentos (Fig. 3A, 4A, C). Os tégmen costumam ter duas camadas bem distintas (Fig. 3B-G, 4B, D, E-J).



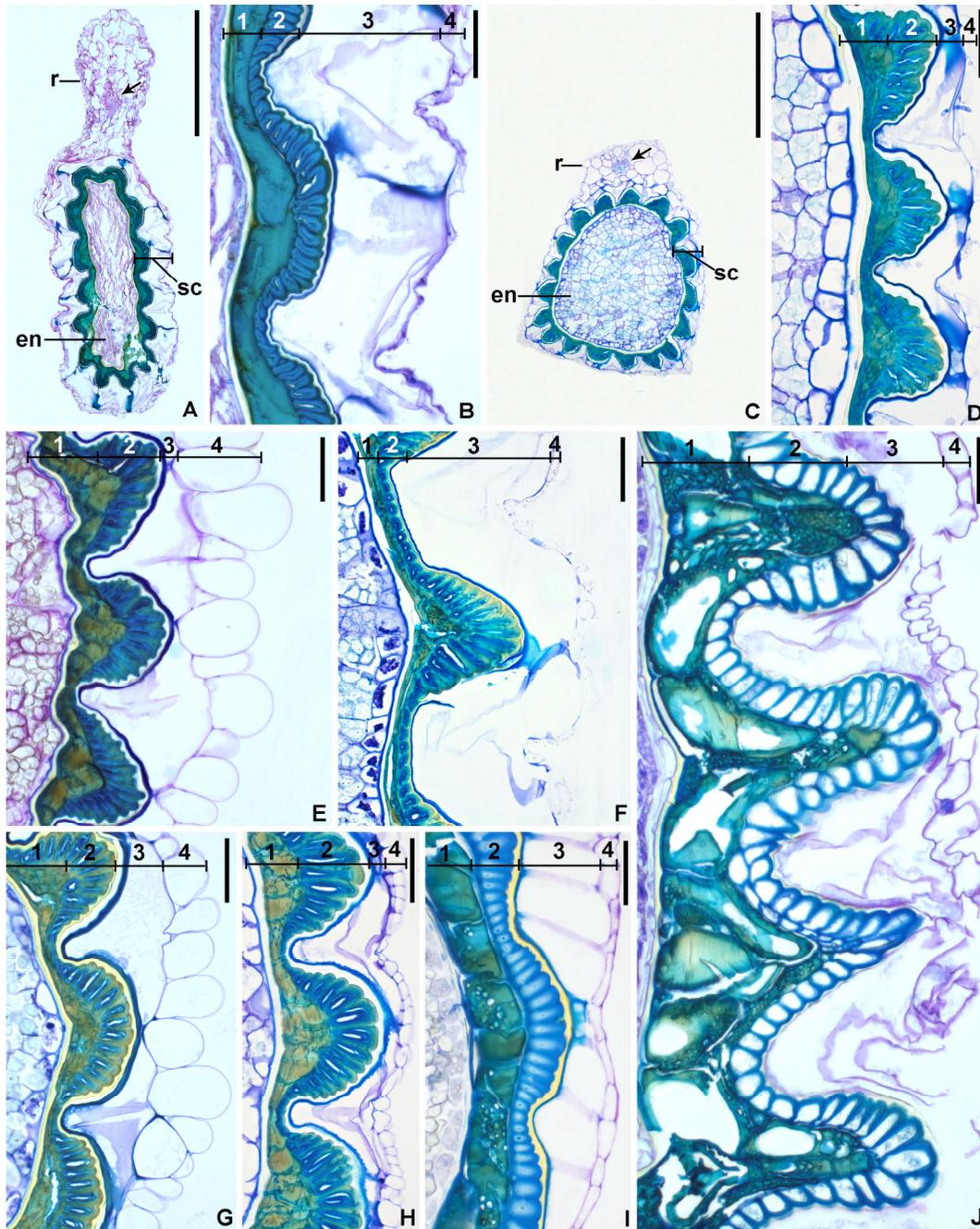
**Figura 3.** Anatomia do envoltório I. A. semente em seção transversal mediana. B-G. tegmento da semente em secção transversal, na região antirrafeal. A-B. *Siqueiranthus cinereus*. C. *Cryptanthus pickelii*. D. *C. colnagoi*. E. *C. aff. burle-marxii*. F. *C. aff. beuckeri*. G. *C. bahianus*. Seta = feixe vascular. en = endosperma. r = rafe. sc = envoltório da semente. Os números indicam as diferentes camadas do envoltório. 1 = endotégmen (com elementos descontínuos do mesotégmen). 1' = mesotégmen. 2 = exotégmen. 3 = endotesta. 3' = mesotesta. 4 = exotesta. Barras: A = 500  $\mu$ m. B-G = 50  $\mu$ m.

A presença de costelas e sulcos no exotégmen é comum nas espécies analisadas e corresponde às bandas costais e intercostais percebidas externamente (Fig. 1A-T). As células nas bandas costais são maiores e de seção transversal retangular ou elíptica, e as intercostais são menores e frequentemente com lúmen reduzido. O endotégmen forma uma camada comprimida com o mesotégmen, quando este está presente, e acumula compostos fenólicos em abundância no lúmen celular. A presença de cutícula espessa, externa ao exotégmen e interna ao endotégmen, também é uma característica comum das espécies analisadas. Na testa, as células da endotesta têm paredes celulares secundárias e espessas, especialmente as paredes periclinais internas. As células da exotesta possuem paredes celulares primárias e não espessadas, caracterizando uma sarcotesta parcial.

Na região antirrafeal, *S. cinereus* apresenta endotesta pouco espessada, exotégmen com bandas costais variando de 15 a no máximo 20 células de largura e bandas intercostais com 4-6 células de largura (Fig. 3B). As paredes celulares do exotégmen são fortemente espessadas e com paredes celulares tortuosas. O endotégmen forma uma camada comprimida com poucos elementos do mesotégmen nas regiões costais. As paredes celulares e os lúmens celulares nessas camadas não são perceptíveis devido à compressão e abundância de compostos fenólicos armazenados. Em contraste, as espécies de *Cryptanthus* analisadas (Fig. 3C-G) apresentam endotesta com paredes periclinais internas fortemente espessadas, que podem apresentar micro-ornamentações voltadas para o lúmen celular (Fig. 3C, G). Quando presente, a mesotesta também apresenta espessamento secundário (Fig. 3C-E). O tégmen varia em espessura em diferentes espécies de *Cryptanthus*. Pode apresentar de duas a várias camadas de células não comprimidas, como em *C. aff. burle-marxii* (única espécie com mesotégmen contínuo na antirrafe) (Fig. 3E), ou ser comprimida, como em *C. aff. beuckeri* e *C. bahianus*, cujos lúmens e paredes celulares do endotégmen estão quase totalmente descaracterizados (Fig.

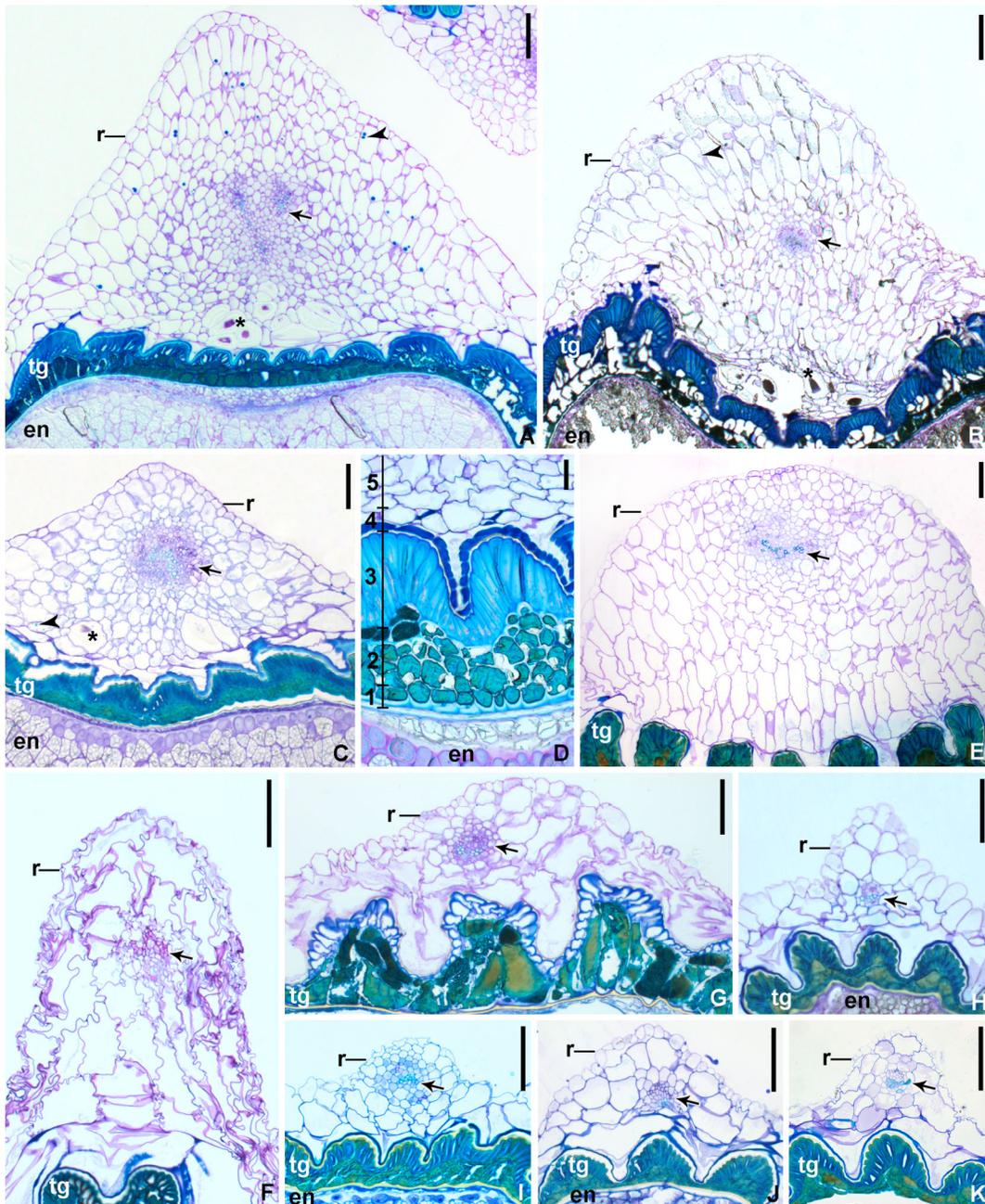
3F-G). Quando os lúmens são visíveis, um padrão de espessamento em forma de U basal é percebido no endotégmen (Fig. 3C-D). Independentemente da espessura do tégmen, o exotégmen tem paredes celulares fortemente espessadas e regulares, bandas costais de 20-40 células de largura e bandas intercostais de 2-3 células de largura em todas as espécies de *Cryptanthus* analisadas (Fig. 3C-G).

A endotesta é ligeiramente espessada nas outras espécies, especialmente nas paredes periclinais internas, mas as paredes celulares anticlinais também podem ser espessadas acima das bandas costais do tégmen (Fig. 4A-J). Em *K. roseolilacinus* as bandas costais têm 15-20 células de largura e as bandas intercostais 4-6 células de largura (Fig. 4B). As paredes celulares nesta região são ligeiramente tortuosas. Devido à compressão lateral da semente nesta espécie, existem apenas 2-3 costelas tégmicas na região rafeal (Fig. 4A), e um número total de costelas menor quando comparado às espécies de *Orthophytum* (Fig. 4C). Neste gênero, as bandas costais têm de 8 a 15 células no máximo de largura e as costelas são cônicas curtas a elípticas em seção transversal. As bandas intercostais geralmente têm de duas a quatro células de largura, exceto em *O. leprosum*, cujas bandas intercostais têm de 6 a 12 células de largura (Fig. 4F). O endotégmen é muito comprimido, com paredes celulares e lúmens imperceptíveis na semente madura em todas as espécies de *Orthophytum*. Em *Orthocryptanthus vasconselosianum*, além das bandas costais e intercostais, o tégmen apresenta profundas ondulações ou sinuosidades (Fig. 4J), diferindo do típico padrão costado encontrado em todas as outras espécies. Nesse caso, a transição entre duas bandas não é abrupta e varia de 15 a 20 células de largura. As bandas intercostais não possuem limite bem definido, estando presentes em sulcos de aproximadamente 4 a 8 células de largura. Nesse caso, o mesotégmen descontínuo de células alongadas, abaixo das bandas costais, é muito mais sinuoso do que qualquer outra espécie analisada.



**Figura 4.** Anatomia do envoltório II. A, C. Semente em seção transversal mediana. B, D-J: envoltório da semente em seção transversal mediana, na região antirrafeal. A, B. *Krenakanthus roseolilacinus*. C, D. *Orthophytum vagans*. E. *O. compactum*. F. *O. leprosum*. G. *O. maracasense*. H. *O. pseudovagans*. I. *O. saxicola*. J: *Orthocryptanthus vasconcelosianus*. Seta = feixe vascular. en = endosperma. r = rafe. sc = envoltório da semente. Os números indicam as diferentes camadas do envoltório da semente. 1 = endotégmen (com elementos descontínuos do mesotégmen). 2 = exotégmen. 3 = endotesta. 4 = exotesta. Barras: A, C = 500 µm. B, D-J: 50 µm.

A região rafeal (Fig. 5A-K) é formada por uma epiderme idêntica à exotesta da região antirrafeal, um único feixe vascular e várias camadas de parênquima, abaixo das quais se localizam a endotesta e o tégmen. A rafe é triangular em seção transversal nos representantes de *Cryptanthus* (Fig. 5A-D), possuindo várias camadas de parênquima (8-12 ou mais). O feixe vascular colateral pode ter de um a três polos de floema, sendo maciço e localizado centralmente (Fig. 5A-C). Abundantes grãos proteicos são observados no parênquima, assim como idioblastos com ráfides, estes apenas próximos à região do tégmen. Em todas as espécies, o tégmen apresenta três ou mais camadas na região da rafe, devido ao incremento das camadas do mesotégmen, que se torna contínua (Fig. 5D). Em *S. cinereus* também há várias camadas de parênquima na rafe (12 ou mais), mas esta é obtusa em corte transversal (Fig. 3A, 5E). O feixe vascular localiza-se próximo à periferia do parênquima, no polo oposto ao tégmen. Nesse caso, as células do parênquima próximas ao tégmen são mais volumosas que as da periferia, tornando esse tecido assimétrico em corte transversal (Fig. 3A, 5E). Não foram observados cristais de proteínas ou idioblastos com ráfides no parênquima nesta espécie. O tégmen possui as mesmas características da região antirrafeal. A rafe de *K. roseolilacinus* difere das demais espécies pelo formato oblongo ou estreito em seção transversal, com 6 a 8 camadas de parênquima, ligeiramente assimétricas (Fig. 4A, 5F). *O. vasconcelosianus* possui rafe achatada, com 4 a 6 camadas celulares e tégmen semelhante à região antirrafeal (Fig. 5G). Em todas as espécies de *Orthophytum*, a rafe é triangular em seção transversal e possui 2-3 camadas de parênquima, sendo o tégmen semelhante à região antirrafeal (fig. 5H-K).



**Figura 5.** Anatomia da rafe. A-K. Seção transversal mediana da região rafeal. A. *Cryptanthus colnagoi*. B. C. 9487. C. *C. bahianus*. D. *C. pickelii*. Detalhe do tégmen na região rafeal. E. *Siqueiranthus cinereus*. F. *Krenakanthus roseolilacinus*. G. *Orthocryptanthus vasconcelosianus*. H. *Orthophytum compactum*. I. *O. maracasense*. J. *O. vagans*. K. *O. pseudovagans*. Seta: feixe vascular. Cabeça de seta: grão de proteína. en = endosperma. r = rafe. tg = tégmen. Os números em D indicam: 1 = endotégmen. 2 = mesotégmen. 3 = exotégmen. 4 = endotesta. 5 = parênquima. Barras: A-C, E-K = 100 µm. D = 50 µm.

## Discussão

A morfologia da semente e do embrião e as características anatômicas do envoltório da semente foram informativas e úteis na delimitação dos gêneros aqui tratados, além de serem importantes no reconhecimento de outros gêneros em Bromelioideae núcleo (Silva *et al.*, 2020; Leme *et al.*, 2021) e linhagens sem tanques (Carvalho *et al.*, 2023 no prelo) incluindo os Cryptanthoides, como *Rokautskyia* e *Hoplocryptanthus* (Carvalho *et al.*, 2023 no prelo). Dentre as características gerais das sementes desse grupo, destacam-se o padrão em bandas do envoltório devido ao tégmen costado, além da presença de endotesta com células de paredes secundárias e geralmente espessadas. A semente é, portanto, tégmica, mas parcialmente testal. Padrões de espessamento na endotesta, largura das bandas costal e intercostal do tégmen, além de características da rafe, são caracteres bastante variáveis a nível genérico neste grupo (Carvalho *et al.*, 2023 no prelo).

Neste estudo, *Siqueiranthus cinereus* difere de todos os representantes de *Cryptanthus* pela rafe retilínea (vs. curvada na base), embrião pequeno e subdesenvolvido (vs. embrião grande e diferenciado, com cotilédone lateralizado ou capitado), além de várias características anatômicas. Na antirrafe, a largura das bandas costais (15-20 células de largura vs. 20-40 células de largura) e bandas intercostais (4-6 células de largura vs. 2-3 células de largura), a presença de paredes tortuosas no exotégmen (vs. paredes regulares) e endotesta ligeiramente espessada (vs. fortemente espessada) são características distintivas de *S. cinereus* quando comparadas com *Cryptanthus*. Na rafe, a forma obtusa em secção (vs. triangular), o feixe vascular periférico (vs. geralmente central) e o tégmen semelhante ao da antirrafe (vs. com incremento das camadas do mesotégmen) são as principais diferenças quando comparadas com espécie de *Cryptanthus*. Além disso, neste gênero, parece ser comum a presença de abundantes grãos

proteicos nas células do parênquima rafeal, como evidenciado em testes histoquímicos para *C. colnagoi* e *C. pickelii* (Carvalho *et al.*, 2023 no prelo), além de idioblastos com ráfides sempre adjacentes ao tégmen. Dentre as espécies de *Cryptanthus* analisadas, a principal característica morfológica variável foi o tamanho da semente, o que parece não influenciar nos caracteres anatômicos gerais. Na anatomia da antirrafe, a presença de mesotégmen e a espessura do tégmen devido à sua compressão foram os caracteres mais variáveis, e na rafe, o número de camadas de parênquima.

Quanto ao embrião, o embrião pequeno de *S. cinereus* (subdesenvolvido, *sensu* Baskin & Baskin, 2007) é bastante semelhante ao das espécies de *Orthophytum* e contrasta com o embrião grande ou totalmente desenvolvido (*sensu* Baskin & Baskin, 2007) de *Cryptanthus*, com cotilédone visível. O cotilédone lateralizado caracteriza provavelmente um embrião lateral na classificação de Martin (Martin, 1946), embora esta hipótese necessite de uma investigação anatômica, assim como para o embrião capitado encontrado em *C. bahianus*. Embora espécies distantes de Bromeliaceae tenham conservado a embriogênese inicial (Carvalho & Mariath, 2021), a diferenciação embrionária final pode ser variável entre os gêneros em Tillandsioideae (Magalhães & Mariath, 2012) e Bromelioideae (Leme *et al.*, 2021). Isso gera morfologias embrionárias distintas e provavelmente adaptações fisiológicas (como dormência) na semente madura, o que aponta a utilidade dos caracteres embrionários na delimitação dos gêneros no presente estudo.

A semente de *K. roseolilacinus*, achatada lateralmente, de rafe oblonga estreita e massiva em seção transversal difere de todas as espécies de *Orthophytum*, com semente menor, angulosa e com rafe triangular em seção transversal, com poucas camadas de parênquima. Na antirrafe, a largura das bandas costais (15-20 vs. 8-15) e a presença de células com paredes tortuosas no exotégmen (vs. paredes celulares regulares) são as

principais diferenças anatômicas em relação às espécies de *Orthophytum*. *O. vasconcelosianus* também se destaca dos demais cryptanthoides pela morfologia da semente (oblongoide e não achatada ou angular), e principalmente pela anatomia do tegumento, em que o tégmen apresenta profundas ondulações, além das bandas costais e intercostais. Um padrão semelhante foi encontrado, embora em menor grau, apenas em espécies de *Rokautskyia* (Carvalho *et al.*, 2023 no prelo).

## Referências

- Baskin CC, Baskin JM. 2007.** A revision of Martin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. *Seed Science Research* **17(1)**: 11-20.
- Carvalho JDT, Leme EMC, Mariath, JEA. 2023.** The seed coat in the evolutionary context of Bromelioideae (Bromeliaceae): morphoanatomical diversity and ontogeny in the core and tankless lineages. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **boac072**.
- Carvalho JDT, Mariath JEA. 2021.** Embryo and endosperm development in *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel (Bromelioideae-Bromeliaceae) and its implications for the embryonomy of Bromeliaceae. *Flora* **281**: 151867.
- Magalhães RI, Mariath JEA. 2012.** Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* **298**: 1881–1895.
- Martin AC. 1946.** The comparative internal morphology of seeds. *The American Midland Naturalist* **36(3)**: 513-660.
- Silva KR, Stützel T, Oriani A. 2020.** Seed development and its relationship to fruit structure in species of Bromelioideae (Bromeliaceae) with fleshy fruits. *Botanical Journal of the Linnean Society* **192**: 868-886.

**Excerto III - Morfoanatomia do envoltório da semente em uma peculiar nova espécie de *Krenakanthus***

Título do artigo (ainda não publicado): **A “hairy situation” in Minas Gerais, Brazil: a striking new species of *Krenakanthus* (Bromeliaceae: Bromelioideae) covered with uniseriate trichomes**

**Autores:** Elton M. C. Leme, Paulo M. Gonella, Dayvid R. Couto, Eduardo P. Fernandez, Jordano D. T. de Carvalho, Pedro S. de Almeida & Jorge E. A. Mariath.

**Abstract**

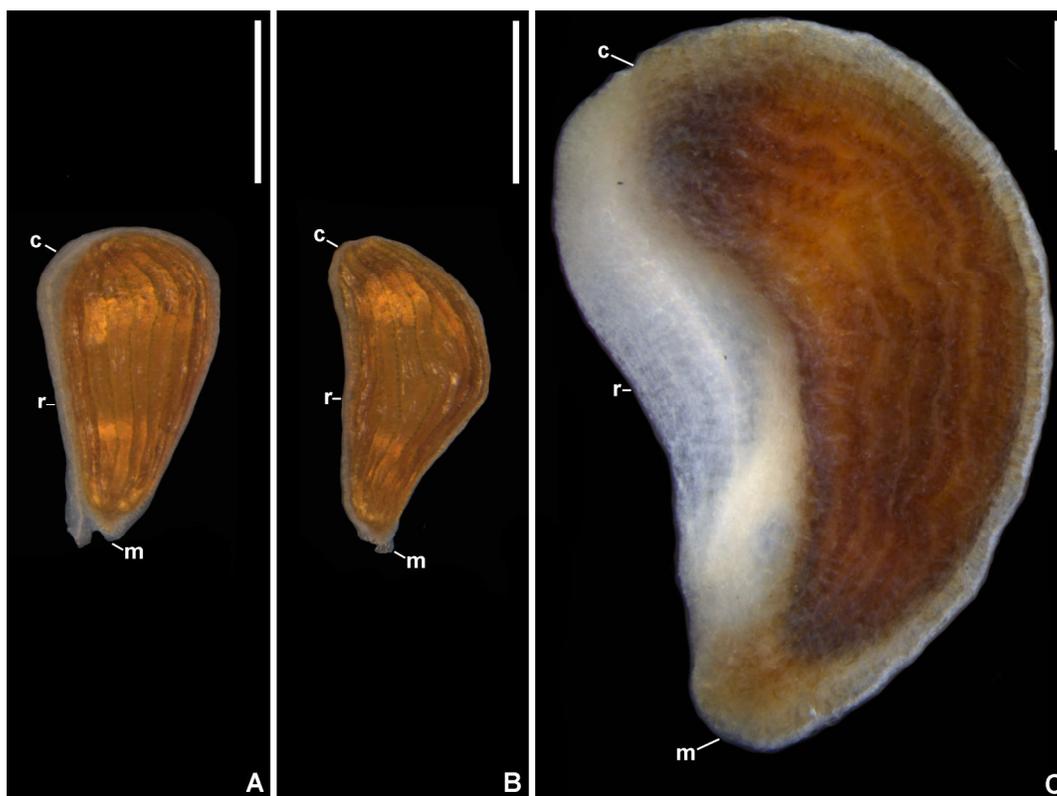
A new species of *Krenakanthus*, a member of the bromelioid “Cryptanthoid complex”, is described based on plants discovered through collaborative citizen science. *Krenakanthus ribeiranus* and its only congener *K. roseolilacinus* are endemic to the “João Pinto Center of Biodiversity”, a still poorly explored region with Campos Rupestres and associated vegetation in the Rio Doce Valley, in eastern Minas Gerais state, Brazil. The unusual combination of morphological characters of *K. ribeiranus*, highlighted by plant delicacy and almost all leaf and flower parts covered by uniseriate, hair-like trichomes, is illustrated and discussed in comparison with *K. roseolilacinus*, including leaf and seed anatomy, as well as pollen morphology. This micro-endemic species is assessed as Critically Endangered, reinforcing the need for strategy to protect the biodiversity of the region. The morphology of the new species validates and strengthen the diagnostic flower characters used in the circumscription of *Krenakanthus*, suggesting as secondary diagnostic characters the habit, stature, and leaf conformation.

**Key words:** anatomy, Campos Rupestres, *Cryptanthoid complex*, João Pinto Center of Biodiversity, morphology, uniseriate trichomes.

## Resultados

### *Morfoanatomia do envoltório da semente*

As sementes das espécies analisadas são exapendiculadas, obovoides a ovoides, amarelo ocre, com faixas longitudinais ou sulcos no envoltório (Fig. 1A-C). Em *Krenakanthus ribeiranus* a semente é pequena (aprox. 0,8 mm), com rafe discreta e não achatada lateralmente (Fig. 1A-B), ao contrário de *K. roseolilacinus*, com sementes maiores (até 2,5 mm de comprimento) e achatadas lateralmente, com rafe conspícua (Fig. 1C).



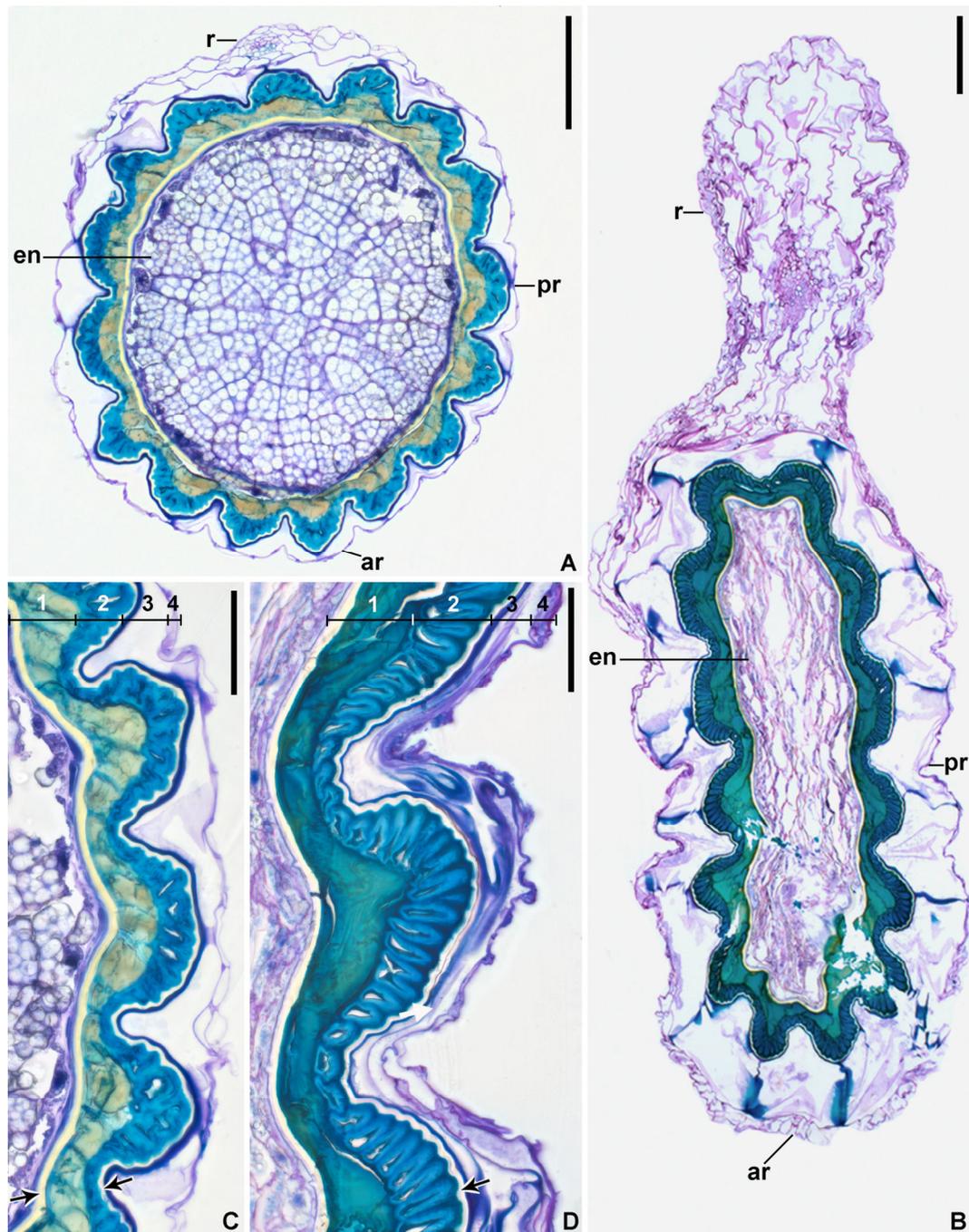
**Figura 1.** Morfologia da semente em *Krenakanthus*. A-B. *Krenakanthus ribeiranus*. C. *K. roseolilacinus*. A-C. Sementes em vista lateral. c = calaza. m = micrópila. r = rafe. Barras = 0,5 mm.

A semente em seção transversal mediana das espécies analisadas apresenta um endosperma central e tegumento formado tanto por tégmen e testa na rafe e antirrafe (Fig.

2A-D). A secção transversal da semente é circular ou angulosa em *K. ribeiranus* (Fig. 2A) e elíptica (achatada lateralmente) em *K. roseolilacinus* (Fig. 2B). A rafe é formada pela exotesta, um único feixe vascular e várias camadas de parênquima, abaixo das quais se localizam a endotesta e o tégmen. A rafe em *K. ribeiranus* é achatada a triangular, com 2-3 camadas de células de parênquima testal, diferindo de *K. roseolilacinus* por sua rafe com 5 a 6 camadas de parênquima testal, com formato oblongo ou estreito em secção transversal (Fig. 2B).

Na anti-rafe, o tégmen costuma apresentar duas camadas bem diferenciadas em ambas as espécies (Fig. 2C-D). A presença de costelas e sulcos no exotégmen ocorre em ambas as espécies analisadas e corresponde às bandas costais e intercostais percebidas externamente (Fig. 1A-C). As células nas bandas costais são maiores e de secção transversal retangular ou elíptica e as intercostais são menores e frequentemente com lúmen muito reduzido. Uma camada comprimida é formada pelas paredes das células do endotégmen e possivelmente do mesotégmen, acumulando compostos fenólicos em abundância no lúmen celular (Fig. 2C-D). A presença de cutícula espessa, externa ao exotégmen e interna ao endotégmen, também é uma característica comum às espécies analisadas (Fig. 2C-D, seta). Em *K. ribeiranus*, as bandas costais do exotégmen têm 8-12 células de largura e as bandas intercostais 1-3 células de largura (Fig. 2C). Em *K. roseolilacinus* as bandas costais têm 15-20 células de largura e as bandas intercostais 4-6 células de largura (fig. 2D). Devido à compressão lateral da semente nesta espécie, existem apenas 2-3 costelas tégmicas na rafe (Fig. 2D), e um número total de costelas menor quando comparado a *K. ribeiranus* (Fig. 2C). As paredes celulares do exotégmen são levemente tortuosas em ambas as espécies analisadas. Na testa, as células da endotesta têm paredes celulares secundárias e espessas, especialmente as paredes periclinais

internas. As células da exotesta possuem paredes celulares primárias e não espessadas, caracterizando uma sarcotesta parcial semelhante em ambas as espécies (Fig. 2A-D).



**Figura 2.** Anatomia da semente. A, C. *Krenakanthus ribeiranus*. B, D. *K. roseolilacinus*. A-B. Sementes em seção transversal mediana. C-D. Detalhe do tegumento da semente em anti-rafe. Cabeça de seta: cutícula tégmica. ar = anti-rafe. en = endosperma. pr = pré-rafe. Os números indicam as diferentes camadas do envoltório da semente. 1 = endotégmen. 2 = exotégmen. 3 = endotesta. 4 = exotesta. Barras: A-B = 200  $\mu$ m. C-D = 50  $\mu$ m.

## Discussão

A morfoanatomia da semente, principalmente do envoltório, mostrou-se relevante na caracterização de *Krenakanthus ribeiranus*, contrastando visivelmente com sua espécie irmã *K. roseolilacinus*. A morfoanatomia comparativa dessa estrutura tem se mostrado relevante na delimitação de espécies e gêneros em Bromelioideae (Leme *et al.*, 2021; 2022), por fornecer, apenas para o envoltório da semente, pelo menos 33 caracteres variáveis nesse grupo (Carvalho *et al.*, 2023) em conjunto com caracteres do embrião (Carvalho & Mariath, 2021; Leme *et al.*, 2021; 2022). Nos cryptanthoides, o envoltório da semente é caracterizado pela presença de um tégmen costado e endotesta com padrões específicos de espessamento secundário (por exemplo, floculoso e papiloso). As bandas costais e intercostais apresentam um número específico de células na maioria dos gêneros (Carvalho *et al.*, 2023), assim como o número de camadas do parênquima rafeal, caracteres relevantes nas recentes proposições de novos gêneros e novo status para este grupo (Leme *et al.*, 2022). Por exemplo, bandas costais largas, com até 40 células, e rafe com múltiplas camadas de parênquima são características de *Cryptanthus* e *Siqueiranthus*, em contraste com *Orthophytum* e gêneros próximos, com um tégmen de bandas costais estreitas (8-15 células) e rafe geralmente com duas a três camadas de parênquima (Leme *et al.*, 2022, Carvalho *et al.*, 2023).

Neste contexto, *Krenakanthus* foi uma exceção quando ainda representado apenas por *K. roseolilacinus*, com sementes achatadas lateralmente (característica única em Cryptanthoides), bandas costais de 15 a 20 células de largura e rafe com várias camadas de parênquima, características não compartilhadas com seu gênero irmão *Orthophytum* (Leme *et al.*, 2022). Já as sementes de *K. ribeiranus* apresentam diferenças marcantes. O que mais chama a atenção é seu tamanho diminuto, sendo a menor semente entre os cryptanthoides e uma das menores em Bromeliaceae, com tamanho equivalente às

menores sementes de *Fosterella* (obs. pess.). Além disso, não apresenta achatamento lateral, sendo obovoide a angular, com bandas costais estreitas (8-12 células) e rafe com duas a três camadas de células. Essas características são semelhantes às observadas em *Orthophytum*, porém em uma semente menor que qualquer espécie desse gênero. As paredes celulares tortuosas do exotégmen são provavelmente uma das únicas características compartilhadas entre as duas espécies de *Krenakanthus*, encontradas apenas em *Siqueiranthus cinereus* entre os Cryptanthoides e em *Ananas nanus* nas Bromelioideae sem tanque (Carvalho *et al.*, 2023).

## Referências

- Leme EMC, Zizka G, Paule J, Aguirre-Santoro J, Heller S, Ramírez-Morillo IM, Halbritter H, Mariath JEA, Carvalho JDT, Forzza RC. 2021.** Re-evaluation of the Amazonian *Hylaeaicum* (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on neglected morphological traits and molecular evidence. *Phytotaxa* **499**: 1-60.
- Leme EMC, Zizka G, Souza EH, Paule J, Carvalho JDT, Mariath JEA, Halbritter H, Ribeiro OBC. 2022.** New genera and a new species in the “Cryptanthoid Complex” (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on the morphology of recently discovered species, seed anatomy, and improvements in molecular phylogeny. *Phytotaxa* **544**: 128-170.
- Carvalho JDT, Leme EMC, Mariath, JEA. 2023.** The seed coat in the evolutionary context of Bromelioideae (Bromeliaceae): morphoanatomical diversity and ontogeny in the core and tankless lineages. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **boac072**.
- Carvalho JDT, Mariath JEA. 2021.** Embryo and endosperm development in *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel (Bromelioideae-Bromeliaceae) and its implications for the embryonomy of Bromeliaceae. *Flora* **281**: 151867.

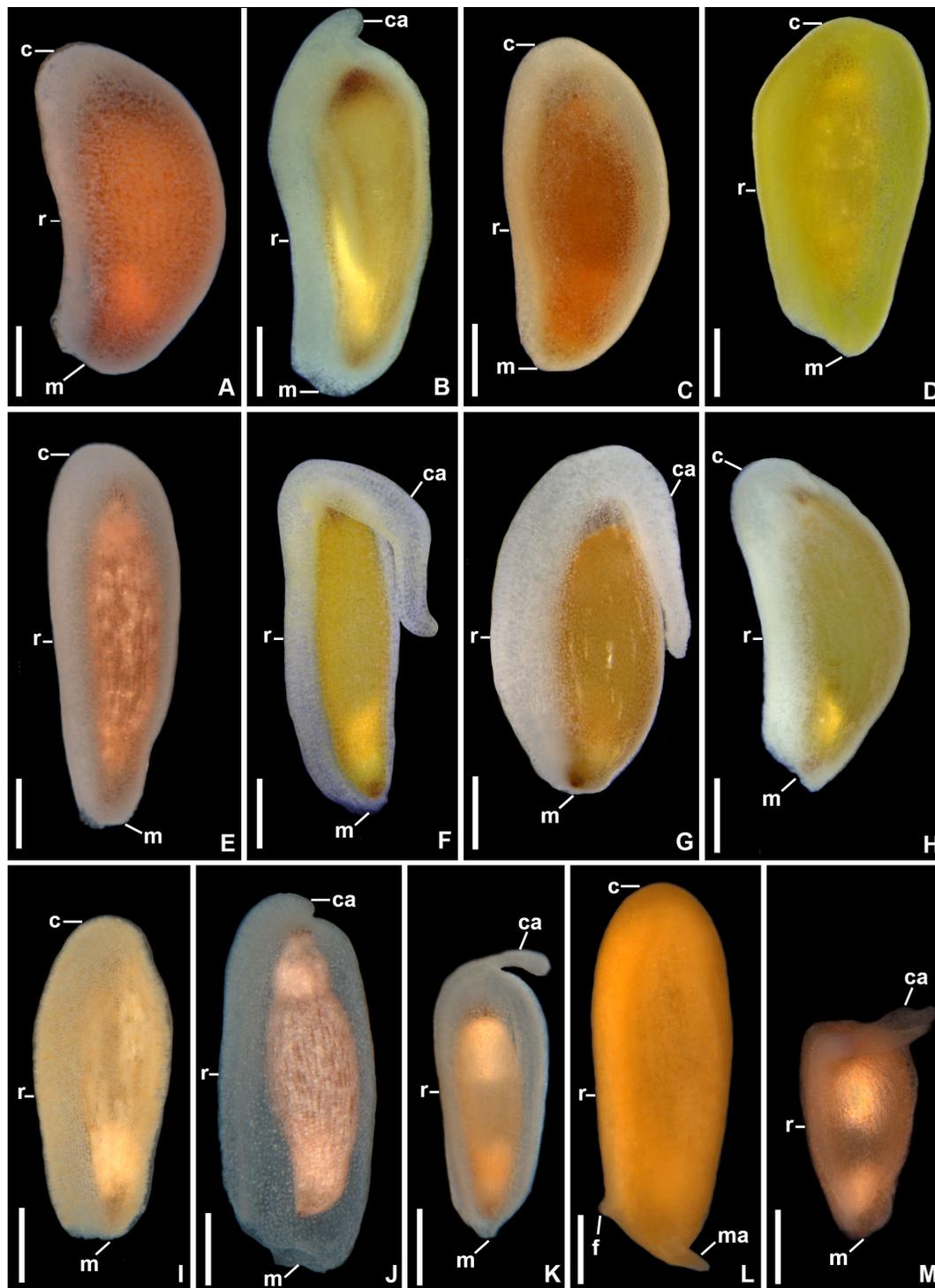
**Excerto IV - A morfoanatomia da semente na circunscrição de *Canistrum* e novo status para *Cucullatanthus*** (ainda sem título ou autores).

**Espécies analisadas:** Para a análise morfoanatômica, foram amostrados frutos frescos e sementes dos seguintes táxons: 16 táxons de *Cucullatanthus* [*Canistrum fosterianum*, *C. montanum*, *Aechmea fosteriana* subsp. *fosteriana*, *A. fosteriana* subsp. *rupicola*, *A. correa-araujoi*, *A. bambusoides*, *A. grazielae*, *A. disjuncta*, *A. aff. disjuncta*, *Quesnelia edmundoi* var. *rubrobracteata*, *Q. edmundoi* var. *edmundoi*, *Q. marmorata* e *Q. vasconcelosiana*] e 4 táxons de *Canistrum* [*Canistrum aurantiacum*, *C. pickelii*, *C. alagoanum* e *C. lanigerum*].

## Resultados

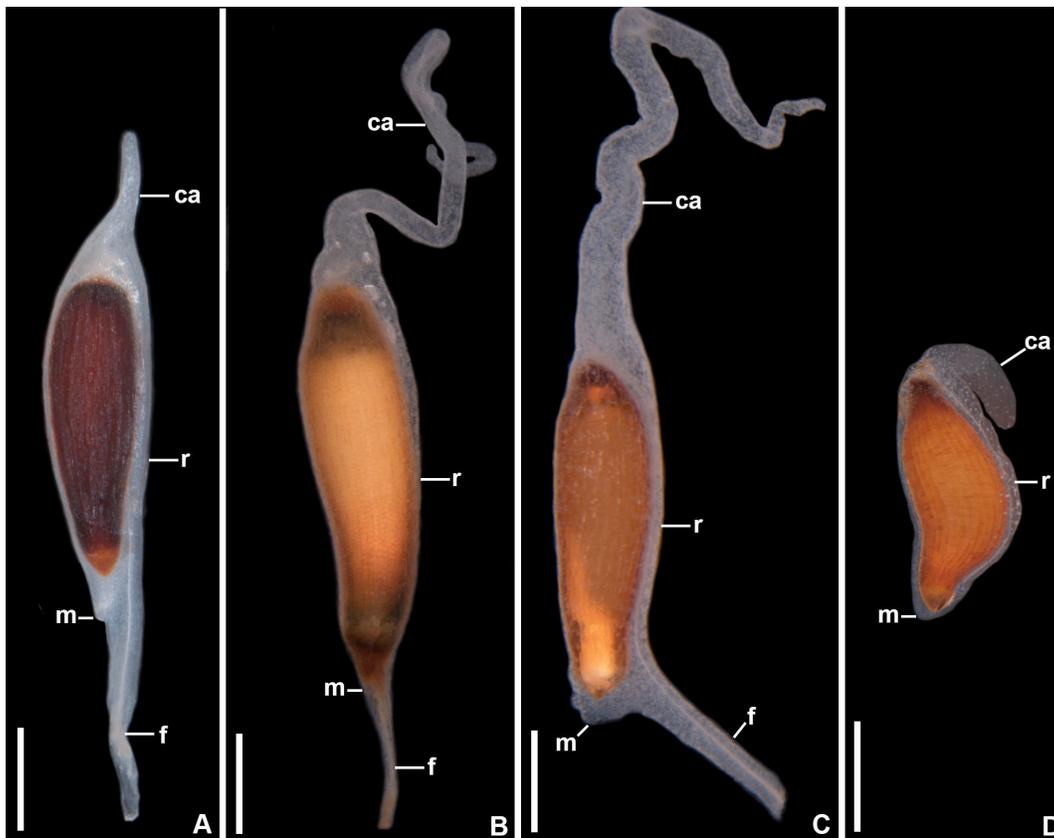
### *Morfologia da semente e do embrião*

As sementes das espécies de *Cucullatanthus* analisadas são curto-obovoides, com 1,5-3 mm de comprimento. O tegumento interno da semente varia do amarelo ao marrom claro e o tegumento externo é geralmente branco, mucilaginoso e efêmero, raramente amarelo pálido ou amarelo alaranjado (*Quesnelia marmorata*) (Fig. 1A-M). O apêndice calazal pode estar ausente, como na maioria das espécies analisadas (Fig. 1A, C-E, H-I) ou vestigiais (Fig. 1B, J, K). *Aechmea bambusoides* e *A. grazielae* são exceções, com um conspícuo apêndice calazal adpresso e curvo (Fig. 1 F-G). Um apêndice calazal curto, lobulado e ligeiramente lateralizado ocorre apenas em *Quesnelia vasconcelosiana* (Fig. 1M). Os apêndices micropilares estão ausentes em *Cucullatanthus*, exceto em *Q. marmorata*, com um apêndice micropilar agudo inconspícuo, lateralizado em oposição ao funículo (Fig. 1L).

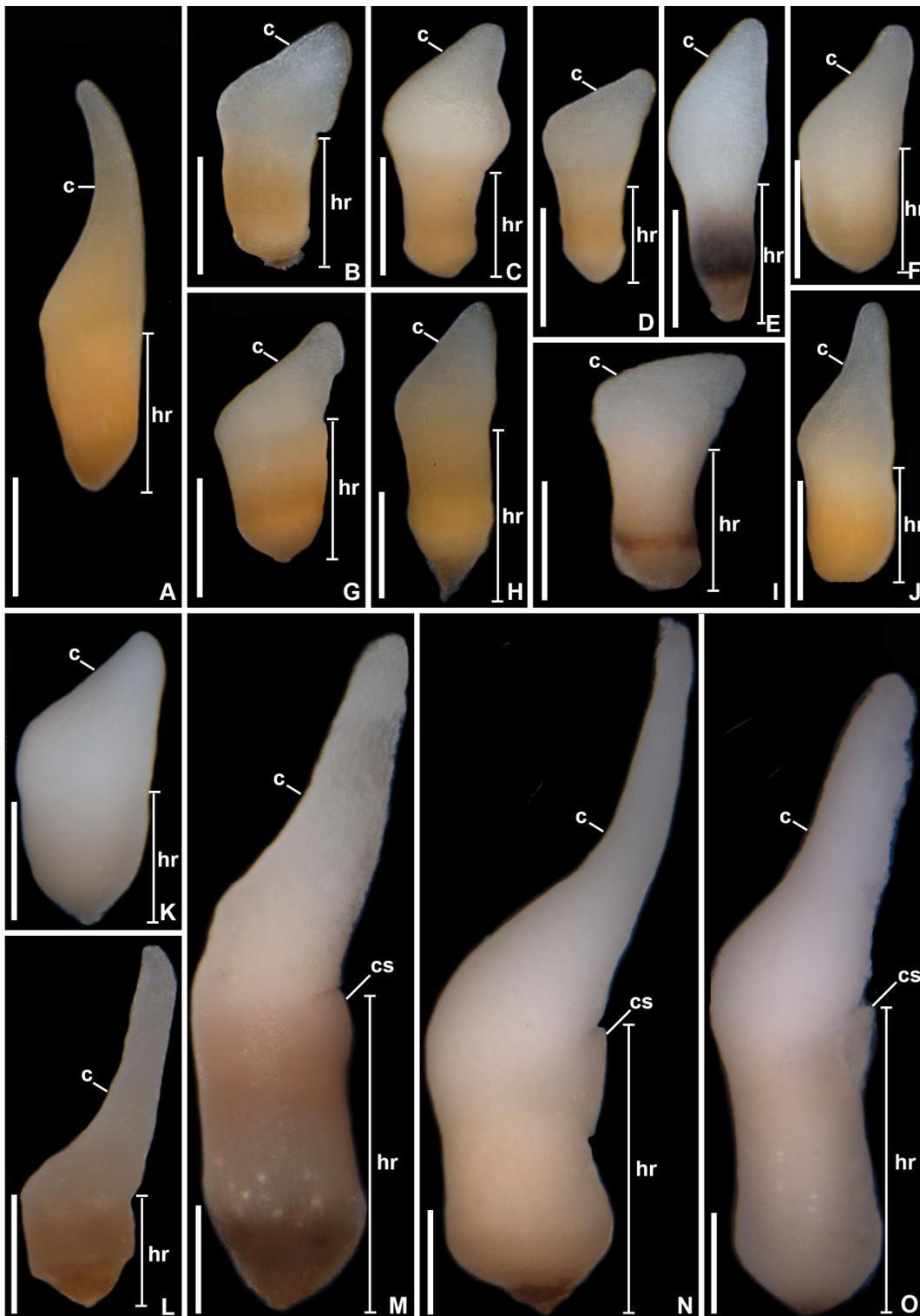


**Figura 1.** Morfologia da semente em espécies de *Cucullatanthus*. A: *Canistrum fosterianum*. B: *C. montanum*. C: *Aechmea fosteriana* subsp. *fosteriana*. D: *A. fosteriana* subsp. *rupicola*. E: *A. correa-araujoi*. F: *A. bambusoides*. G: *A. grazielae*. H: *A. disjuncta*. I: *A.* aff. *disjuncta*. J: *Quesnelia edmundoi* var. *rubrobacteata*. K: *Q. edmundoi* var. *edmundoi*. L: *Q. marmorata*. M: *Q. vasconselosiana*. c = calaza. ca = apêndice calazal. m = região micropilar. ma = apêndice micropilar. r = rafe. Barras = 0,5 mm.

As sementes das espécies de *Canistrum* analisadas são longo-oblongoides, com até 10mm de comprimento na maioria das espécies, exceto *Canistrum lanigerum*, com 2,5-3mm de comprimento. O envoltório interno da semente varia de amarelo ocre a marrom escuro e o externo é translúcido, mucilaginoso e efêmero. Apêndices calazais e/ou micropilares conspícuos ocorrem em todas as espécies analisadas (Fig. 2A-D). O apêndice calazal é terminal, cônico (Fig. 2A) a longo-linear (até 6 mm) (Fig. 1B-C) na maioria das espécies, exceto em *C. lanigerum*, com um apêndice calazal adpresso e lateralizado (Fig. 2D). O apêndice micropilar é conspícuo (até 2 mm de comprimento) na maioria das espécies analisadas (Fig. 2A-C) e é formado principalmente pelo funículo, com extensão micropilar curta (extensão do exóstoma). *C. lanigerum* é a única espécie sem apêndice micropilar (Fig. 2D).



**Figura 2.** Morfologia de sementes em espécies de *Canistrum*. A: *Canistrum aurantiacum*. B: *C. pickelii*. C: *C. alagoanum*. D: *C. lanigerum*. ca = apêndice calazal. f = funículo. m = região micropilar. r = rafe. Barras = 1mm.



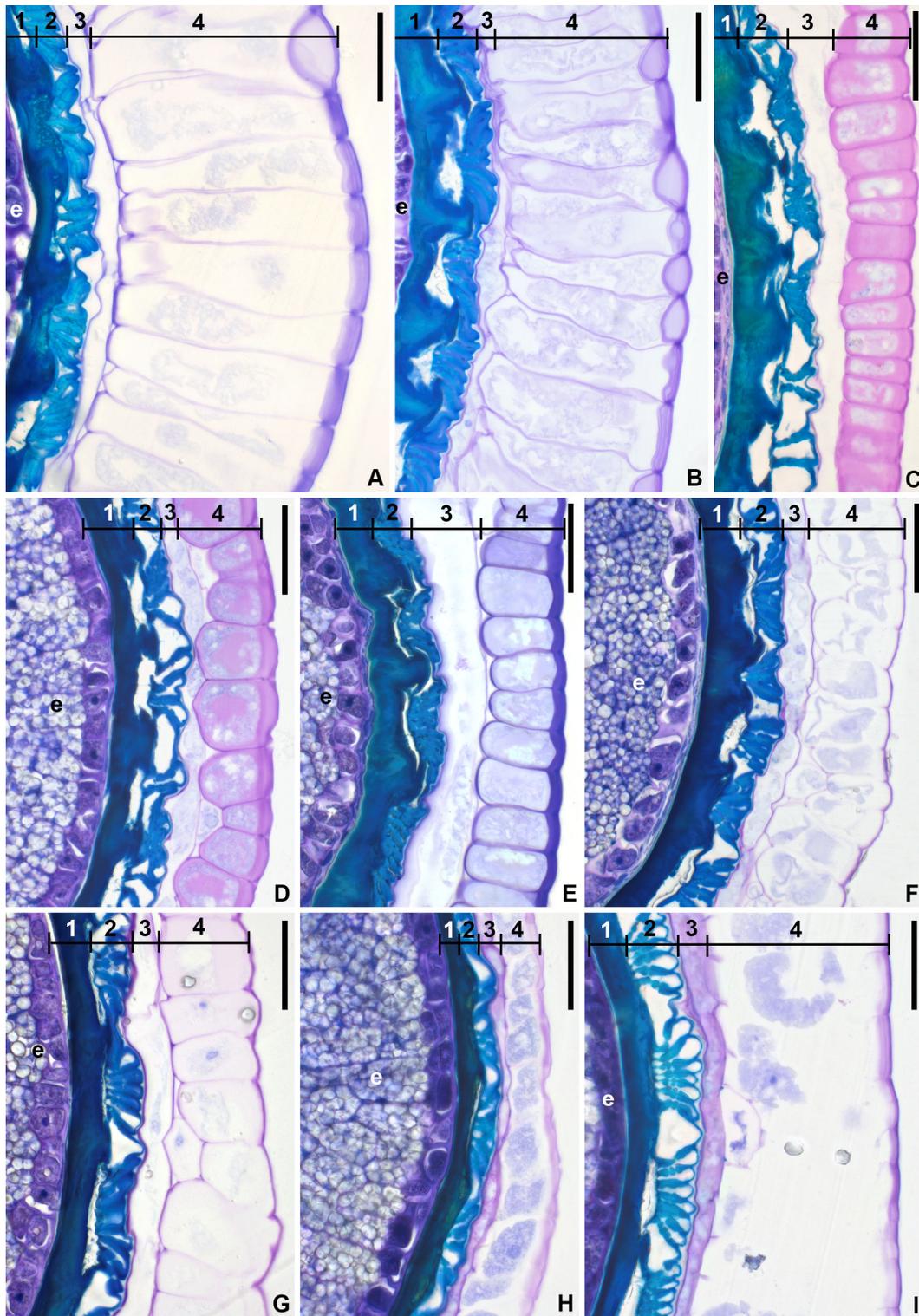
**Figura 3.** Morfologia do embrião. A-K: Espécies de *Cucullatanthus*. L-O: Espécies de *Canistrum*. A: *Canistrum montanum*. B: *C. fosterianum*. C: *Aechmea fosteriana* subsp. *fosteriana*. D: *A. fosteriana* subsp. *rupicola*. E: *A. correa-araujoi*. F: *A. bambusoides*. G: *A. disjuncta*. H: *A. aff. disjuncta*. I: *Q. edmundoi* var. *rubrobacteata*. J: *Q. marmorata*. K: *Q. edmundoi* var. *edmundoi*. L: *Canistrum lanigerum*. M: *C. aurantiacum*. N: *C. alagoanum*. O: *C. pickelii*. c = cotilédone. cs = bainha cotiledonar. hr = eixo hipocótilo-radicular. Barras = 0,3 mm.

O embrião na espécie *Cucullatanthus* é pequeno e muitas vezes pouco desenvolvido, embora diferenciado (Fig. 3A-K). Nessas espécies, o embrião tem um cotilédone geralmente curto, cônico e ligeiramente lateralizado (cerca de 1/3 do comprimento do embrião) e um eixo hipocótilo-radicular curto. *Canistrum montanum* é a única espécie com cotilédone lanceolado e mais alongado (Fig. 3A). Nas espécies de *Canistrum*, o embrião é geralmente mais longo (3 a 4x o embrião de *Cucullatanthus*), com longo cotilédone (Fig. 3L-O). Nestas espécies o cotilédone é longo lanceolado, com *ca.* da metade do comprimento do embrião, e o eixo hipocótilo-radicular longo. O embrião em *Canistrum lanigerum* (Fig. 3L), embora grande, possui *ca.* de metade do comprimento em comparação com as outras três espécies (Fig. 3M-O). Nas espécies de *Canistrum*, a bainha cotiledonar é visível como uma projeção abaixo do nó cotiledonar (3M-O).

#### *Anatomia do envoltório da semente*

O envoltório da semente é formado por ambos os tegumentos em todas as espécies analisadas (Fig. 4A-I; 5-H). A antirrafe compreende o tégmen com duas camadas de células com paredes secundárias espessadas e testa com paredes celulares primárias (pécticas) que variam em número de camadas (duas a quatro) (Fig. 4A-I; 5-H).

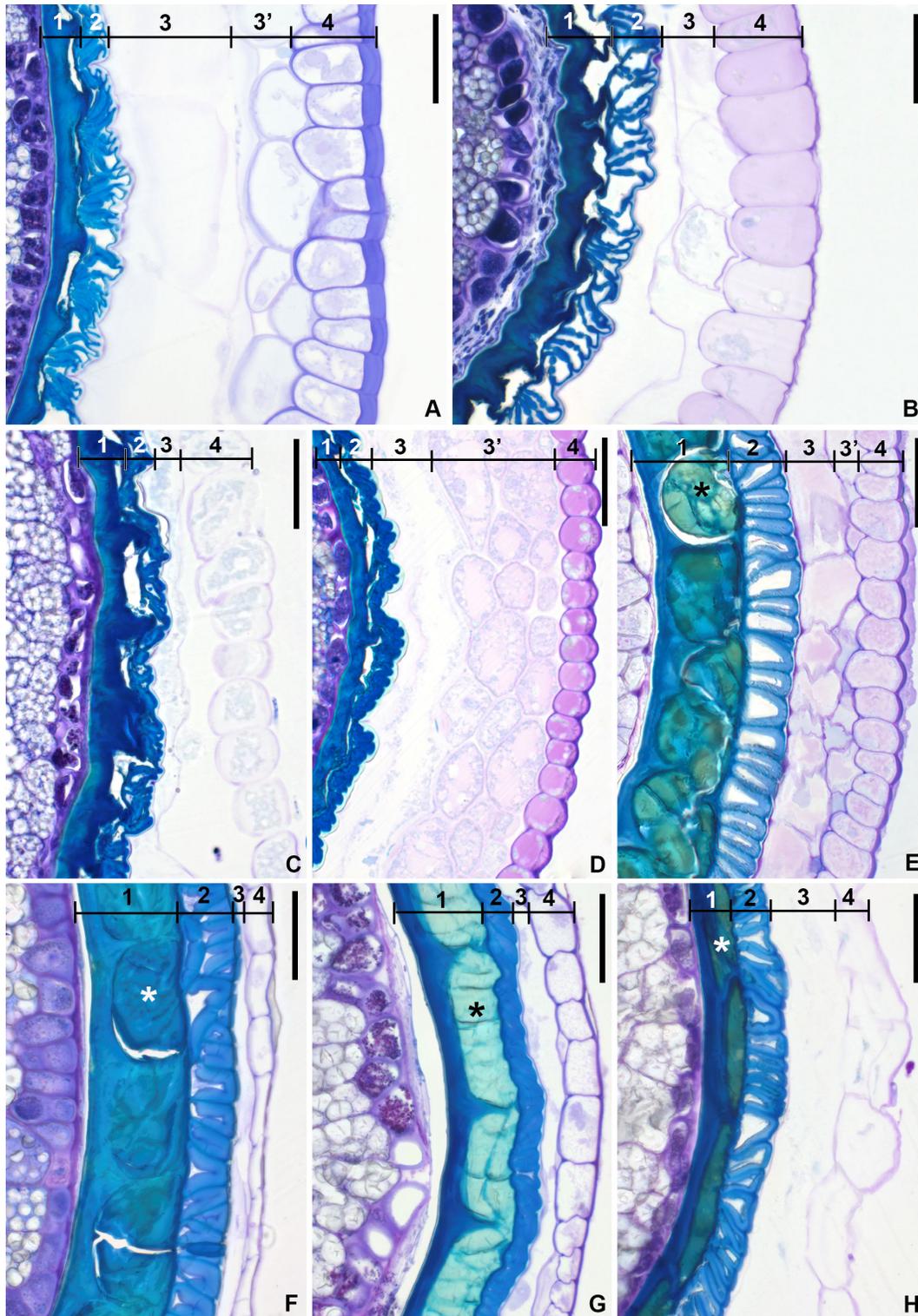
O endotégmen nas espécies de *Cucullatanthus* é fortemente espessado, principalmente nas paredes periclinais internas, sendo o lúmen celular reduzido e sem conteúdo aparente (Fig. 4A-I; 5A-D). Neste gênero as células do exotégmen são espessadas em padrão anticlinal típico (iso-anticlinal), sendo frequentemente comprimidas ou com paredes celulares tortuosas em certas espécies (Fig. 4A, B, E, H; 5C-D). Quando intactas, as células dessa camada apresentam diferentes tamanhos de lúmen (alternados) e perfurações nas paredes anticlinais (Fig. 4C, D, F, G, I; 5A-B).



**Figura 4.** Anatomia da antirrafe I. A-I: antirrafe em seção transversal. A: *Canistrum fosterianum*. B: *C. montanum*. C: *Aechmea fosteriana* subsp. *fosteriana*. D: *A. fosteriana* subsp. *rupicola*. E: *A. correa-araujoi*. F: *A. bambusoides*. G: *A. grazielae*. H: *A. disjuncta*. I: *A. aff. disjuncta*. e = endosperma. Os números indicam as diferentes camadas do envoltório da semente. 1 = endotégmen. 2 = exotégmen. 3 = endotesta. 4 = exotesta. Barras: 50  $\mu$ m.

O endotégmen nas espécies de *Canistrum* é espessado em um padrão em forma de U, com o lúmen celular acumulando compostos fenólicos (Fig. 5E-H). O exotégmen nestas espécies apresenta um padrão regular de espessamento da parede celular, embora o lúmen celular possa ser comprimido (Fig. 5G) e as paredes periclinais internas das células menos espessadas do que as paredes periclinais externas e anticlinais.

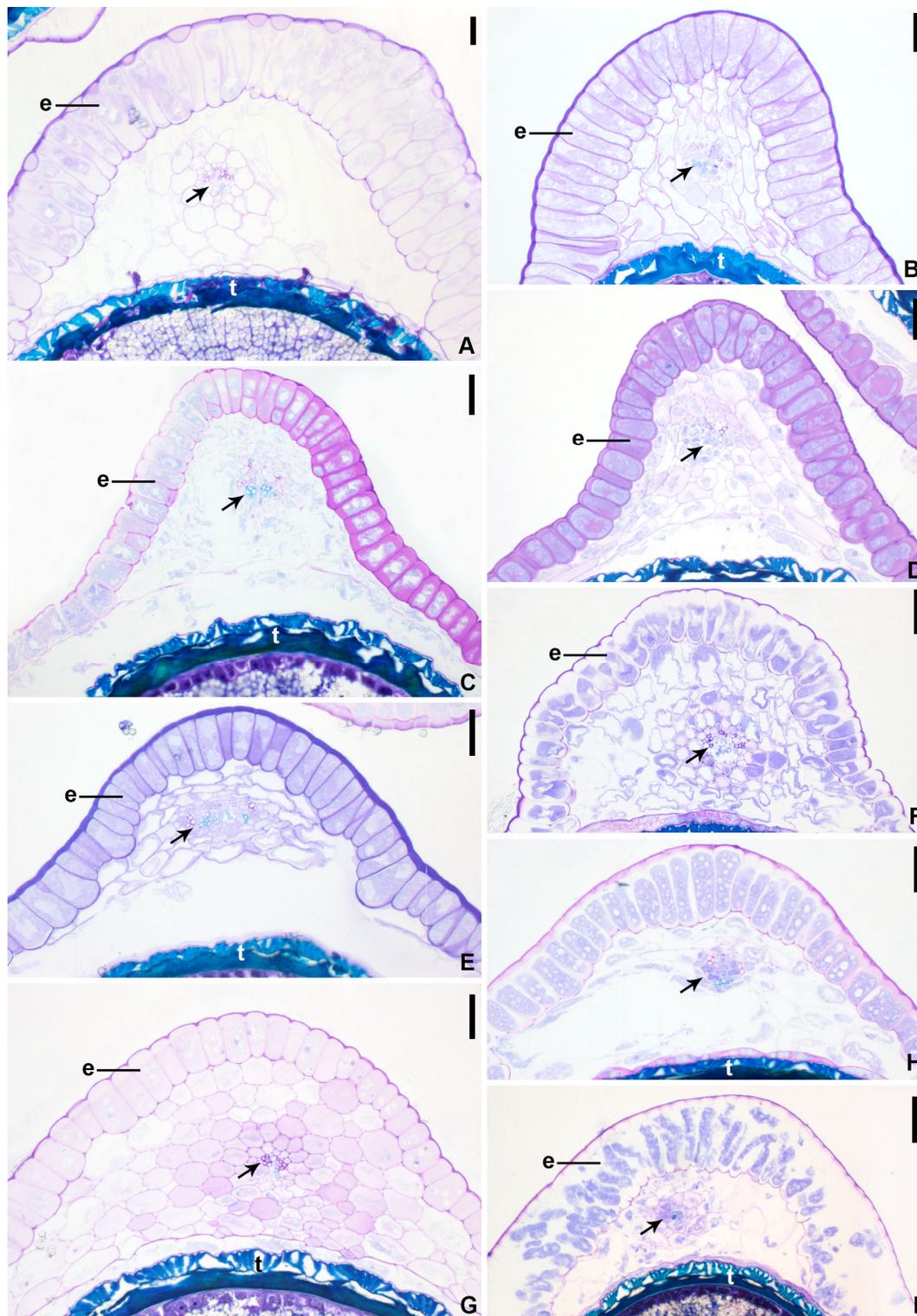
A testa (sarcotesta) compreende duas a quatro camadas de células em *Cucullatanthus*, a exotesta possuindo as células mais volumosas, muitas vezes amplamente espessadas nas paredes periclinais (Fig. 4A-I; 5A-D). Essas células frequentemente acumulam pectinas, sendo o espessamento também péctico (primário). Células alongadas ou prismáticas com espessamento lamelar nas paredes periclinais formam a exotesta apenas em *Canistrum fosterianum* e *C. montanum*, em um padrão em “paliçada” (Fig. 4A-B). Nas outras espécies, as células em exotesta são retangulares a elípticas em seção e não parecem ter espessamento lamelar. A endotesta é frequentemente achatada, com células retangulares ou mesmo colapsadas em seção (Fig. 4C-I; 5 A-C), exceto por *Quesnelia edmundoi* var. *edmundoi*, com células volumosas na endotesta (Fig. 5A). A mesotesta está muitas vezes ausente ou descontínua, sendo especialmente perceptível apenas em *Quesnelia marmorata* (Fig. 5D), com paredes celulares espessadas e íntegras tanto na mesotesta como na endotesta. Nas espécies de *Canistrum*, a testa apresenta duas a três camadas celulares, ligeiramente espessadas nas paredes periclinais da exotesta. As células são achatadas a elípticas em seção e colapsam em sementes maduras de *Canistrum lanigerum*, especialmente na endotesta (Fig. 5H).



**Figura 5.** Anatomia da antirrafe II. A-H: antirrafe em seção transversal A: *Quesnelia edmundoi* var. *edmundoi*. B: *Q. edmundoi* var. *rubrobracteata*. C: *Q. vasconselosiana*. D: *Q. marmorata*. E: *Canistrum aurantiacum*. F: *C. pickelii*. G: *C. alagoanum*. H: *C. lanigerum*. e = endosperma. Os números indicam as diferentes camadas do envoltório da semente. 1 = endotégmen. 2 = exotégmen. 3 = endotesta. 3' = mesotesta. 4 = exotesta. Barras: 50  $\mu$ m.

A região da rafe (Fig. 6A-I; 7A-F) é formada por uma epiderme idêntica à exotesta da antirrafe, com um único feixe vascular e várias camadas de parênquima, abaixo das quais se localizam a endotesta e o tégmen. Uma exotesta com células volumosas é encontrada em espécies de *Cucullatanthus*, repetindo o padrão típico de espessamento da região da rafe (Fig. 6A-I; 7A-C). Neste gênero o parênquima varia entre as espécies de quatro a oito camadas celulares, variando também na integridade celular. No entanto, o parênquima forma sempre uma estrutura massiva que, juntamente com a exotesta, ultrapassa muitas vezes a espessura do tégmen na mesma região (ca. 6 a 10x) (Fig. 6A-I; 7A-C). Em *Canistrum* a rafe é espessa apenas em *Canistrum aurantiacum*, ca. 3 a 4x mais espessa que o tégmen (Fig. 7D). Nas demais espécies a rafe frequentemente perde o conteúdo do parênquima, sendo no máximo 2x mais espessa que o tégmen da mesma região (Fig. 7E-F).

O apêndice calazal nas espécies analisadas é formado por parênquima não vascularizado e epiderme idêntica à exotesta (Fig. 7G-J). Portanto é formado exclusivamente pela testa, sem elementos tégmicos. O apêndice calazal em *Aechmea bambusoides* e *A. grazielae* (Fig. 7G-H) apresenta uma única ou dupla camada de parênquima, circundado por uma epiderme de células volumosas acumulando pectinas e espessadas nas paredes periclinais externas. O apêndice calazal nas espécies de *Canistrum* (Fig. 7I) apresenta muitas camadas celulares de parênquima colapsado, muitas vezes com amplos espaços intercelulares, e epiderme com células idênticas à exotesta. O apêndice micropilar (Fig. 7J), exclusivo das espécies de *Canistrum*, é formado pelo funículo vascularizado, com parênquima e epiderme com paredes celulares primárias e, proximalmente à micropila, por uma extensão do exóstoma da testa, também com paredes celulares primárias.



**Figura 6.** Anatomia da rafe I. A-I = rafe em seção transversal. A: *Canistrum fosterianum*. B: *C. montanum*. C: *Aechmea fosteriana* subsp. *fosteriana*. D: *A. fosteriana* subsp. *rupicola*. E: *A. correa-araujoii*. F: *A. bambusoides*. G: *A. grazielae*. H: *A. disjuncta*. I: *A. aff. disjuncta*. Seta = feixe vascular. e = exostoma. t = tégmen. Barras: 50  $\mu$ m.

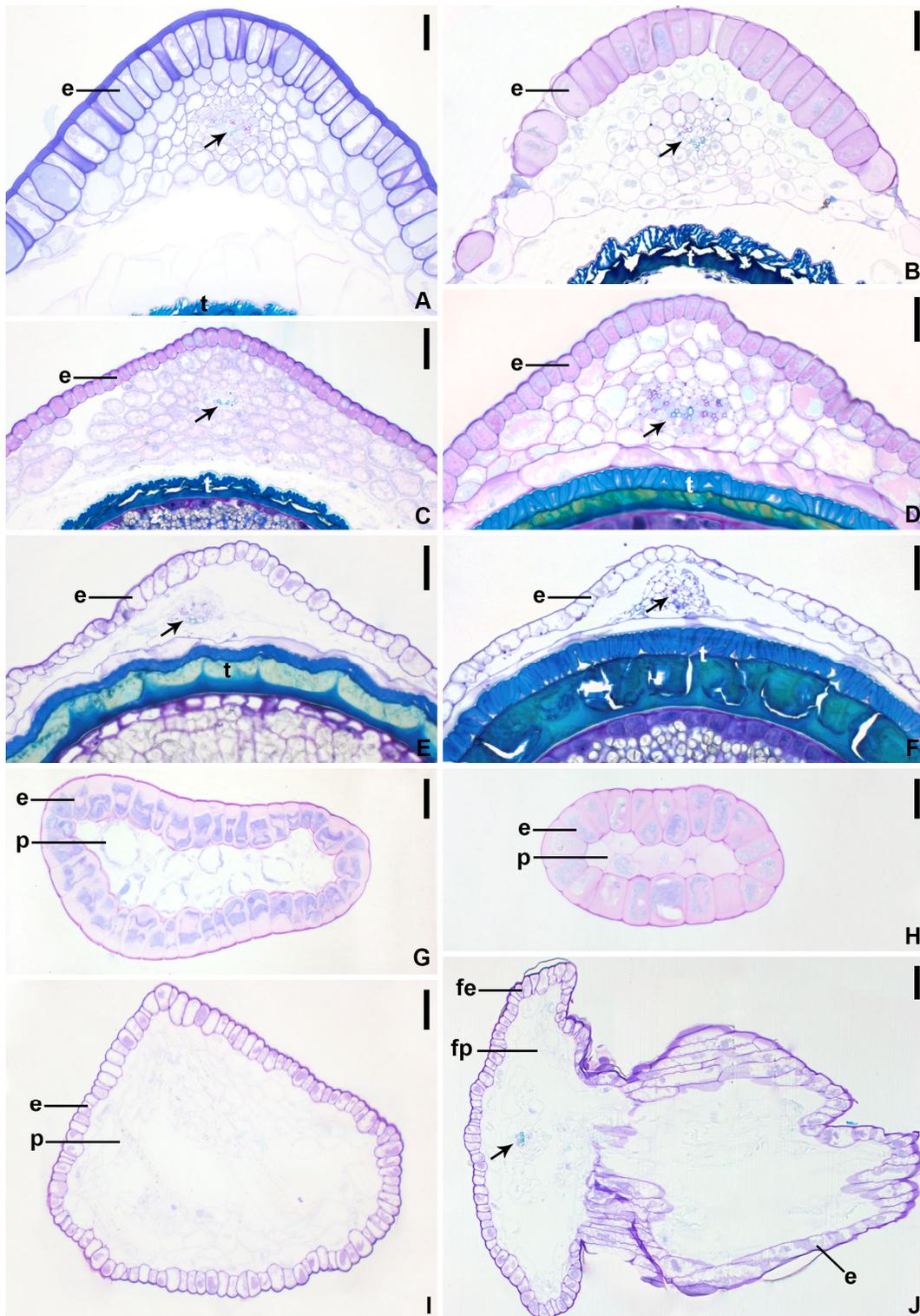


Figura 7. Anatomia da rafe II e anatomia dos apêndices. A-F: rafe em seção transversal. G-J: apêndices em seção transversal. G-I: apêndice calazal. J: apêndice micropilar. R: *Quesnelia edmundoi* var. *edmundoi*. B: *Q. edmundoi* var. *rubrobracteata*. C: *Q. marmorata*. D: *Canistrum aurantiacum*. E: *C. alagoanum*. F: *C. pickelii*. G: *Aechmea bambusoides*. H: *A. grazielae*. I-J: *Canistrum alagoanum*. Seta = feixe vascular. e = exotesta. fe = epiderme funicular. fp = parênquima funicular. p = parênquima. t = tégmen. Barras: 50  $\mu$ m.

## Discussão

A morfologia da semente e, principalmente, a morfoanatomia do envoltório e do embrião têm sido fontes de vários caracteres que têm gerado novos insights sobre a evolução dos caracteres reprodutivos em Bromelioideae, bem como auxiliado na delimitação de gêneros e agrupamentos supragenéricos nesta subfamília (Leme *et al.*, 2021; Leme *et al.*, 2022; Carvalho *et al.*, 2023). A forma da semente, as características anatômicas do envoltório e a morfologia do embrião fornecem várias características úteis para a delimitação de gêneros tanto nas Bromelioideae núcleo quanto nas linhagens sem tanque. Sementes exclusivamente tégmicas, oblongoides, frequentemente mucilaginosas e portadoras de apêndices são comuns em Bromelioideae núcleo, assim como nos gêneros analisados no presente trabalho. A morfologia dos apêndices, os padrões de espessamento do tégmen e o número de camadas de testa são os caracteres mais variáveis no envoltório da semente neste grupo.

Em nosso estudo, as sementes de *Cucullatanthus* diferem das sementes de *Canistrum* em termos de tamanho e forma (obovoides, 1,5-3 mm de comprimento vs. longo-oblongoides, até 10 mm de comprimento), além da ausência de um apêndice micropilar em *Cucullatanthus*, uma estrutura frequente em *Canistrum* e raramente encontrada em outras Bromelioideae (Carvalho *et al.*, 2023). Quando observado em *Canistrum* é formado pelo funículo alongado e uma extensão do exóstoma micropilar, na verdade funicular/micropilar, como nas espécies analisadas. Em Bromelioideae apêndices semelhantes são encontrados pontualmente no gênero *Hylaeaicum*, recentemente segregado de *Neoregelia* (Leme *et al.*, 2021) e em *Wittrockia superba*, embora observado em outras subfamílias de Bromeliaceae (obs. pess.). *Quesnelia marmorata* é uma exceção, com um discreto mas constante apêndice micropilar agudo, um padrão nunca

antes observado em Bromelioideae (Carvalho *et al.*, 2023). Por outro lado, o apêndice calazal parece ser polimórfico em Bromelioideae, principalmente no clado núcleo, além de ser frequente a redução ou ausência do apêndice calazal em muitos grupos (Carvalho *et al.*, 2023). Em *Cucullatanthus* é comum a ausência ou redução do apêndice calazal, mas este pode ser conspícuo, como em *Aechmea bambusoides* e *A. grazielae*, com apêndices adpressos e curvos, e *Quesnelia vasconcelosiana*, com um peculiar apêndice lobulado, novos padrões morfológicos para Bromelioideae (Carvalho *et al.*, 2023). O conspícuo apêndice calazal de *Canistrum* é comum na aliança *Aechmea* e outros grupos em Bromelioideae núcleo, estando associado a zoocoria ou adesão ao substrato, assim como o longo apêndice micropilar (Leme *et al.*, 2021; Carvalho *et al.*, 2023). *Canistrum lanigerum* é uma exceção para o gênero, com sementes menores, apêndice calazal adpresso, e apêndice micropilar ausente, embora pareça compartilhar as características anatômicas do tegumento com outras espécies de *Canistrum*.

As características anatômicas do tégmen são as mais marcantes nas espécies de *Cucullatanthus*, com uma combinação única de padrão de espessamento do endotégmen e exotégmen e ausência de compostos fenólicos nas células do endotégmen. Esses caracteres são compartilhados com poucas espécies Bromelioideae núcleo (*Neoregelia compacta* e *Hylaeicum margaretae*) (Carvalho *et al.*, 2023), geralmente com padrão típico de espessamento em forma de U e acumulando compostos fenólicos no endotégmen, como nos *Canistrum* analisados. Embora pontualmente, a testa (sarcotesta) apresenta alguns caracteres anatômicos únicos em Bromelioideae, no que diz respeito às formas e camadas celulares (Carvalho *et al.*, 2023). Neste estudo, destacamos a exotesta em “paliçada” encontrada em *Canistrum fosterianum* e *C. montanum* e a testa com mesotesta espessada de *Quesnelia marmorata*. A antirrafe fornece os principais caracteres anatômicos em sementes de Bromelioideae, embora a rafe possa diferenciar

especialmente gêneros e algumas espécies (Carvalho *et al.*, 2023). Em nosso estudo, as sementes de *Cucullatanthus* apresentam uma exotesta característica também na rafe, e o número de camadas de parênquima foi espécie-específico.

Embriões pequenos com cotilédones curtos são comuns em *Cucullatanthus*, em contraste com o embrião maior (4 a 5x) em espécies de *Canistrum*, exceto por *C. lanigerum* com comprimento intermediário. A morfologia do embrião foi recentemente utilizada na caracterização de novos gêneros cryptanthoides (Leme *et al.*, 2022), onde o tamanho do embrião e a proporção e posição dos cotilédones foram constantes em vários gêneros, como também em *Cucullatanthus* vs. *Canistrum*. O embrião pequeno, subdesenvolvido na classificação de Baskin & Baskin (2007) é encontrado em vários gêneros tanto em linhagens sem tanque quanto em core Bromelioideae, embora esta classificação não considere as variações morfoanatômicas, mais evidentes no embrião grande, com várias morfologias distintas em Bromelioideae e outras Bromeliaceae (Magalhães & Mariath, 2012; Leme *et al.*, 2021; Carvalho & Mariath, 2021; Leme *et al.*, 2022). Apesar da embriogenia inicial ser conservada em grupos distintos de Bromeliaceae (Carvalho & Mariath, 2021), o desenvolvimento final parece ser mais diversificado em outras subfamílias (Magalhães & Mariath, 2012) e requer mais investigações em Bromelioideae, principalmente anatômicas (Carvalho & Mariath, 2021; Leme *et al.*, 2022).

## Referências

**Baskin CC, Baskin JM. 2007.** A revision of Martin's seed classification system, with particular reference to his dwarf-seed type. *Seed Science Research* **17(1)**: 11-20.

- Carvalho JDT, Mariath JEA. 2021.** Embryo and endosperm development in *Billbergia nutans* H. Wendl. ex Regel (Bromelioideae-Bromeliaceae) and its implications for the embryonomy of Bromeliaceae. *Flora* **281**: 151867.
- Carvalho JDT, Leme EMC, Mariath, JEA. 2023.** The seed coat in the evolutionary context of Bromelioideae (Bromeliaceae): morphoanatomical diversity and ontogeny in the core and tankless lineages. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **boac072**.
- Leme EMC, Zizka G, Paule J, Aguirre-Santoro J, Heller S, Ramírez-Morillo IM, Halbritter H, Mariath JEA, Carvalho JDT, Forzza RC. 2021.** Re-evaluation of the Amazonian *Hylaeaicum* (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on neglected morphological traits and molecular evidence. *Phytotaxa* **499**: 1-60.
- Leme EMC, Zizka G, Souza EH, Paule J, Carvalho JDT, Mariath JEA, Halbritter H, Ribeiro OBC. 2022.** New genera and a new species in the “Cryptanthoid Complex” (Bromeliaceae: Bromelioideae) based on the morphology of recently discovered species, seed anatomy, and improvements in molecular phylogeny. *Phytotaxa* **544**: 128-170.
- Magalhães RI, Mariath JEA. 2012.** Seed morphoanatomy and its systematic relevance to Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Plant Systematics and Evolution* **298**: 1881–1895.

## CAPÍTULO VII

### Considerações finais

Apresentou-se, ao longo dos capítulos, dados morfoanatômicos de 134 espécies (incluindo táxons ainda não recombinados) de 54 gêneros de Bromeliaceae (Tabela 1), os quais geraram 64 caracteres variáveis da semente, 53 da morfoanatomia do envoltório e 11 do embrião. A análise do envoltório da semente em Bromeliaceae, incluindo a forma da semente, gerou uma diversidade morfoanatômica sem precedentes para a família, a qual, a partir de uma amostragem filogenética abrangente, tornou possível uma otimização de caracteres plausível no seu contexto evolutivo.

Em Bromelioideae destaca-se a presença de endotesta com espessamento secundário nas linhagens sem tanque, tendo essa camada se tornado mucilaginosa, com paredes primárias, na linhagem núcleo. A mucilagem tem papel fundamental nessa linhagem, sendo produzida pelo obturador da placenta ou funículo no fruto em maturação, ou em casos especiais, por tricomas no apêndice calazal como nas espécies de *Araeococcus*. Testes histoquímicos nas sementes dessa subfamília podem revelar substâncias associadas ao modo de dispersão, por exemplo, grãos proteicos no envoltório foram observados apenas em *Cryptanthus*. A análise ontogenética foi essencial no reconhecimento de homologia entre as camadas dos tegumentos do rudimento seminal e as camadas da semente, assim como a homologia entre as estruturas das diferentes espécies analisadas. Análises ontogenéticas do envoltório podem avançar principalmente quanto às modificações da parede celular entre as linhagens sem tanque, por exemplo entre os Cryptanthoides, com tégmen costado e diferentes padrões de espessamento na endotesta. Nesse contexto, análises de imunohistoquímica podem ser importantes,

principalmente para a compreensão do papel das pectinas na formação do envoltório distinto nas linhagens de Bromelioideae.

A análise do envoltório da semente em Bromeliaceae indica que sementes alongadas e com ambos os apêndices são ancestrais na família, tendo evoluído para sementes obovoides ou discoides diversas vezes, como também perdido um ou ambos os apêndices. Nossa análise também indica que a condição testal da semente é ancestral em Bromeliaceae, tendo sido perdidas as camadas mecânicas da testa ao longo das subfamílias por colapso celular, porém com expressão dessas camadas ainda na rafe em diferentes grupos. Sementes estritamente testais (com sarcotesta mucilaginosa) ocorrem apenas nas Bromelioideae núcleo, sendo uma potencial apomorfia para esse grupo. Nesse contexto, a endotesta com espessamentos secundários presente nas linhagens sem tanque pode ser considerado um estado transitório para a total perda da camada mecânica da testa. A aparente independência das características da rafe e antirrafe, assim como entre as camadas do envoltório implicam em estudos independentes dessas regiões. Enquanto a perda de camadas mecânicas na antirrafe pode significar uma redução de peso para a dispersão, a presença de espessamentos em rafes ocas pode ser essencial para a manutenção da estrutura da semente. Quanto aos apêndices, nossa análise indica que ambos, calazal e micropilar eram aliformes ancestralmente, tendo evoluído para diversas morfologias ao longo das subfamílias, com destaque aos apêndices plumosos em Tillandsioideae e mucilagosos em Bromelioideae. A presença de uma ala antirrafeal ocorreu apenas no clado *Dyckia* + *Encholirium*, entre todas as Bromeliaceae analisadas. Além disso, o estudo detalhado dos espessamentos, da testa e tégmen revelou inúmeros caracteres que certamente poderão ser aplicados na delimitação de diversos grupos nas subfamílias analisadas, com destaque para a testa com fibras articuladas em Tillandsioideae e os diversos padrões do exotégmen em Bromelioideae. A análise

ontogenética do envoltório da semente em Bromeliaceae serviu de base para a descrição e comparação dos caracteres propostos para Brocchinioideae, Tillandsioideae, Pitcairnioideae e Puyioideae, embora não tenha sido apresentada integralmente na presente tese. Análises de microtomografia e reconstrução 3D da semente em Bromeliaceae pode fornecer as bases para as hipóteses de dispersão na família, e as implicações dos diferentes padrões morfoanatômicos descritos.

Quanto ao embrião, a análise embriogênica revelou um padrão de desenvolvimento bastante conservado, ou seja, com certas características compartilhadas entre diferentes representantes de Bromeliaceae. Isso levou à proposição de uma nova variação para o tipo Onagráceo de desenvolvimento do embrião, a Variação *Billbergia*, que pode ser aplicada inequivocamente para outras espécies da família. A endospermogênese também está de acordo com outras espécies da família, sendo do tipo helobial em uma variação rara observada em algumas famílias de Monocotiledôneas. A análise morfoanatômica do embrião em Bromeliaceae revelou diversas características nunca antes observadas na família, em especial quanto ao tamanho geral e morfologia do cotilédone. Nossa análise indica que embriões pequenos com cotilédone curto ou vestigial são ancestrais em Bromeliaceae, tendo evoluído cedo e diversas vezes para embriões médios ou grandes e cotilédone longo, em diferentes morfologias, como espatulado, truncado e curvado. Também destaca-se a presença de contração hipocótilo-radicular exclusivamente em Tillandsioideae, ocorrendo em diversos gêneros e em algumas variações, com nota para a constrição unilateral observada em *Catopsis sessiliflora*, múltipla ou helicoidal em *Racinaea spiculosa* e com compostos fenólicos armazenados apenas em *Tillandsia*. A anatomia do embrião foi analisada para poucas espécies em comparação à amostragem morfológica total. Apesar disso, foi importante para reconhecer os embriões pequenos como diferenciados em tecidos e algumas variações

dos embriões grandes, como a presença de primórdios foliares no epicótilo. A análise do desenvolvimento do embrião nas diferentes morfologias observadas, incluindo variações no cotilédone e eixo hipocótilo-radicular, além das variações em tamanho, é fundamental para compreender a evolução da Variação *Billbergia*, e se essa variação é realmente conservada ao longo de Bromeliaceae. Futuras análises da germinação e morfologia da plântula são importantíssimas para relacionar as estruturas observadas com sua possível função. Da mesma forma, análises de microtomografia e reconstrução 3D aplicadas à volumetria da semente podem dar respostas quanto à dormência da semente e germinação em Bromeliaceae, ainda pouco exploradas. Quanto ao endosperma na família, nossas análises indicam pouca variação estrutural, sendo o tipo helobial aparentemente conservado na família. Apesar disso, certas variações histoquímicas foram percebidas, como a presença de lipídeos na epiderme do endosperma em Bromelioideae.

Por fim, a morfoanatomia da semente teve fortes implicações na sistemática de Bromelioideae, nas recentes proposições e novos status para espécies e gêneros nessa subfamília, o que demonstra sua aplicabilidade nesse tipo de análise. A expansão dessas análises para outras subfamílias, especialmente Tillandsioideae pode ser igualmente importante.

**Tabela 1.** Lista de táxons analisados nesta tese, com respectivos números de acesso ou vouchers de herbário.

<i>Acanthostachys strobilacea</i> (Schult. f.) Link, Klotzsch & Otto	HAS 19778
<i>Aechmea aff. disjuncta</i> Leme & J.A. Siqueira	Leme 3891
<i>Aechmea bambusoides</i> L.B. Sm. & Reitz	Leme 672
<i>Aechmea bromeliifolia</i> (Rudge) Baker	HAS 3962
<i>Aechmea castelnavii</i> Baker	Leme 9137 (HB)
<i>Aechmea correia-araujo</i> E. Pereira & Moutinho	Leme 9617
<i>Aechmea disjuncta</i> Leme & J.A. Siqueira	Leme 5604
<i>Aechmea distichantha</i> Lemaire	HAS 31718; HAS 66115
<i>Aechmea fosteriana</i> L.B. Sm. <i>subsp. fosteriana</i>	Leme 9487
<i>Aechmea fosteriana subsp. rupicola</i> Leme	Leme
<i>Aechmea gamosepala</i> Wittmack	BROM 00503; 00543
<i>Aechmea grazielae</i> Martinelli & Leme	Leme

<i>Aechmea recurvata</i> (Klotzsch) L.B. Sm.	BROM 00149; 00150
<i>Aechmea strobilina</i> (Beurl.) L.B. Sm. & Read	Leme 9498 (HB)
<i>Aechmea tocantina</i> Baker	Leme 143 (HB)
<i>Alcantarea acuminatifolia</i> Leme	RB 345880
<i>Alcantarea duarteana</i> (L.B. Sm.) J.R. Grant	Leme 1813
<i>Alcantarea imperialis</i> (Carrière) Harms	RB 494210
<i>Ananas ananassoides</i> (Baker) L.B. Sm.	HB 75293
<i>Ananas nanus</i> (L.B. Sm.) L.B. Sm.	BROM 00420
<i>Ananas paraguayensis</i> Camargo & L.B.Sm.	Leme 9479 (HB)
<i>Araeococcus goeldianus</i> L.B. Sm.	Leme 2582 (HB)
<i>Araeococcus micranthus</i> Brongniart	Leme 9507 (HB)
<i>Bakerantha lundelliorum</i> (L.B. Sm.) I. Ramírez & K. Romero	Ramírez 1491A (CICY)
<i>Bakerantha purpusii</i> (Brandege) I. Ramírez & K. Romero	Ceja 1643 (CICY)
<i>Billbergia nutans</i> H. Wendl. ex Regel	ICN 190645; ICN 190646
<i>Billbergia zebrina</i> (Herb.) Lindley	ICN 155293
<i>Brocchinia acuminata</i> L.B. Sm.	Leme 3276
<i>Brocchinia hechtioides</i> Mez	RB 618137
<i>Brocchinia micrantha</i> (Baker) Mez	Leme
<i>Brocchinia tatei</i> L.B. Sm.	RB00108470
<i>Bromelia antiacantha</i> Bertoloni	ICN 185360
<i>Bromelia balansae</i> Mez	BROM 00350
<i>Bromelia karatas</i> Linnaeus	Gutierrez 8762
<i>Canistropsis billbergioides</i> (Schult. f.) Leme	ICN 177180
<i>Canistrum alagoanum</i> Leme & J.A. Siqueira	Leme
<i>Canistrum aurantiacum</i> E. Morren	BROM 00677
<i>Canistrum fosterianum</i> L.B. Sm.	Bromelioideae
<i>Canistrum lanigerum</i> H. Luther & Leme	Leme
<i>Canistrum montanum</i> Leme	Leme 9855 (HB)
<i>Catopsis juncifolia</i> Mez & Wercklé	Leme 2844
<i>Catopsis sessiliflora</i> (Ruiz & Pav.) Mez	FURB 1105
<i>Cottendorfia florida</i> Schult. f.	RB 415028; RB 202344
<i>Cryptanthus aff. beuckeri</i> É. Morren	Ramírez 1491A (CICY)
<i>Cryptanthus aff. burle-marxii</i> Leme	Ceja 1643 (CICY)
<i>Cryptanthus bahianus</i> L.B. Sm.	Leme 9616
<i>Cryptanthus colnagoi</i> Rauh & Leme	Leme 9154 (HB)
<i>Cryptanthus pickelii</i> L.B. Sm.	Leme 9665 (HB)
<i>Deuterocohnia brevifolia</i> (Griseb.) M.A. Spencer & L.B. Sm.	DES 13756
<i>Deuterocohnia meziana</i> Kuntze ex Mez	RB 382284
<i>Dyckia agudensis</i> Irgang & Sobral	ICN 29950
<i>Dyckia brevifolia</i> Baker	ICN 29955
<i>Dyckia dusenii</i> L.B. Sm.	HAS 32329

<i>Dyckia hebdingii</i> L.B. Sm.	ICN 29988
<i>Dyckia selloa</i> (K. Koch) Baker	ICN 30044
<i>Edmundoa ambigua</i> (Wand. & Leme) Leme	HAS 33934
<i>Edmundoa lindenii</i> (Regel) Leme	ICN 185361
<i>Encholirium eddie-estevesii</i> Leme & Forzza	RB 452587
<i>Encholirium gracile</i> L.B. Sm.	RB 647442
<i>Encholirium horridum</i> L.B. Sm.	RB 598386; RB 468821
<i>Encholirium spectabile</i> Mart. ex Schult. f.	RB 488675; RB 801404
<i>Fernseea itatiaiae</i> (Wawra) Baker	RB 330827
<i>Fosterella atlantica</i> Leme, Forzza & O.B.C. Ribeiro	Leme 9224
<i>Fosterella vasquezii</i> E. Gross & Ibsch	RB 510049
<i>Goudaea chrysostachys</i> É. Morren) W. Till & Barfuss	Leme 4118
<i>Greigia sphacelata</i> (Ruiz & Pav.) Regel	Montero 7993
<i>Guzmania lingulata</i> (L.) Mez	RB 499600
<i>Hechtia glomerata</i> Zucc.	Ramirez 2362 (CICY)
<i>Hechtia melanocarpa</i> L.B. Sm.	Espejo 3133 (CICY)
<i>Hechtia pumila</i> Burt-Utley & Utley	Ceja 1684 (CICY)
<i>Hechtia rosea</i> É. Morren ex Baker	Ramirez (CICY)
<i>Hohenbergia augusta</i> (Vell.) E. Morren	HAS 36040
<i>Hohenbergia stellata</i> Schult. f.	Leme 6308 (HB)
<i>Hoplocryptanthus glaziovii</i> (Mez) Leme, S. Heller & Zizka	Leme 4348/1545 (HB)
<i>Hylaeicum levianum</i> (L.B. Sm.) Leme & Forzza	Leme 5639-A (HB)
<i>Hylaeicum margaretae</i> (L.B. Sm.) Leme & Forzza	Leme 5639-A (HB)
<i>Karawata gustavoi</i> (J.A.Siqueira & Leme) J.R. Maciel & G.M. Sousa	Leme 4652 (HB)
<i>Krenakanthus ribeiranus</i> sp. nov.	Leme (HB)
<i>Krenakanthus roseolilacinus</i> (Leme) Leme, Zizka & Paule	Leme 8922
<i>Lindmania argentea</i> L.B. Sm.	RB 618166
<i>Lindmania maguirei</i> (L.B. Sm.) L.B. Sm.	RB 631265
<i>Mesoamerantha guatemalensis</i> (Mez) I. Ramírez & K. Romero	Ramirez (CICY)
<i>Mesoamerantha malvernii</i> (Gilmartin) I. Ramírez & K. Romero	Ramirez (CICY)
<i>Mezobromelia pleiosticha</i> (Griseb.) Utley & H. Luther	RB 807067; RB 424939
<i>Navia arida</i> L.B. Sm. & Steyerf.	Leme 1249
<i>Navia nubicola</i> L.B. Sm.	RB 103850
<i>Neoglaziovia variegata</i> (Arruda) Mez	RB 391489; RB 542666
<i>Neoregelia compacta</i> (Mez) L.B. Sm.	Leme 5744 (HB)
<i>Neoregelia johannis</i> (Carrière) L.B. Sm.	ICN 190905
<i>Neoregelia retrorsa</i> Leme & L. Kollmann	Leme 7371 (HB)
<i>Nidularium amazonicum</i> (Baker) Lindm. & E. Morren	BROM 00282;
<i>Nidularium innocentii</i> Lemaire	ICN 190908
<i>Orthocryptanthus vasconcelosianus</i> (Leme, Zizka & Paule) Leme, Zizka & Paule	Leme 8673 (HB)
<i>Orthophytum compactum</i> L.B. Sm.	Leme 5604 (HB)

<i>Orthophytum leprosum</i> (Mez) Mez	Leme 9539 (HB)
<i>Orthophytum maracasense</i> L.B. Sm.	Leme 9617 (HB)
<i>Orthophytum pseudovagans</i> Leme & L. Kollmann	Leme 7028 (HB)
<i>Orthophytum saxicola</i> (Üle) L.B. Sm.	BROM 00661
<i>Orthophytum vagans</i> M.B. Foster	Leme 505 (HB)
<i>Pitcairnia breedlovei</i> L.B. Sm.	Ramirez 1491A (CICY)
<i>Pitcairnia flammea</i> Lindl.	HAS 32383
<i>Pitcairnia maidifolia</i> (C. Morren) Decne. ex Planch.	Leme 5488
<i>Portea petropolitana</i> (Wawra) Mez	BROM 00693
<i>Pseudananas sagenarius</i> (Arruda) Camargo	Leme
<i>Puya ferruginea</i> (Ruiz & Pav.) L.B. Sm.	Leme
<i>Puya floccosa</i> (Linden) É. Morren ex Mez	Leme
<i>Puya mirabilis</i> (Mez) L.B. Sm.	BROM773
<i>Puya venusta</i> Phil.	RB00601851
<i>Quesnelia edmundoi</i> L.B. Sm. var. <i>edmundoi</i>	Leme
<i>Quesnelia edmundoi</i> var. <i>rubrobracteata</i> E. Pereira	Leme
<i>Quesnelia liboniana</i> (De Jonghe) Mez	HAS 36084
<i>Quesnelia marmorata</i> (Lem.) Read	Leme
<i>Quesnelia quesneliana</i> (Brongn.) L.B. Sm.	BROM 00882
<i>Quesnelia vasconselosiana</i> Leme	Leme
<i>Racinaea spiculosa</i> (Griseb.) M.A. Spencer & L.B. Sm.	FURB50901
<i>Rokautskyia pseudoglazioui</i> (Leme) Leme, S. Heller & Zizka	Leme 1556 (HB)
<i>Rokautskyia whitmanii</i> (Leme) Leme, S. Heller & Zizka	Leme 5208 (HB)
<i>Siqueiranthus cinereus</i> (D.M.C. Ferreira & Louzada) Leme, Zizka, E.H. Souza	Leme 9785
<i>Stygmatoron plurifolius</i> (Leme) Leme, G.K. Br. & Barfuss	Leme
<i>Tillandsia duratii</i> Vis.	BROM 368; BROM 438
<i>Tillandsia geminiflora</i> Brongn.	ICN 183675
<i>Tillandsia lorentziana</i> Griseb.	HAS 30025
<i>Tillandsia recurvata</i> (L.) L.	BROM 856
<i>Tillandsia stricta</i> Sol. ex Sims	ICN 177676
<i>Tillandsia tenuifolia</i> L.	ICN 178394
<i>Tillandsia usneoides</i> (L.) L.	HAS 66325; HAS 66334
<i>Ursulaea tuitensis</i> (Magana & E.J. Lott) Read & Baensch	ICN 203090
<i>Vriesea carinata</i> Wawra	ICN 144794
<i>Vriesea gigantea</i> Mart. ex Schult. f.	ICN 183677
<i>Vriesea philippocoburgii</i> Wawra	BROM 132
<i>Vriesea platynema</i> Gaudich.	HAS 31643; HAS 30147
<i>Waltillia</i> sp. Leme, Barfuss & Halbritt.	Leme
<i>Werauhia</i> sp. J.R. Grant	Leme 3988
<i>Wittrockia superba</i> Lindman	ICN 190904